jarvasg_461_26

Kapilláris elektroforézis elválasztás alapú glikomikai módszerek fejlesztése és alkalmazása

MTA Doktori értekezés tézisei

Járvás Gábor

Pannon Egyetem

Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

Veszprém

2026

1. Bevezetés és célkitűzések

A glikomika, mint tudományterület a biológiai rendszerek szénhidrát (glikán) szerkezeteit és azok funkcióját tanulmányozza. A vizsgálat tárgyát elsődlegesen az élő szervezetekben előforduló cukor oligomereker képezik, ugyanakkor dolgozatomban a glikomikai módszerek közé sorolom azokat a glikán analitikai eljárásokat is, melyek a különböző biológiai eredetű gyógyszerek, az angol terminológiát magyarosítva biológikumok szénhidrát struktúráit vizsgálják, mivel ezek egyre szélesebb körű elterjedése komoly hajtóerőt jelent a kapcsolódó diszciplínák fejlődésében. A poszt-genetikai éra egyik legnagyobb kihívása a fehérjék poszt-transzlációs módosulásainak megfelelő szintű feltárása és azok funkcióinak megértése, beleértve a glikozilációt is. A glikán analitikai eljárások fejlettsége és kidolgozottsága jelentősen elmarad a genetikai és proteomikai módszerekétől, és ez hatványozottan igaz azokra a kapcsolt eljárásokra, amelyek a kapilláris elektroforézist (CE) mint nagyhatékonyságú folyadékfázisú elválasztási módszert alkalmazzák.

A biológiai minták analízise különösen nagy kihívások elé állítják az elválasztástechnikai szakembereket, mivel mind a vizsgálandó célmolekula mind az azt tartalmazó mátrix kémiai, fizikai és biokémiai tulajdonságai jelentősen eltérhetnek a tradicionálisnak tekintett analitikai kémia vizsgálatának tárgyától. A különböző biológiai minták mennyiségi és minőségi vizsgálatának egyik különösen összetett területe a fentebb már említett glikánok analízise, mely számos szerkezetvizsgáló módszer alkalmazását követeli meg. Ezen módszereken belül a CE a legtöbbet alkalmazott folyadék kromatográfiás módszerekhez képest ortogonális technikának tekinthető. A CE egy olyan nagy felbontóképességű elválasztástechnikai módszer, mely kombinálja a különösen nagy elméleti tányérszámot a gyakorlati szempontból fontos gyors elválasztási idővel és kis mintaszükséglettel, mely a biológiai minták esetében gyakran korlátozó tényező egy adott mérési feladat megoldásánál. A kapilláris elektroforézis az első alkalmazásai óta eltelt öt évtizedben sokat fejlődött mind elméleti mind gyakorlati szempontból, ugyanakkor még mindig számos rendkívül fontos aspektusa nem került részletes feltárásra.

A CE relatív újszerűsége miatt eddig munkásságom több területen is kapcsolódik a módszer fejlesztéséhez és alkalmazásához. Ennek megfelelően értekezésemet is több témakör feldolgozása köré szerkesztettem, ezek a minta előkészítés fejlesztése, az elválasztás jelenségek elméleti hátterének feltárása és leírása, a kapott elektroferogramok feldolgozása és kiértékelése, valamint az új módszerek alkalmazása.

Egy adott feladat megoldásához szükséges analitikai stratégia kidolgozása során a mintaelőkészítés meghatározó szerepét nem lehet megfelelően hangsúlyozni, mégis sokszor a sikertelenség oka az, hogy nem sikerül a mátrix összetettségét megfelelő módon csökkenteni és / vagy a célmolekula koncentrációját növelni, illetve nem reprezentatív a mintavétel. A mintaelőkészítés tárgyköréhez kapcsolódó munkáink és eredményeink közé sorolom a

mikrofluidikai chipek fejlesztését és alkalmazását; a vér, mint az egyik leggyakoribb és legfontosabb biológiai mátrix különböző feldolgozási paramétereinek vizsgálatát, azok hatását az elemzésre nézve; és a megfelelő offline – online prekoncentrációs technikák kidolgozását és alkalmazását a kapilláris elektroforézis elválasztások megvalósításában. Ugyancsak a mintaelőkészítés tárgyköréhez kapcsolódnak azok a vizsgálataink, amik immun-affinitás alapú patogén – többek között ritka sejt és vírus – csapdák megvalósíthatóságát célozzák terápiás céllal.

A CE alapú elválasztások elméleti alapjainak vizsgálata a kutatásaink egyik legfontosabb területe, ahol eredményesen tudtuk alkalmazni többek között a doktori kutatómunkám során megszerzett termodinamikai és számításos kémiai ismereteimet is. A fizikai-kémiai és analitikai kémiai területek ilyen jellegű kombinációja lehetőséget biztosított számunkra, hogy olyan fundamentális elméleti vizsgálatokat végezhessünk el, amik megpróbálják részletesen megmagyarázni egy-egy analitikai feladat megoldása során a meghatározó elválasztási mechanizmusok szerepét. Annak ellenére, hogy a modellezés és szimuláció nem sorolható közvetlenül az elméleti vizsgálatok eszköztárához, az elméleti jellegű munkáink közé sorolom a kapilláris elektroforézis – tömegspektrométer kapcsolást numerikus módszerekkel vizsgáló közleményeimet is.

A kapilláris elektroforézist alkalmazó N-glikán elválasztási módszerek közvetlen kimenetét az elektroferogramok jelentik, melyek kiértékeléséhez csak korlátozott számban állnak rendelkezésre manuális eljárások és mesterséges inteligencián alapuló szoftver eszközök. A legtöbb készülékgyártó fejlesztett valamilyen szoftveres analízis eszközt, ugyanakkor ezek alkalmazhatósága a legtöbb esetben egy szűk területre vagy feladatra korlátozódik. Az értekezésben bemutatott eredményeink jelentős része a bioinformatika / glikoinformatika tárgyköréhez kapcsolódik. Új számolási algoritmusokat és az ezek segítségével létrehozott ún. glükóz egység adatbázisokat közöltünk, melyek az N-kötött glikánok kapilláris elektroforézis alapú szerkezetmeghatározásának nélkülözhetetlen eszközei.

A CE-hez általunk kifejlesztett valamennyi új eljárást igyekeztünk olyan területeken alkalmazni, ahol feltételeztük, hogy az új módszerrel az eddigieknél részletesebb feltárható egy adott betegség diagnosztizálhatóságának vagy monitorozhatóságának N-glikozilációs háttere. Ilyen területnek bizonyultak többek között a tüdőbetegségek (COPD, tüdőgyulladás, tüdőrák), a prosztatarák, illetve a cukorbetegség.

2013-óta foglalkozom bioanalitikával Guttman András professzor szakmai mentorálása mellet. Az elmúlt időszakban minden területen kiváló munkatársakkal dolgozhattam együtt, az értekezésben bemutatott miden projekt szintű eredmény közös munka. Ezt fontosnak tartom hangsúlyozni, annak ellenére, hogy az elvárásoknak megfelelően igyekeztem minden esetben bemutatni, hogy mi volt az én egyéni, személyes hozzájárulásom az adott probléma megoldásában.

2. Anyagok és módszerek

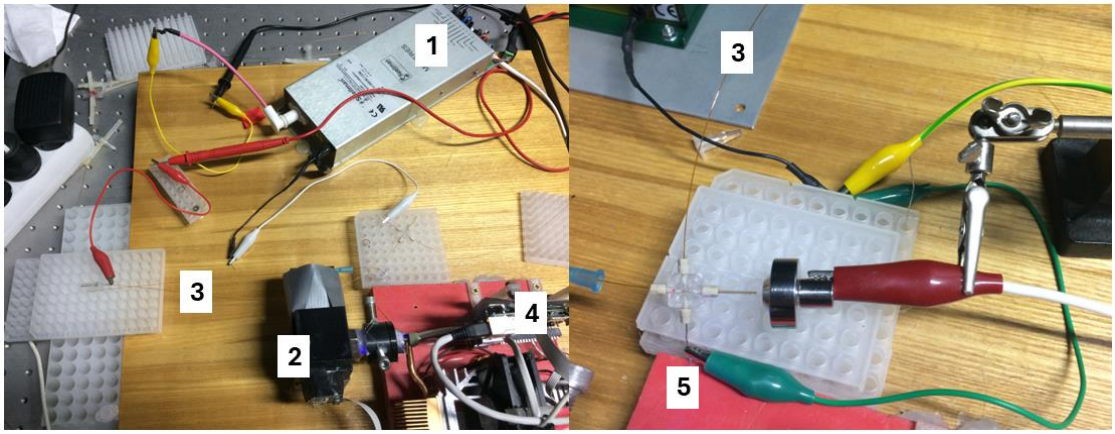
A kapilláris elektroforézis elválasztások megvalósításához mind egyedileg, saját kezűleg épített eszközöket, mind kereskedelmi forgalomban beszerezhető készülékeket - Beckman Coulter MDQ és PA800+, valamint CESI - használtunk (Beckman Coulter, Brea, Egyesült Államok). Mivel a bemutatott munkák jelentős része túlmutat a konvencionális technikák új területen történő alkalmazásán, a legtöbb esetben az eredményeket a korábbi eljárások továbbfejlesztésével vagy radikális átalakításával értük el, ezért az alkalmazott módszerek és eljárások bemutatása csak olyan mértékű, hogy az eredmények önállóan értékelhetőek legyenek a kapcsolódó szakcikkek részletes átböngészése nélkül is. Gyakran alkalmaztuk azt a megközelítést, hogy amíg a kereskedelmi forgalomban kapható berendezések megengedték az új ötletek és elképzelések kipróbálását, addig azokat használtuk, míg az összetetteb vagy valamilyen okból kockázatosabbnak tekintett koncepciókat az egyedi berendezésben teszteltük, lásd az úgynevezett „fapados CE”-t az 1. ábrán. Összeségében elmondható, hogy az elválasztások minden esetben poliimid külső bevonatú kvarckapillárisokban (Polymicro Technologies, Phoenix, Egyesült Államok) történtek platina elektródok alkalmazása mellet lézer indukált fluoreszcens vagy UV detektálással. Az elválasztási paraméterek, többek között a kapillárisok hossza, belső átmérője, az injektálás módja, az elválasztás hőmérséklete, az elválasztó feszültség mértéke, mind a vizsgálataink és fejlesztő munkánk tárgyát képezték. Kiemelten fontos volt a különböző elválasztási módszerekhez - kapilláris zónaelektroforézis, micelláris elektrokinetikus kromatográfia, kapilláris gélelektroforézis, kapilláris izoelektromos fókuszálás, kapilláris izotachoforézis - tartozó közegek kémiai összetételének vizsgálata és az új kompozíciók kifejlesztése.

Amennyiben a kapilláris elektroforézis elválasztást tömegspektrometriával csatoltuk, úgy minden esetben elektrospray ionizációt alkalmaztunk. A porózus nano-elektrospray emitterek vizsgálatát Thermo LTQ és Thermo Q-Exactive tömegspektrométereken (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Egyesült Államok) végeztük John R. Yates laboratóriumában a The Scripps Research Institute-ban (La Jolla, CA, Egyesült Államok). Az emitter-tű nélküli mikrochip interfész teszteléséhez Bruker maXis impact (Bruker, Billerica, Egyesült Államok) készüléket használtuk Frantisek Foret kutatócsoportjában az Institute of Analytical Chemistry-ben (Brnó, Cseh Köztrásaság).

Az inverz gázkromatográfiás méréseket SMS iGC-SEA készüléken végeztük (Surface Measurement Systems, London, Egyesült Királyság). A mikrochipek és a sejtek megfigyeléséhez Nikon Eclipse Ni fluoreszcens mikroszkópot és Nikon D5000 digitális kamerát használtunk. A sejtek és sejtes modellrendszerek fiziológiai és kémiai tulajdonságainak elemzéséhez Gallios áramlási citométert alkalmaztunk (Beckman Coulter, Brea, CA, Egyesült Államok). A PDMS mikrochipeket oligomer és térhálósító adalék (Dow Corning, Midland, MI, Egyesült Államok) felhasználásával készítettek a számunkra a Debreceni Atommagkutató Intézet és a Budapesti Energiatudományi Kutatóközpont munkatársai. A vérmintákból Hermle

Z 216 MK (Gosheim, Németország) centrifugával készítettünk szérumot. A mintaelőkészítés automatizálásához Beckman Coulter Biomek 3000 folyadékkezelő robot alkalmaztunk. Az egydoménes antitestek immobilizálásához Ni-IMAC töltetes pipetta hegyeket használtunk (Biotage, Uppsala, Svédország). A vizeletminták töményítése 10 kDa ún. spin-filterekkel történt (Pall, New York, Egyesült Államok).

A numerikus áramlástani szimulációkat COMSOL Multiphysics (COMSOL AB, Stockholm, Svédország) rendszerben futtattuk, míg a különböző algoritmusokat és az azokat implementáló szoftvereket Matlab (MathWorks, Natick, MA, Egyessült Államok) programozói környezetben fejlesztettük.



1. ábra Laboratóriumban összeállított – úgynevezett fapados – lézer indukált fluoreszcens detektorral felszerelt kapilláris elektroforézis készülék. 1) nagyfeszültségű tápegység, 2) detektor 3) kapilláris 4) adatgyűjtő egység – Raspberry pi3 5) elektróda.

Tézispontok

1. **Korlátozott mennyiségben elérhető biológiai eredetű minták glikomikai célú feldolgozásához mintaelőkészítési eljárásokat fejlesztettünk. A kidolgozott módszerek segítségével közvetlenül az elválasztó kapillárisban dúsíthatók a jelölt analitok, újrafelhasználható módon enzimatikus úton emészthetőek a glikánok, illetve meghatároztuk a humán vérminták stabilitását életszerű tárolási és szállítási körülmények mellet.**
   - **1.1. Kifejlesztettünk egy prekoncentrációs technikát, mely közvetett, azaz „off-line" és közvetlen azaz „on-line" módon is alkalmazható N-glikánok lézer indukált fluoreszcens detektálású kapilláris elektroforézis elválasztása során.** Feltártuk, hogy a módszer a glikánok származékképzéséhez használt 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát (APTS) és a kapillárisban kialakított cirkóniummal módosított polietilén-glikol-metakrilát-foszfát alapú, akrilamiddal és bisz-akrilamiddal ko-polimerizált monolit közötti erős fém-affinitás kölcsönhatáson alapul. Az eljárás paramétereinek optimalizációját követőn az új módszer alkalmasnak bizonyult az APTS jelölt N-glikánok jelentős mértékű szelektív dúsításához. „off-line" módon malto-oligoszacharid sztenderd elválasztása esetén 9-24 szeres dúsulást sikerült elérni, míg „on-line" módon elsőként számoltunk be a módszer megvalósíthatóságát [1].
   - **1.2. Új N-glikán felszabadítási módszert dolgoztunk ki PNGase F enzim mágneses mikrogyöngyök felszínére történő immobilizálásával.** Az immobilizált mikrogyöngyök a konvencionális technikákhoz képest jelentősen gyorsabb (tíz vs. hatvan - kilencven perc), ugyanakkor hatékonyabb emésztést tesznek lehetővé. A mikrogyöngyök egy mágnes segítségével egyszerűen elkülöníthetőek a minta mátrixtól, így lehetővé téve a gyöngyök újrafelhasználását egy következő deglikozilációs reakcióban [2].
   - **1.3. Glikomikai vizsgálatokhoz levett vérminták tárolási körülményeit tanulmányozva azt találtuk, hogy a kapilláris elektroforézis elválasztással teljes vérből meghatározott N-glikán profilalkotást nem befolyásolja a vizsgálat előtti 24 órás 5°C-os inkubálás.** Életszerű vérvételi eljárásokat feltételezve nem minden esetben biztosítható a minták hűtésnek azonnali megkezdése (pl.: az asszisztens „összevár" több mintát vagy más sürgős eset érkezik), ezért szisztematikusan megvizsgáltuk, hogy a vérvételt követő esetleges több órás szobahőmérsékletű tárolás milyen hatással van a kapott profilra. Továbbá kimutattuk, hogy sztenderd módon vett szérum minta feldolgozása során a sziálsavas szerkezetek degradációja szobahőmérsékleten megkezdődik már kilencven perc elteltével. Négy és fél óra elteltével a sziálsavas szerkezetek mennyisége megközelítőleg a felére csökken. Ezek alapján javaslatot tettünk a szérum minták glikomikai célú feldolgozásának standardizálására [3].
2. **Patogén csapdaként funkcionáló mikrofluidikai eszközöket terveztünk, vizsgáltunk és alkalmaztunk cirkuláló ráksejtek véráramból történő elkülönítéséhez.**

2.1. Elsőként alkalmaztunk inverz gázkromatográfiát levegő plazmával kezelt polidimetilsziloxán felületek kvantitatív felületi energetikai jellemzéséhez. A polidimetilsziloxán a mikrofluidikai eszközök egyik leggyakrabban alkalmazott szerkezeti anyaga. Kimutattuk, hogy a levegőplazmás kezelés nem befolyásolja a felületi energia diszperzív komponensét, ugyanakkor bizonyítottuk, hogy a felületi hidrofobicitás változását az elektron-donor hajlam (Lewis-bázicitás) növekedése okozza. Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti paraméterek mellet a levegőplazma kezelés optimális időtartama öt másodperc, míg a hidrofobicitás mértéke harmincnyolc óra alatt visszaáll a kezelés előtti szintre [4].

2.2. Numerikus áramlástani modellezés segítségével vizsgáltuk és optimalizáltuk polidimetilsziloxán alapú mikrofluidikai sejtcsapdák funkcionális szerkezetét. Áramlástani modelleket készítettünk, és szimuláltuk velük a mikrofluidikai sejtcsapdákban várhatóan kialakuló sebesség-eloszlásokat figyelembe véve a minimális helyigényt és maximális felületet, mint tervezési kritériumokat. Az egységes sebesség-eloszlás kialakításának érdekében optimalizáltuk a folyadékosztó, valamint a fajlagos felület növelésére szolgáló mikro-oszlopok geometriáját és topológiáját az adott korlátozó tényezők figyelembevételével [5, 6].

2.3. Megnövelt funkcionális felületű, döntött mikro-oszlopokat alkalmazó mikrofluidikai sejtcsapdák áramlástani viselkedést vizsgáltuk képelemzés segítségével. A sejtcsapda áramlási terébe elhelyezett döntött oszlopokkülönleges áramlástani viselkedést idéznek elő, melynek nyomonkövetése és áramlástani jellemzése manuálisan csak korlátozott módon végezhető el. A képelemzés segítségével értelmeztük a funkcionális felület és a folyadék főtömegével áramló sejtek között kialakuló kölcsönhatás mechanizmusát [7].

2.4. Nagy áteresztőképességű technológiát fejlesztettünk ki cirkuláló ráksejtek és vírusok humán véráramból történő immun-affinitás alapú szelektív és nagyhatékonyságú eltávolításához terápiás céllal. A diagnosztikai célú sejtcsapdák fejlesztése során felismertük, hogy az áteresztőképesség növelésével, valamint a megfelelő áramlástani hasonlóság megőrzésével biztosítható a funkcionális felületre immobilizált antitest és az áramló patogén felületén található antigén közötti kapcsolat hatékony kialakulása. Hemodialízis membrán, valamint üveg mikrogyöngyök felületére rögzítettünk különböző immun-affinitás molekulákat és bizonyítottuk a technológiai megvalósíthatóságát vastagbél karcinóma, illetve SARS-CoV-2 vírus kifogása során [8, 9] [I, II].

3. Kapilláris elektroforézis – elektrospray ionizációs tömegspektrométer interfészek működését tanulmányoztuk szimulációs és kísérletes módszerekkel, illetve új emitter-tű nélküli mikrofluidikai interfészt fejlesztettünk [III]**.**

3.1. Porózus nano-elektrospray kapilláris emitter alkalmazásánál minden esetben szükséges valamilyen módon biztosítani a háttér elektrolit áramlását a tömegspektrométer irányába, mivel csak így tartható fent az áramkör zárása és az

elektrospray. Numerikus áramlástani szimulációkkal kimutattuk, hogy a konvektív áramlásnak jelentős hatása van az elválasztás hatékonyságára, amit kísérletes úton meghatározott elméleti tányérszámokkal jellemeztünk. Kvantitatív módon vizsgáltuk, hogy a konvektív áramlással megegyező, illetve azzal ellentétes irányú elekroozmotikus áramlás az adott rendszeren belül milyen eredő elválasztási hatékonyságot indukál [10].

3.2. A kapilláris elektroforézis – elektrospray ionizációs tömegspektrométer kapcsolásoknál alkalmazott porózus nano-elektrospray emitterek lehetővé teszik a rendkívül kis térfogatáramú (5-20 nl/perc) elektro-porlasztást. Kísérletekkel igazoltuk a különböző, gyógyszeripari szempontból fontos modell vegyületek eltérő ionizálhatóságát. Az ionszupresszió jelenségét vizsgálva megállapítottuk, hogy egy terápiás antitest esetében az elektrospray térfogatáramát 250 nl/percről 20 nl/percre csökkentve egy nagyságrenddel nő a tömegspektrometriás detektálás érzékenysége [11].

3.3. Emitter-tű nélküli mikrofluidikai interfészt fejlesztettünk ki kapilláris elektroforézis – elektrospray ionizációs tömegspektrométer kapcsoláshoz. Numerikus áramlástani szimulációk segítségével olyan új módon működő nano-porlasztót dolgoztunk ki, melyben a stabil elektrospray kialakításához nincsen szükség emitter-tűre, így mikrofluidikai eljárásokkal is egyszerűen és reprodukálható módon előállítható. Megállapítottuk, hogy a hangsebesség tartományában működő porlasztó 900 nL/perc térfogatáram mellet is képes gyakorlatilag fluktuáció mentes (szórás: 0,1%) elektrospray hosszú távú fenntartására [12].

4. Oligoszacharidok elektroforetikus migrációját tanulmányozva az ún. aktiválási energia elméleten keresztül bizonyítottuk, hogy a minta és a háttérelektrolit között kölcsönhatás alakul ki, melynek mértéke közvetlenül függ a malto-oligoszacharid molekula polimerizációs fokától és jelentős különbséget mutat hetes polimerizációs fok alatt és felett. Igazoltuk, hogy a lineáris maltooligoszacharidok, valamint az elágazó láncú komplex N-glikán szerkezetek glükóz egység értékei eltérő mértékben tolódnak el a hőmérsékletváltozás függvényében.

4.1. 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonáttal származékképzett, különböző polimerizációs fokú malto-oligoszacharid homológ sor elemeinek elválasztását vizsgáltuk az Arrhenius egyenletből számolt aktiválási energia értékek összehasonlításával. Kimutattuk, hogy a 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonáttal jelölt összetett szénhidrátok elektroforetikus mobilitása egyenesen arányos a moláris tömegük mínusz 2/3-ik hatványával. Megállapítottuk továbbá, hogy polietilén-oxidot az ún. összefonódási határkoncentráció felett tartalmazó háttérelektrolit esetében a jelölt oligoszacharidok méretének növekedésével csökken az elektromigráció aktiválási energiája, míg a polietilén-oxid határkoncentrációján az aktiválási energia gyakorlatilag független az oldott anyag (minta) méretétől [13, 14].

4.2. Lézer indukált fluoreszcens detektorral felszerelt kapilláris elektroforézis elválasztással vizsgáltuk a viszkozitás módosító és polimer adalékanyagok hatását a jelölt oligoszacharidok elektromigrációjára. Kimutattuk, hogy a malto-oligoszacharid molekulák elektromigrációjához - a hetes polimerizációs foknál megváltozott konformációjuk miatt – a molekulamérettől függő, eltérő aktiválási energia szükséglet kapcsolódik. A háttérelektrolitban 10% etilénglikolt, mint viszkozitás módosító adalékot, vagy 2% lineáris poliakrilamidot, mint polimer adalékot tartalmazó megegyező viszkozitású közegben vizsgálva a 2-7 polmerizációs fokú oligoszacharidok migrációját jelentős (72 és 212 J/mol) aktiválási energia szükséglet különbséget állapítottunk meg. A jelentős különbség oka, hogy a minta és a háttérelektrolit között kölcsönhatás alakul ki. 7-es polmerizációs fok felett a mért különbség nem jelentős (72 és 68 J/mol), ami arra utal, hogy zárt konformáció esetén a kölcsönhatás mértéke nem jelentős [14, 15].

5. N-glikánok kapilláris elektroforézis elválasztás alapú szerkezetmeghatározásához új glükóz egység számolási eljárást, szoftvert és különböző származékképző molekulákhoz tartozó adatbázisokat hoztunk létre.

5.1. A mintával együtt injektált három belső sztenderd segítségével számolt virtuális malto-oligoszacharid létrát alkalmazó glükóz egység számolási eljárást dolgoztunk ki. Ez az új eljárás szükségtelenné teszi az N-glikánok kapilláris elektroforézis elválasztás alapú megfelelő pontosságú szerkezetmeghatározásához minden minta analízis mellet szükséges malto-oligoszacharid homológ sor futtatását, amely így felére csökkenti a glikánok analízis idejét. A javasolt módszer megbízhatóságát humán immunglobulin G molekuláról enzimesen lehasított N-glikánok glükóz egység számolásán keresztül mutattuk be, ahol a relatív szórás 1,07%-nál kisebbnek adódott [16, 17] [IV].

5.2. N-glikánok glükóz egység értékének automatikus számolásához kifejlesztettünk egy új, publikusan elérhető alkalmazást, mely a beépített adatbázis segítségével képes javaslatot tenni az adott csúcshoz tartozó szénhidrát-oligomer szerkezetére vonatkozóan. A konvencionális – egy vagy két belső sztenderdet, mint a csúcseltolódás illesztésére szolgáló eljárást alkalmazó – megközelítésen alapuló glükóz egység számoló alkalmazást dolgoztunk ki és tettünk elérhetővé (https://gucal.hu/) különböző kapilláris elektroforézis rendszerekhez kapcsolódóan. Az alkalmazás adatbázisát harmonizáltuk az ún. GlycoStore gyűjteménnyel is, így ez jelenleg az egyik legtöbb bejegyzést tartalmazó N-glikán glükóz egység értéket tartalmazó forrás [18-21].

6. Tüdőbetegségekben előforduló N-glikán biomarkerek vizsgálatához dolgoztunk ki új mintaelőkészítési eljárásokat és kombináltuk azokat mestersége inteligencia alapú adatbányászati módszerekkel.

6.1 Gépi tanulást és lézer indukált fluoreszcens detektálású kapilláris elektroforézis elválasztást alkalmazó módszereket fejlesztettünk tüdőrákos betegek szérum mintáinak N-glikán profiljának elemzéséhez. Az új kombinált eljárás segítségével tizenhét, tüdődaganat eltávolító beavatkozáson átesett betegtől származó mintán igazoltuk, hogy a teljes szérum profilból kiválasztott huszonegy glikán, melyek relatív csúcs alatti területe nagyobb 1%-nál, mind különállóan mind szerkezeti alcsoportokba sorolva felismerhető korrelációt mutathatnak diszkrét és folytonos klinikai paraméterekkel. Az általunk meghatározott N-glikán panel – megfelelő validációt követően – alkalmas lehet a daganateltávolító műtét várható kimenetelének előrejelzésétre [22]. Továbbá, harminchárom tüdőrákos betegtől származó kilencvennyolc szérum minta vizsgálatával igazoltuk, hogy az N-glikán profil elemzése útján nagy pontossággal prediktálható a kezelésre használt kemoterápiás szer hatékonysága [23-25] [V].

6.2. Új mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki és optimalizáltunk annak részlépéseit tüdőrákban és / vagy krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő betegek szérum N-glikán profiljának nagyfelbontású meghatározásához. Hőmérséklet gradienst és megnövelt reakcióidőt alkalmaztunk a denaturáció minél nagyobb hozamú lejátszódtatásához. A teljes mintaelőkészítési protokoll egy napon belüli, illetve egymást követő napokon vizsgált reprodukálhatóságának hibája 3,5% alattinak adódott. Az új eljárás segítségével nagy betegszámú mintán (kilencven beteg csoportonként) vizsgáltuk egészséges, tüdőrákos, krónikus obstruktív tüdőbetegségben, illetve tüdőrákban és krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő betegek pool-ozott mintáinak N-glikán profilját. A profilban 61 különálló szerkezetet azonosítottunk és bizonyítottuk, hogy a vizsgált kórképek hatására új szerkezet egyik esetben sem jelent meg, csak mennyiségi változások váltak detektálhatóvá. Az új eljárás segítségével javaslatot tettünk egy 13 N-glikán szerkezetet tartalmazó glikobiomarker panelre, melynek elemei szignifikáns változást (legalább 33%-os különbség a relatív csúcsalatti területben) mutattak a vizsgált kórós és egészséges minták között [26].

7. Olyan kapilláris elektroforézis elválasztás alapú diagnosztikai módszert fejlesztettünk ki, mely alkalmas a humán vizeletben található prosztata specifikus antigén N-glikozilációs mintázatának különböző kórképek okozta megváltozásának detektálására. Az eljárás egydoménes antitestet alkalmaz a prosztata specifikus antigén vizeletből történő szelektív és nagyhozamú immunprecipitálásához, majd lézer indukált fluoreszcens detektálású kapilláris elektroforézis elválasztás segítségével elválasztja és detektálja az enzimatikus úton felszabadított N-glikán elegy komponenseit. Bizonyítottuk, hogy az új technológia alkalmas az α2,3- és α2,6-szialilált izomerek elválasztására, melyek más eltérések mellet a legfontosabb klinikai információt szolgáltatják [27] [VI].

8. **HMG-CoA-reduktáz gátlóval kezelt 2-es típusú diabéteszben szenvedő betegek vérszérum és teljesvér mintáit vizsgálva javaslatot tettünk egy N-glikán biomarker panelre, mely alkalmas lehet a betegség korai fázisú kimutatására.** Lézer indukált fluoreszcens detektálású kapilláris elektroforézis elválasztási módszert fejlesztettünk és optimáltunk, mellyel vizsgáltuk 21 személy (10 egészséges önkéntes és 11 2-es típusú diabéteszben szenvedő beteg) mintáinak N-glikán profilját. A profilok összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy az FA2G1S1 és A2BG2S1 glikán szerkezetek koncentrációja jelentős mértékben - 6,4 és 8,2-szeres - emelkedik 2-es típusú diabétesz esetében [28].

9. **Új elválasztási sémát dolgoztunk ki N-glikánok kapilláris elektroforézis elválasztásához, ami kihasználja a lúgos pH-n jelentkező jelentős mértékű elektroozmotikus áramlást, ami az adott elválasztási elrendezésben az elektromigrációval ellentétes irányú, és így lehetővé teszi, hogy a feleslegben alkalmazott APTS be se kerüljön a kapillárisba az elválasztás során.** Mérésekkel bizonyítottuk, hogy a konvencionálisan használt többlet festék eltávolítási lépések során bizonyos szénhidrát oligomerek elvesznek a mintából, azaz az egyes struktúrák relatív aránya megváltozik és így sérül a kémiai információtartalom. Az általunk javasolt új megközelítésnek köszönhetően nincs szükség a felesleges jelölő eltávolítására. Az új elválasztási sémához nem használható a klasszikus GU érték alapú szerkezetazonosítási megközelítés sem, ezért kidolgoztunk egyú GU érték számolási eljárást is, amely numerikus közelítés segítségével figyelembe veszi a rendszerben megjelenő elektroozmotikus áramlás hatását is [29-31] [VII, VIII].

3. Irodalomjegyzék

3.1. A megfogalmazott tézispontokhoz közvetlenül kapcsolódó saját közlemények

1. Shao, H., B. Reider, **G. Jarvas**, A. Guttman, Z. Jiang, N.T. Tran and M. Taverna, *On-line enrichment of N-glycans by immobilized metal-affinity monolith for capillary electrophoresis analysis.* Analytica Chimica Acta, 2020. **1134**: p. 1-9.
2. Bodnar, J., A. Szekrenyes, M. Szigeti, **G. Jarvas**, J. Krenkova, F. Foret and A. Guttman, *Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles.* Electrophoresis, 2016. **37**(10): p. 1264-1269.
3. Torok, R., A. Farkas, A. Guttman and **G. Jarvas**, *Evaluation of possible processing time effects on the global n-glycosylation profile of human blood samples.* Current Molecular Medicine, 2020. **20**(10): p. 840-846.
4. Mészáros, B., **G. Jarvas**, L. Hajba, M. Szigeti, A. Dallos and A. Guttman, *Quantitative characterization of plasma treated PDMS microfluidic substrates by inverse gas chromatography.* Sensors and Actuators, B: Chemical, 2018. **258**: p. 1184-1190.
5. **Jarvas, G.**, M. Szigeti, L. Hajba, P. Furjes and A. Guttman, *Computational fluid dynamics-based design of a microfabricated cell capture device.* Journal of Chromatographic Science, 2015. **53**(3): p. 411-416.
6. Szigeti, M., **G. Jarvas** and A. Guttman, *Design and modeling of microfluidic cell capture devices.* Chemicke Listy, 2013. **107**(3): p. s458-s459.
7. **Jarvas, G**., T. Varga, M. Szigeti, L. Hajba, P. Fürjes, I. Rajta and A. Guttman, *Tilted pillar array fabrication by the combination of proton beam writing and soft lithography for microfluidic cell capture Part 2: Image sequence analysis based evaluation and biological application.* Electrophoresis, 2018. **39**(3): p. 534-539.
8. **Jarvas, G**., D. Szerenyi, H. Jankovics, F. Vonderviszt, J. Tovari, L. Takacs, F. Foldes, B. Somogyi, F. Jakab and A. Guttman, *Microbead-based extracorporeal immuno-affinity virus capture: a feasibility study to address the SARS-CoV-2 pandemic.* Microchimica Acta, 2023. **190**(3).
9. **Jarvas, G**., D. Szerenyi, J. Tovari, L. Takacs and A. Guttman, *Modification of hemodialysis membranes for efficient circulating tumor cell capture for cancer therapy.* Molecules, 2021. **26**(16).
10. **Jarvas, G**., M. Szigeti and A. Guttman, *Effect of the flow profile on separation efficiency in pressure-assisted reversed-polarity capillary zone electrophoresis of anions: Simulation and experimental evaluation.* Journal of Separation Science, 2018. **41**(11): p. 2473-2478.
11. **Jarvas, G**., B. Fonslow, J.R.Y. Iii, F. Foret and A. Guttman, *Characterization of a porous nano-electrospray capillary emitter at ultra-low flow rates.* Journal of Chromatographic Science, 2017. **55**(1): p. 47-51.
12. **Jarvas, G**., J. Grym, F. Foret and A. Guttman, *Simulation-based design of a microfabricated pneumatic electrospray nebulizer.* Electrophoresis, 2015. **36**(3): p. 386-392.
13. **Jarvas, G.**, M. Kerekgyarto and A. Guttman, *On the electromigration of charged fluorophore-labeled oligosaccharides in polyethylene oxide solutions.* Electrophoresis, 2016. **37**(17-18): p. 2347-2351.
14. Guttman, A., M. Kerekgyarto and **G. Jarvas**, *Effect of Separation Temperature on Structure Specific Glycan Migration in Capillary Electrophoresis.* Analytical Chemistry, 2015. **87**(23): p. 11630-11634.

15. Kerékgyártó, M., **G. Jarvas**, L. Novák and A. Guttman, *Activation energy associated with the electromigration of oligosaccharides through viscosity modifier and polymeric additive containing background electrolytes.* Electrophoresis, 2016. **37**(4): p. 573-578.
16. **Jarvas, G**., M. Szigeti, J. Chapman and A. Guttman, *Triple-internal standard based glycan structural assignment method for capillary electrophoresis analysis of carbohydrates.* Analytical Chemistry, 2016. **88**(23): p. 11364-11367.
17. **Jarvas, G**., M. Szigeti, M.P. Campbell and A. Guttman, *Database search assisted N-glycan structure identification*, in *Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques*. 2021. p. 843-858.
18. **Jarvas, G**., M. Szigeti, M.P. Campbell and A. Guttman, *Expanding the capillary electrophoresis-based glucose unit database of the GUcal app.* Glycobiology, 2020. **30**(6): p. 362-364.
19. **Jarvas, G**., M. Szigeti and A. Guttman, *GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis.* Electrophoresis, 2015. **36**(24): p. 3094-3096.
20. **Jarvas, G**., M. Szigeti and A. Guttman, *Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial.* Journal of Proteomics, 2018. **171**: p. 107-115.
21. Filep, C., B. Borza, **G. Jarvas** and A. Guttman, *N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by multicapillary gel electrophoresis: Generation and application of a new glucose unit database.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020. **178**.
22. Mészáros, B., **G. Jarvas**, R. Kun, M. Szabó, E. Csánky, J. Abonyi and A. Guttman, *Machine learning based analysis of human serum n-glycome alterations to follow up lung tumor surgery.* Cancers, 2020. **12**(12): p. 1-13.
23. Torok, R., B. Meszaros, V. Gombas, A. Vathy-Fogarassy, M. Szabo, E. Csanky, **G. Jarvas** and A. Guttman, *Predicting the effectiveness of chemotherapy treatment in lung cancer utilizing artificial intelligence-supported serum N-glycome analysis.* Comput Biol Med, 2025. **186**: p. 109681.
24. Vathy-Fogarassy, A., V. Gombas, R. Torok, **G. Jarvas** and A. Guttman, *Improved analytical workflow towards machine learning supported N-glycomics-based biomarker discovery.* Talanta, 2025. **295**: p. 128389.
25. Gombas, V., R. Torok, M. Vitai, L. Koranyi, **G. Jarvas**, A. Guttman and A. Vathy-Fogarassy, *Classifying Type 2 Diabetes Using N-Glycan Profiling and Machine Learning Algorithms.* Stud Health Technol Inform, 2025. **324**: p. 84-89.
26. Mészáros, B., **G. Jarvas**, A. Farkas, M. Szigeti, Z. Kovács, R. Kun, M. Szabó, E. Csánky and A. Guttman, *Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis.* Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2020. **1137**.
27. Reider, B., E. Gacsi, H. Jankovics, F. Vonderviszt, T. Szarvas, A. Guttman and **G. Jarvas**, *Integrated workflow for urinary prostate specific antigen N-glycosylation analysis using sdAb partitioning and downstream capillary electrophoresis separation.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1184**.
28. Torok, R., K. Horompoly, M. Szigeti, A. Guttman, M. Vitai, L. Koranyi and **G. Jarvas**, *N-glycosylation profiling of human blood in type 2 diabetes by capillary electrophoresis: A preliminary study.* Molecules, 2021. **26**(21).
29. Farsang, R., A. Farkas, **G. Jarvas** and A. Guttman, *Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2024. **176**: p. 117762.

30. Farsang, R., K. Hogyor, **G. Jarvas** and A. Guttman, *Capillary Zone Electrophoresis of 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic Acid Labeled Carbohydrates with Online Electrokinetic Sample Cleanup.* Anal Chem, 2023. **95**(45): p. 16459-16464.
31. Farsang, R., **G. Jarvas** and A. Guttman, *Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans.* J Pharm Biomed Anal, 2024. **238**: p. 115812.

3.2. A megfogalmazott tézispontokhoz közvetlenül kapcsolódó szabadalmak és oltalmi igények

I. A. Guttman, **G. Jarvas**, M. Szigeti, Flow capture device and method for removing cells from blood, #WO2018020285A2
II. **G. Jarvas**, P. Stolk, J. Tovari, L. Takacs, A. Guttman, A high performance immuno-affinity based extracorporeal capture system, #WO2023242607A1
III. A. Guttman, **G. Jarvas**, M. Szigeti, Capillary electrophoresis combined with mass spectrometry, #HU1500200A2
IV. **G. Jarvas**, M. Szigeti, J. Chapman, A. Guttman, A Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary, #US11747271B2
V. **G. Jarvas**, A. Guttman, R. Torok, A. Vathy-Fogarassy, V. Gombas, Method for predicting the effectiveness of chemotherapy treatment, #WO2025238388A1
VI. **G. Jarvas**, B. Reider, H. Jankovics, F. Vonderviszt, A. Guttman, Integrated method for urinary prostate specific antigen N-glycosylation profiling by capillary electrophoresis, #WO2022263873A1
VII. **G. Jarvas**, R. Farsang, A. Guttman, Method for purification free capillary electrophoresis of labeled carbohydrates, #WO2025078849A1
VIII. **G. Jarvas**, R. Farsang, A. Guttman, Glucose unit determination based on a numeric virtual EOF marker search method, #WO2025141293A1