

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A triptofán és metabolitjainak célzott metabolomikai vizsgálata neurológiai kórképekben

Tömösi Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Janáky Tamás



**Orvosi Vegytani Intézet
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem**

Szeged

2022

BEVEZETÉS

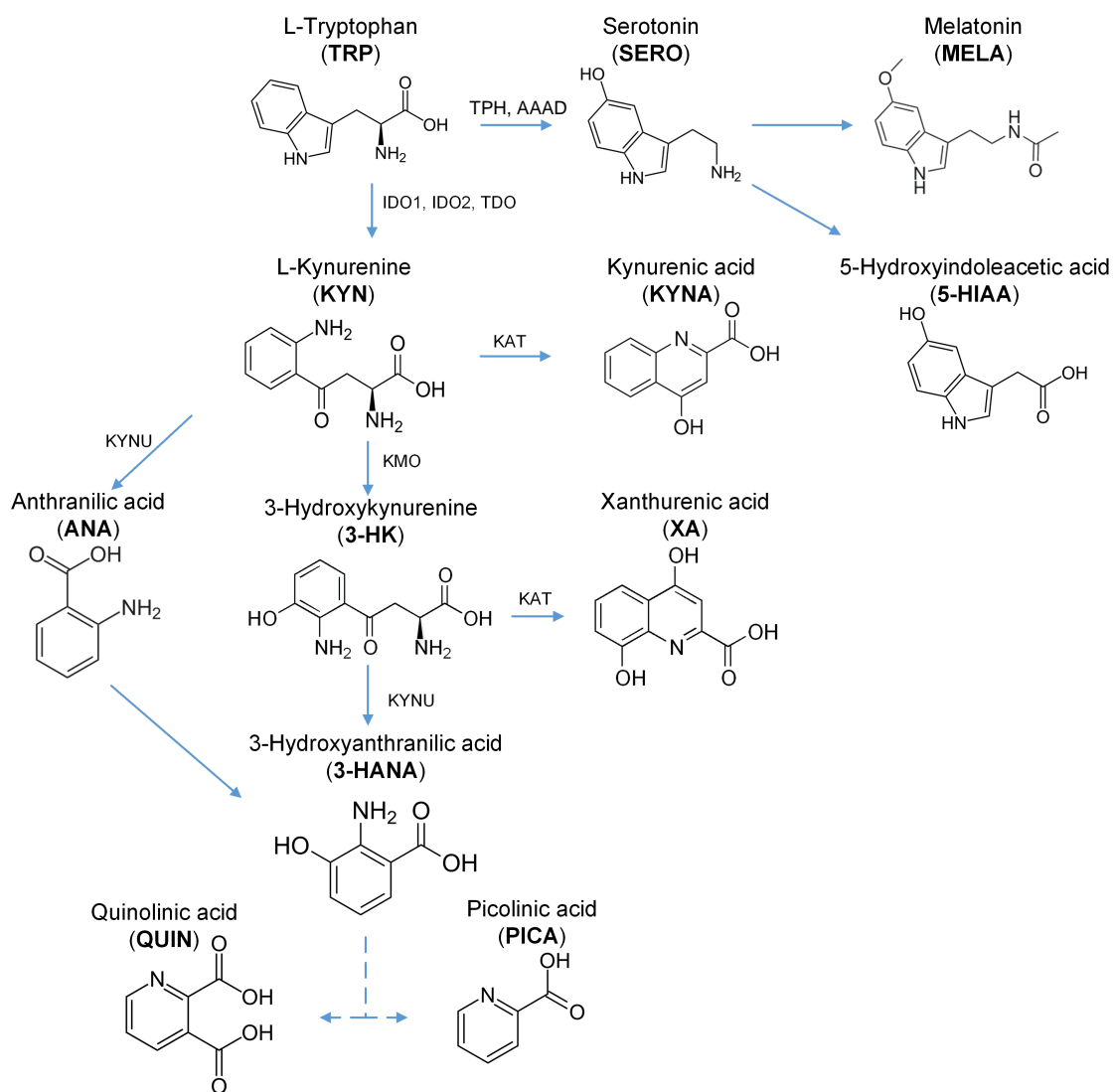
A metabolomika az élő szervezetben található kis (jellemzően <1000 Da) molekulák (metabolom v. metabolitok összessége) átfogó vizsgálata. A gyakorlatban a metabolomika jelentős analitikai kihívást jelent, mivel célja olyan vegyületek kvalitatív és kvantitatív meghatározása, amelyek fizikai-kémiai tulajdonságai nagyon eltérőek (például a polaritásuk a vízben jól oldódó szerves savaktól az apoláris lipidekig terjed). A metabolomikának két különálló ága van: a nem célzott (globális) és a célzott. A célzott metabolomikai vizsgálat a kémiaiailag karakterizált és biokémiaiilag meghatározott metabolitok meghatározott csoportjainak mennyiségi meghatározása. A célzott kutatás fő előnye az érzékenység. A belső standardok használatával a vizsgálat kvantitatív vagy félkvantitatív módon is elvégezhető. Ez a megközelítés lehetővé teszi számunkra, hogy átfogóan megértsük a metabolikus enzimek széles skáláját, kinetikáját, végtermékeit és az ismert biokémiai útvonalakat, amelyekhez hozzájárulnak.

Általánosságban elmondható, hogy a metabolomikai vizsgálatokat számos területen használják, így a gyógyszerkutatásban, metabolikus útvonalak igazolásában, betegség- és biomarker-kutatásban stb. A genom, transzkriptom, proteom és metabolom rendszerben a fenotípust leginkább a metabolom összetétele befolyásolja. A metabolom vizsgálatával értékes információk gyűjthetők a betegségek tényleges biomarkereiről (diagnosztikai, prognosztikai és prediktív), továbbá a metabolitok releváns indikátorai lehetnek a fiziológiás vagy kóros állapotoknak.

A triptofán (TRP) egy apoláris, aromás α -aminosav, ami a fehérjék bioszintézisében és számos anyagcsere-funkcióban játszik kritikus szerepet. A TRP-nek két fő metabolikus útja van. Az egyik a kinurenin (KYN) útvonal (KP), amely neuroprotektív és neurotoxikus vegyületeket egyaránt tartalmaz. Az idegsejteket védő vegyületek, például a kinurénsav (KYNA) és a pikolinsav (PICA), a szabad gyököt generáló 3-hidroxi-kinurenin (3-HK) és az excitotoxikus kvinolinsav (QUIN) koncentrációjának változását figyelték meg különböző neurológiai kórképekben, beleértve a sclerosis multiplexet is.

A TRP metabolizmusának másik útja a szerotonin (SERO) útvonal (SP), amely a SERO mellett az 5-hidroxi-indolecetsav (5-HIAA) és a melatonin (MELA) szintézisét foglalja magában (1. ábra). A SERO felelős a szorongásért, az agresszióért és a stresszért. A szerotonerg rendszer változásai jelentős szerepet játszanak a neurológiai betegségek és a neuropszichiátriai rendellenességek kórereditében. Úgy tűnik, hogy a SERO és metabolitjai a neurológiai

betegségek diagnosztikai és prognosztikai markereként, vagy a jövőben hatékonyabb neurológiai terápia célpontjaiként alkalmazhatók.



1. ábra: A triptofán metabolizmus egyszerűsített útvonalai, jelezve a főbb enzimeket: triptofán-5-hidroxiláz (TPH), aromás L-aminosav-dekarboxiláz (AAAD), indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO), kinurenin-aminotranszferáz (KAT), kinurenináz (KYNU) és kinurenin-3-monooxygenáz (KMO)

CÉLKITŰZÉSEK

Az orvostudományban elengedhetetlen, hogy a különböző mintákból a lehető legnagyobb pontossággal meg lehessen határozni egy adott vegyületet, mivel a beteg diagnózisakor vagy a betegség lefolyásának nyomon követésekor a hamis eredmények félrevezetőek és elfogadhatatlanok. A metabolom vizsgálati módszerei közül a tömegspektrometriával kapcsolt folyadékkromatográfia (LC-MS) a(z egyik) legkorszerűbb eljárás, melynek alkalmazásával nagyszámú analitot lehet egyidejűleg és pontosan meghatározni. Számos metabolit nagyon alacsony koncentrációban van jelen a biológiai mintákban, ezért a mintaelőkészítés, a kromatográfia és a tömegspektrometria megfelelő koordinációja és optimalizálása elengedhetetlen és nagy kihívást jelent.

A dolgozatban bemutatott kutatások közvetlen céljai a következők voltak:

- I.** Egy új, robusztus ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás (UHPLC-MS/MS) módszer kifejlesztése, amellyel a TRP és 11 legfontosabb metabolitjának (köztük a ritkán vizsgált PICA és QUIN) koncentrációja három különböző humán testfolyadékban (mátrixban) meghatározható:
 - a,** agy-gerincvelői folyadék (CSF)
 - b,** vérérum
 - c,** vérplazma.
- II.** A célnak legmegfelelőbb, optimalizált körülmények meghatározása a komplex minták komponenseinek gyors, érzékeny, precíz és reprodukálható kromatográfiás elválasztásához; a módszerek fejlesztésére fordított idő és az erőforrások minimalizálása a DryLab®4 szoftver segítségével.
- III.** A kifejlesztett módszer validálása a Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (ICH) és az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) ajánlásainak figyelembevételével: a szelektivitás, linearitás, kimutatási határ (LOD), mennyiségi meghatározási határ (LOQ), precizitás, pontosság és visszanyerés meghatározása.
- IV.** A kidolgozott módszer alkalmazása neurológiai betegségek diagnosztikájában.
 - a,** A sclerosis multiplex feltételezett biomarkereinek felfedezése.
 - b,** A TRP metabolit profil változásainak feltárása migrénben.

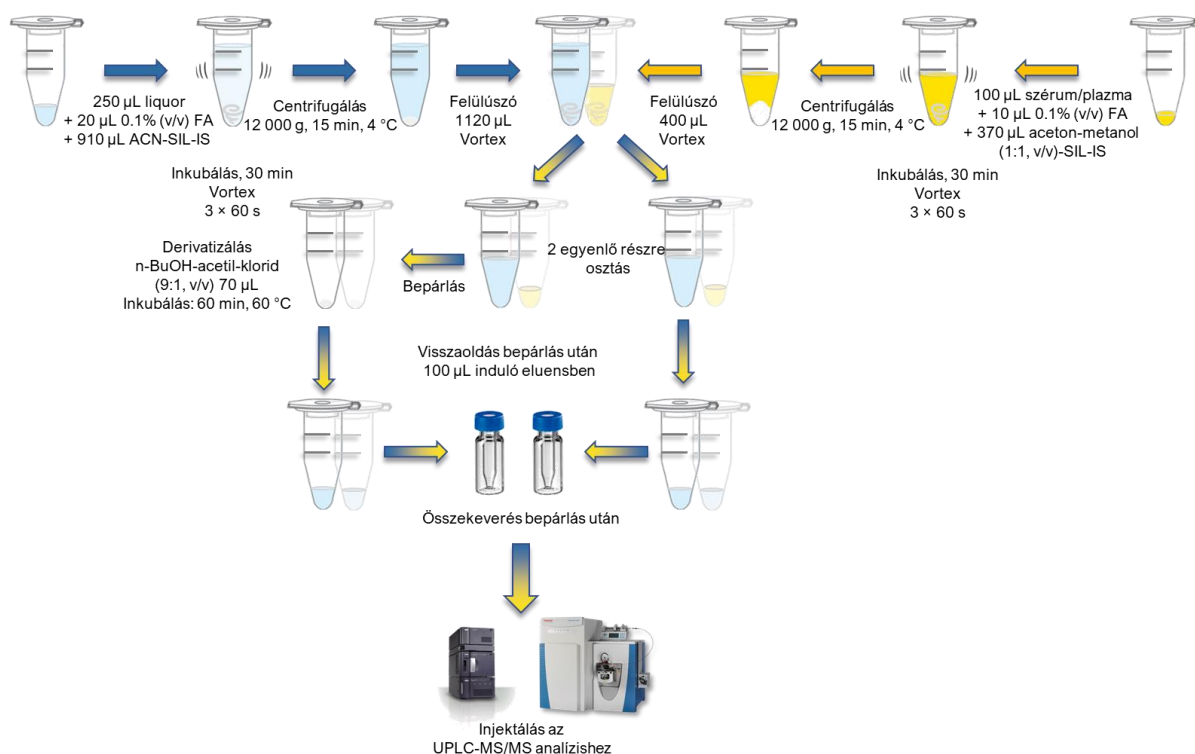
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A sclerosis multiplex vizsgálatba bevont nők lumbálpunkciója és vérmintavétele a Szegedi Tudományegyetem Neurológiai Klinikáján történt. A humán vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem helyi Etikai Bizottsága engedélyezte (46/2014 és 143/2015), és a vizsgálati protokoll megfelelt a legutóbb felülvizsgált humán kísérletekre vonatkozó Helsinki Nyilatkozat alapelveinek. A vizsgálatba bevont összes alany önkéntes, írásos tájékoztatáson alapuló beleegyezését adta. A sclerosis multiplexben szenvedő csoport 20, a kontrollcsoport 14 személyből állt.

A migrénnel kapcsolatos kutatásba bevont összes beteget járóbetegként kezelték a Neurológiai Klinikán. A vizsgálatok a Szegedi Tudományegyetem helyi Etikai Bizottságának (87/2009) és a Nemzeti Népegészségügyi Központ Egészségügyi Szakigazgatási Szervezetének (29022-5/2019/EÜIG, 28324-5/2019/EÜIG) jóváhagyását követően zajlottak. A vizsgálatban ötven epizodikus migrénes beteg és 34 egészséges kontroll egyén vett részt. Az 50 migrénes beteg közül 47 esetben került sor mintavételre a betegség interiktális (rohammentes) szakaszában és 12 esetben az iktális fázisában.

Mintaelőkészítés

A TRP és metabolitjainak (SERO, KYN, 3-hidroxiantranilsav (3-HANA), 5-HIAA, antranilsav (ANA), KYNA, 3-HK, xanturénsav (XA), MELA, PICA és QUIN) CSF-ben, szérumban és plazmamintában történő meghatározásához a 12 analit keverékének mesterséges CSF-hez, vagy „üres” szérumban/plazmához történő adásával 12 koncentrációsinten kalibrációs standardokat és három szinten minőség-ellenőrző (QC) mintákat (alacsony [LQC], közepes [MQC] és magas [HQC]) készítettünk. A CSF mintákat acetonnitril (ACN), míg a szérumban vagy plazmamintákat aceton-metanol (MeOH) keverékével (1:1, v/v) fehérjementesítettük. A fehérjekicsapáshoz használt oldószerek tartalmazták az egyes analitok stabil izotóppal jelölt változatát is (belső standard, SIL-IS): d4-SERO, d4-KYN, d3-3-HANA, d5-TRP, d5-5-HIAA, d5-KYNA, d3-3-HK, d4-XA, d4-MELA, d4-PICA és d3-QUIN. Egyes vizsgált vegyületek kedvezőtlen kromatográfiás viselkedésének kiküszöbölése érdekében a karboxilcsoportot tartalmazó TRP metabolitokat különböző alifás alkoholokkal észterestítettük (származékképzés) (2. ábra).



2. ábra: A humán CSF-, szérum- és plazmaminták mintaelőkészítésének folyamatábrája

Kromatográfia

A TRP és 11 metabolitjának kromatográfiás elválasztását ACQUITY I-Class UPLC™ folyadékkromatográfiás rendszeren (Waters, Manchester, Egyesült Királyság) végeztük. Az elválasztási paramétereket DryLab®4 szoftverrel (Molnár-Institute, Berlin, Németország) optimalizáltuk. A klinikai mintákat pentafluorofenil (PFP) oszlopon (Phenomenex, 100 Å, 100 mm × 2,1 mm, részecskeméret 2,6 µm) vizsgáltuk, A eluensként 0,1% (v/v) hangyasavat (FA), B eluensként 0,1% (v/v) FA-t tartalmazó MeOH-t használva, 25 °C-on. A végső gradiens a következőképpen alakult: 0,0 perc, 10% B; 1,0 perc, 30% B; 3,0 perc, 50% B; 3,5 perc, 90% B; 5,0 perc, 90% B; 5,1 perc, 10% B; és 7 perc 10% B. Az áramlási sebesség minden analízis esetén 300 µL/perc volt. A mintákból 20 µL-t injektáltunk az UPLC–MS/MS rendszerbe.

Tömegspektrometria

A kvantitatív mennyiségi meghatározást egy Q-Exactive™ Plus hibrid kvadrapól-Orbitrap™ tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) végeztük, amely online volt csatlakoztatva az ACQUITY I-Class UPLC™ folyadékkromatográfhoz. A HESI-II elektroporlasztásos (electrospray) ionforrással felszerelt tömegspektrométert pozitív ion üzemmódban a következő paraméterekkel működtettük: kapilláris hőmérséklet: 256°C; spray feszültség: 3,5 kV; segédgáz hőmérséklet: 406°C; köpenygáz áramlás: 48; segédgáz áramlás: 11; seprőgáz áramlás: 2; és S-lencse RF szintje: 50.0 (az ionforrás automatikus beállításai). A teljes adatgyűjtés 50-300 m/z tömegtartományban és 17 500-as felbontással történt. Az automatikus erősítésszabályozás (AGC) beállítása 3×10^6 töltés, a maximális befecskendezési idő pedig 60 ms volt.

A TRP és metabolitjainak MS/MS-el történő meghatározásához a párhuzamos reakció-monitorozás (PRM) adatgyűjtési módot választottuk. A mennyiségi meghatározáshoz a legjobb prekursor/termék átmenet elérése és az érzékenység maximalizálása érdekében meghatároztuk az egyes analitok optimális ütközési energiáit.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

1. A mintaelőkészítés optimalizálása

Az érzékenység javítása érdekében a mintákban jelen lévő fehérjét el kellett távolítani. Előkísérleteinkben a humán szérum fehérjéinek kicsapására 3-5-szörös térfogatú MeOH-t, ACN-t, aceton-MeOH-t (3:7 és 1:1 arányban, v/v) használtunk, míg a CSF fehérjéinek eltávolítására MeOH-t és ACN-t alkalmaztunk. A fehérjementesítés során követtük a TRP és metabolitjainak visszanyerését. A 3-HANA-t nem lehetett megfelelően meghatározni MeOH használatával sem szérum-, sem CSF-mintákban. CSF minták esetében a legjobb eredményt és a legmagasabb visszanyerést háromszoros térfogatú ACN alkalmazásával érték el, míg szérum minták esetén a háromszoros térfogatú aceton-MeOH (1:1, v/v) használata bizonyult a leghatékonyabbnak.

A TRP és metabolitjainak észterképzését a reakció oldószerének (MeOH, etanol, n-propanol és n-butanol (n-BuOH)), ill. a reakció idejének (0, 20, 30, 40, 50 és 60, n = 3) vizsgálatával optimalizáltuk. A hosszabb hidrofób alifás láncok miatt a butilezett termékek mutatták a legnagyobb retenciót a fordított fázisú oszlopon, és az észteresített és nem észteresített komponensek koelúciója nem volt tapasztalható. Bár az észteresítés 60 perc elteltével nem minden komponensnél teljes (74–95%), a célanalittal közel azonos kémiai és fizikai tulajdonságokkal rendelkező SIL-IS jelenléte miatt a módszer megbízhatóan alkalmazható volt. Bár a válasz módosulhat, az analit és az IS csúcsterület aránya nem változik, így a módszer pontos, precíz és robusztus lesz.

A n-butanollal történt észteresítés megváltoztatta a molekulák polaritását, így kromatogramon a 3-HK, a PICA és a QUIN kellően visszatartott, kiváló alakú csúcsok formájában jelenik meg.

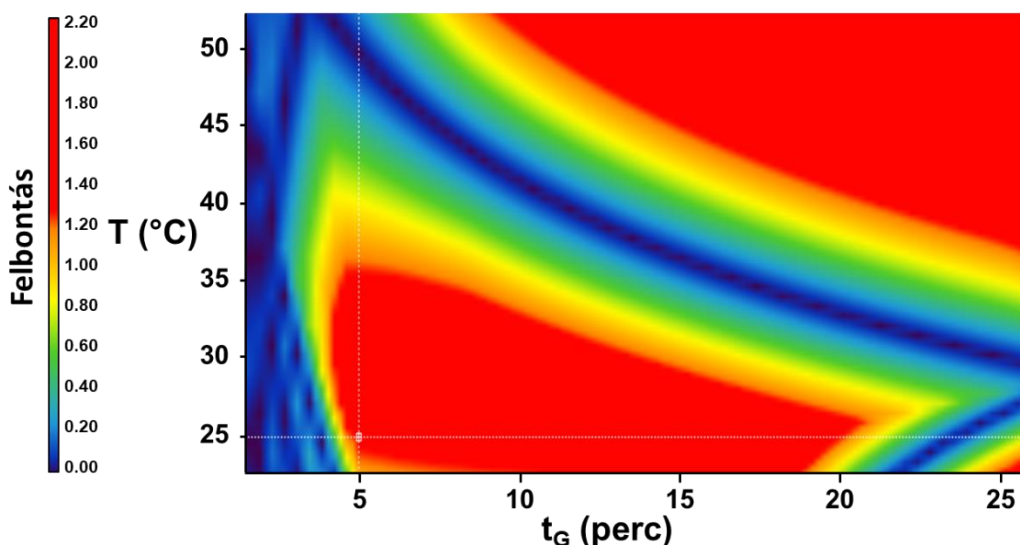
2. Az UHPLC módszer tervezése, fejlesztése és optimalizálása

A kromatográfiás módszer fejlesztésének első szakasza az analitok elválasztására alkalmazott legígéretesebb típusú oszlop, a szerves eluens és a mozgófázis pH-jának megválasztása. A legmegfelelőbb oszlop és szerves oldószer felderítéséhez két kezdeti kísérletet hajtottunk végre 13 oszlop használatával, MS-kompatibilis általános gradiens elúciót alkalmazva. A „legjobb” oszlopot és a szerves eluent a kapott kromatogramok vizuális összehasonlításával választottuk ki, figyelembe véve a csúcsalakokat, az erősen poláris vegyületek visszatartását és az analitok legrövidebb időn belüli alapvonal elválasztását.

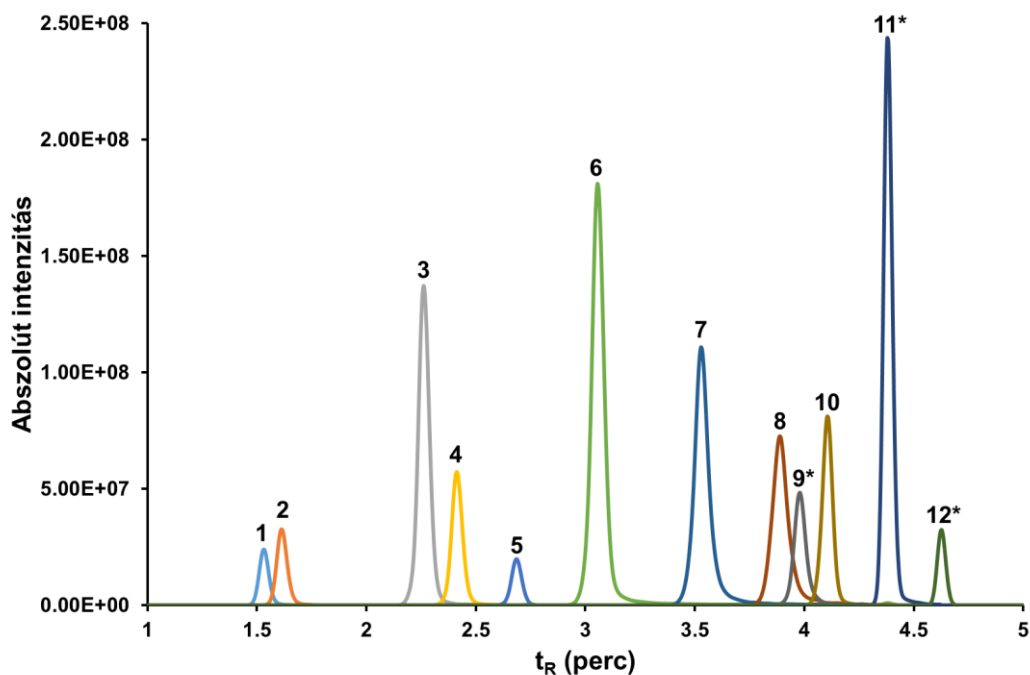
A TRP és 11 metabolitja elválasztásának optimalizálása érdekében az előzőekben kiválasztott Kinetex PFP oszlopon négy kezdeti lineáris gradiens kromatográfiás futtatást végeztünk szerves eluensként MeOH-t használva, hogy teszteljük a gradiens meredekségének/ t_G ($t_{G1} = 5$ perc és $t_{G2} = 15$ perc) és az oszlophőmérsékletének ($T_1 = 25^\circ\text{C}$ és $T_2 = 50^\circ\text{C}$) hatását a retenció időkre és a felbontásra. A kapott kromatogramok alapján a DryLab[®]4 szoftverrel szimulációt végeztünk, melynek eredménye egy kétdimenziós, színekódolt felbontási térkép, amely a kritikus felbontást ábrázolja a t_G és oszlophőmérséklet függvényében (3. ábra).

A legjobb elválasztást négy lineáris szegmensből álló gradienssel értük el: 0–1 perc, 10–30% B; 1–3 perc, 30–50% B; 3–3,5 perc, 50–90% B; és 3,5–5 perc, 90% B. A prediktált retenció időket kísérletileg igazoltuk a kiválasztott paraméterek segítségével (4. ábra).

Legjobb ismereteink szerint ez az első olyan kutatás, amely a DryLab[®]4 szoftvert alkalmazza az endogén multianalit-tartalmú biológiai minták LC/MS analízisének optimalizálására.



3. ábra: A DryLab felbontási térképe a választott paraméterekkel ($t_G = 5$ perc, $T = 25^\circ\text{C}$).



4. ábra: A mért analitok visszanyert ionkromatogramja: SERO (1), KYN (2), 3-HANA (3), TRP (4), 5-HIAA (5), ANA (6), KYNA (7), XA (8), 3-HK (9*), MELA (10), PICA (11*), QUIN (12*). *, a derivatizált analitokat jelöli.

5. A kidolgozott módszer validálása

Az összes analit esetében a kalibrációs görbék r^2 értéke meghaladta a 0,99-et. Az LOD-k 2,7 nM alattiak, az LOQ-k kisebbek, mint 8,3 nM az összes metabolit esetében, kivéve a SERO-t és a QUIN-t (LOD: 9,8 és 6,8, LOQ: 29,6 és 20,6 nM).

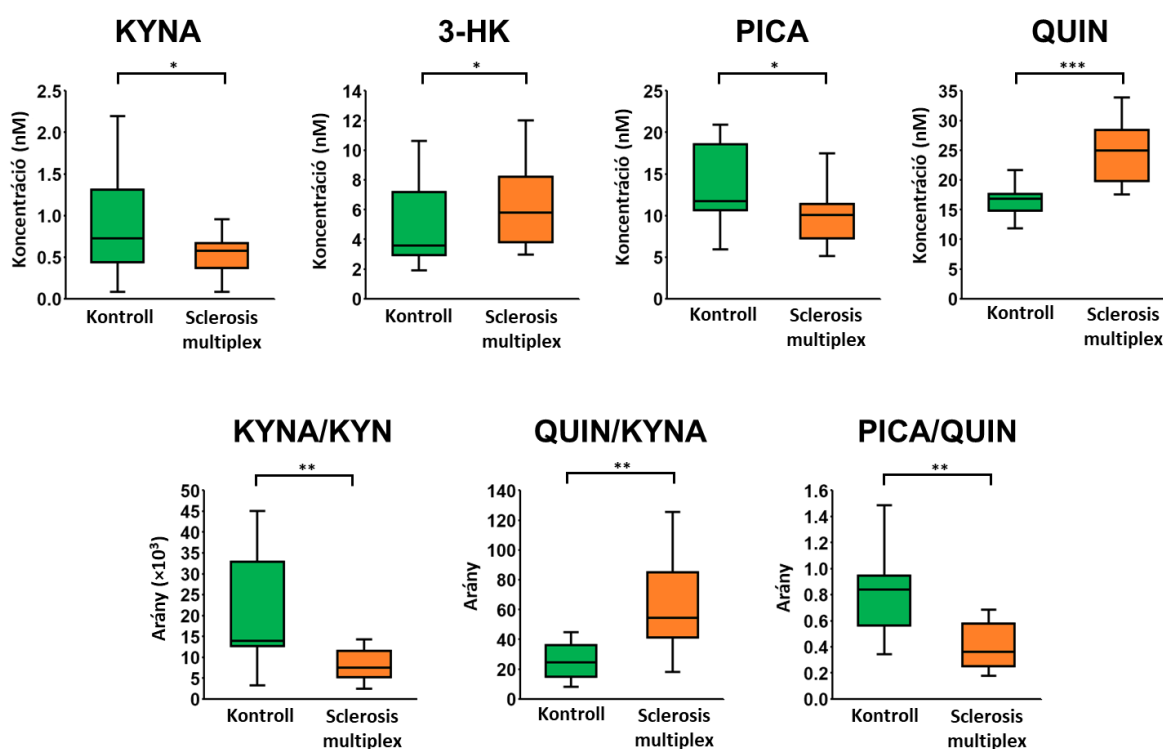
A módszer napon belüli és napok közötti ismételhetőségét (precizitását) (RSD) a három mátrix esetében három QC szint öt ismétlésével vizsgáltuk meg, három egymást követő napon. Az eredmények alapján a kidolgozott módszer megbízható precizitású.

A pontosság aCSF-ben 86,7 és 112,0% között változott a napon belüli és napok közötti mérések során, 89,1 és 107,7% között az „üres” szérumban és 85,1 és 114,8% közötti értékeket mutatott az „üres” plazmában. Az értékek az irányadó intervallumokon belül vannak.

Az analitok koncentrációjának meghatározásához egy egyszerű fehérjekicsapási módszert választottunk. A visszanyerést három különböző koncentrációsinten határoztuk meg annak bizonyítására, hogy az egyes metabolitok visszanyerése koncentrációfüggetlen, reprodukálható és konzisztens. Az analitok visszanyerése 93,8 és 105,3% között mozgott az aCSF esetében, 84,7 és 109,4% között az „üres” szérumban és 90,3 és 101,8% között az „üres” plazmában. Értékeink a hivatalos irányelvek által javasolt tartományban vannak.

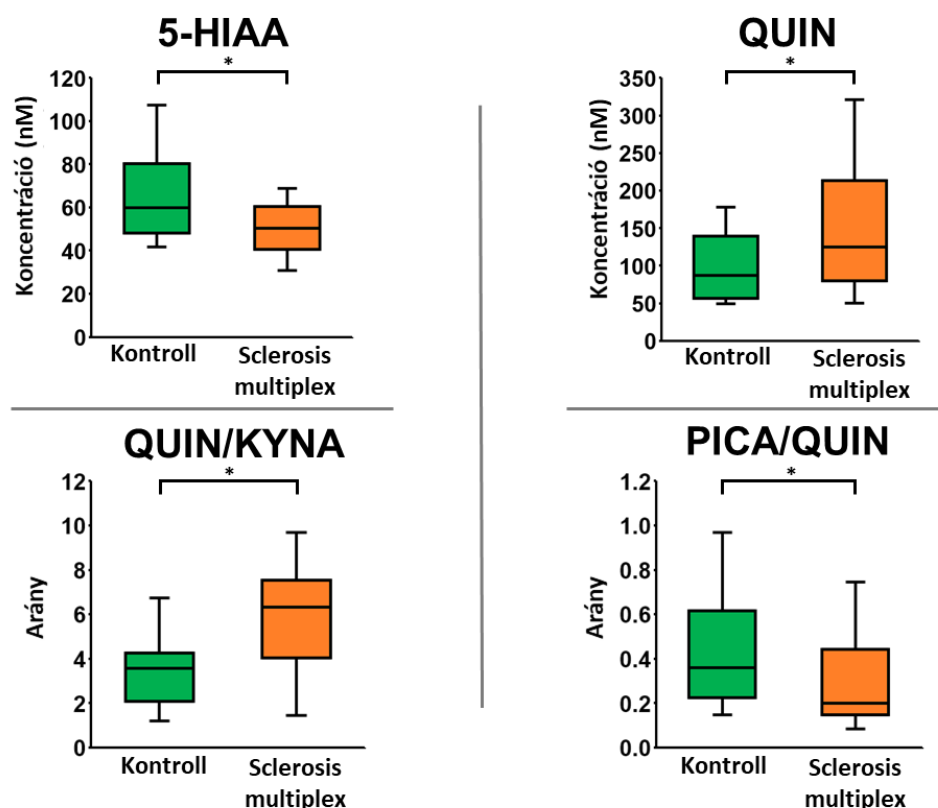
6. A TRP és metabolitprofiljának változásai sclerosis multiplexben

Eredményeink szerint –melyek jól egyeznek az irodalmi adatokkal– a QUIN által kiváltott excitotoxikus hatásokat a KYNA szintjének változása ellensúlyozhatja. A betegséggel összefüggésben a QUIN mennyisége drámaian megemelkedett mind a CSF-ben, mind a szérumban, míg a KYNA szintje enyhén csökkent. Ez szignifikánsan magasabb QUIN/KYNA arányt eredményezett a sclerosis multiplexben szenvedő betegekben, mint a kontroll csoportban (5. és 6. ábrák). A QUIN/KYNA arány az excitotoxikus potenciált tükrözi, mivel arányuk növekedésével az excitotoxicitás egyre inkább jellemző. Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézist, hogy az excitotoxikus TRP metabolitok sclerosis multiplexben neurodegenerációt okozhatnak.



4. ábra: Boxplot diagramok, melyek a kontroll és a sclerosis multiplex csoportok közötti szignifikáns változásokat mutatják CSF-ben, a KYNA, 3-HK, PICA, QUIN, KYNA/KYN, QUIN/KYNA és PICA/QUIN értékeit vizsgálva.

A szignifikanciavizsgálat kétmintás t-próbával vagy kétmintás Wilcoxon-teszttel történt az F-próba után: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



5. ábra: Boxplot diagramok, melyek a kontroll és a sclerosis multiplex csoportok közötti szignifikáns változásokat mutatják szérumban, az 5-HIAA, QUIN, QUIN/KYNA, és PICA/QUIN értékeit vizsgálva.

A szignifikanciavizsgálat kétmintás t-próbával vagy kétmintás Wilcoxon-tesztel történt az F-próba után: * $p < 0.05$

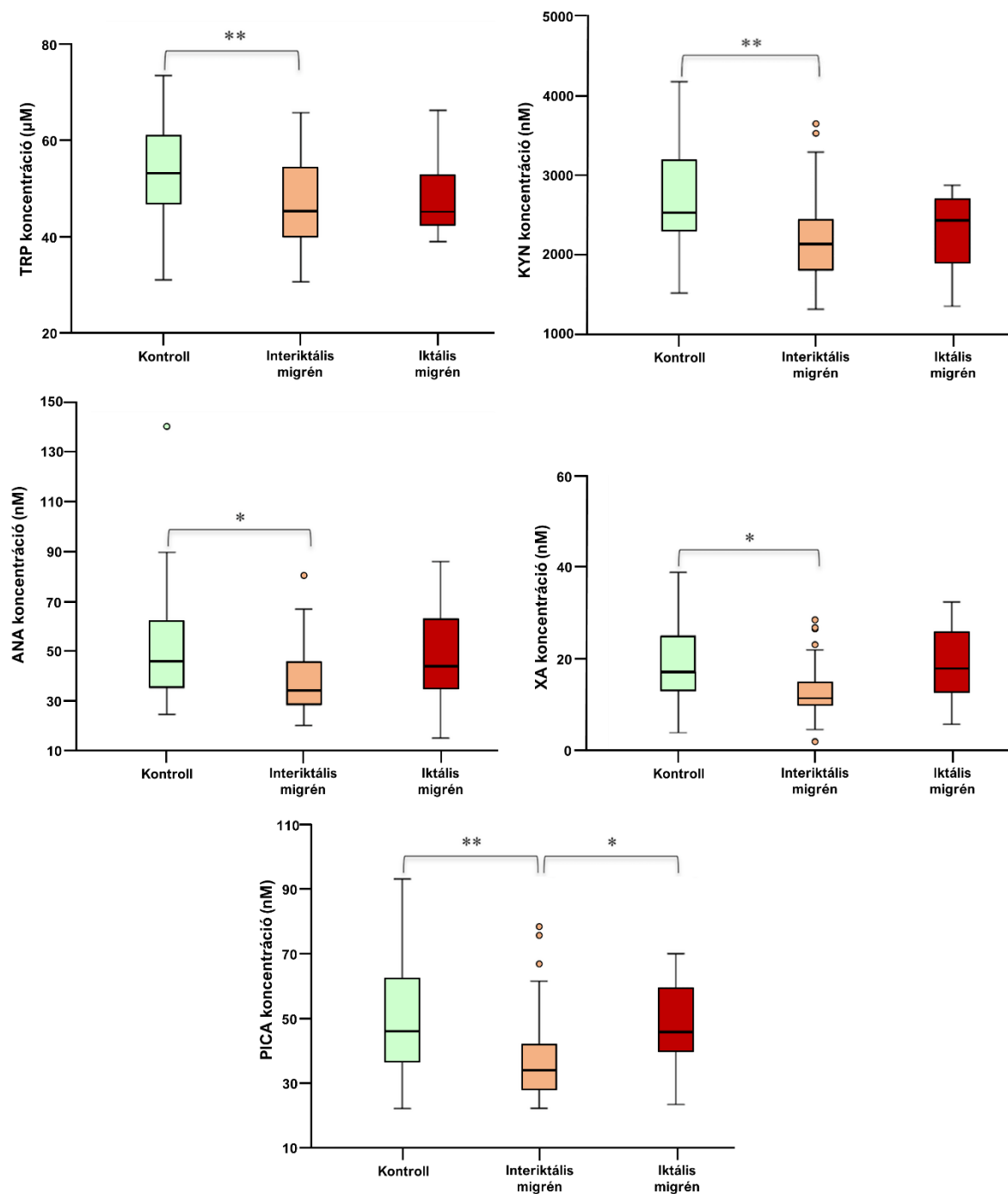
A KYNA/KYN arány, ami a kinurenin aминotranszferáz (KAT) enzimaktivitás potenciális helyettesítő markere, a sclerosis multiplexben szenvedő betegekben a kontrollokhoz képest csökken. Ez összhangban áll a KP neuroprotektív ágának a metabolizmusának visszaszorulásával, amely jelenséget más betegségekkel kapcsolatban is leírtak. Ezenkívül a sclerosis multiplexben szenvedő betegeknél megnövekedett PICA/QUIN arány a neuroprotektív PICA azon képességének eredménye lehet, hogy ellensúlyozza a QUIN neurotoxicitását, vagy a betegség gyulladásos folyamatait reprezentálja.

A CSF-mintákban a 3-HK koncentrációja szignifikánsan megemelkedett, ami nem meglepő, mivel a neurotoxikus metabolitról ismert, hogy fokozza a QUIN által kiváltott excitotoxicitást. Ezen kívül a QUIN részt vesz a neurofilamentumok, az axonok szerkezeti komponenseinek foszforilációjában. A neurofilamentumok megnövekedett szintje a CSF-ben és a sclerosis multiplexben szenvedő betegek szérumban a neuroaxonális károsodás mértékét tükrözi, amint azt a korábbi vizsgálatokban leírták.

6. A TRP metabolit profil változásai migrénben

A TRP, a SERO és a MELA jelentőségét már leírták migrénben, azonban a KP korlátozott figyelmet kapott eddig a humán vizsgálatokban. A KP a TRP katabolizmusának fő ága (95%), és számos metabolitja különféle fájdalommal kapcsolatos mechanizmusokra lehet hatással, beleértve a glutamát által közvetített neurotranszmissziót, immunológiai vagy antioxidáns folyamatokat. A TRP metabolizmus különböző útjainak egyidejű vizsgálata közelebb vihet bennünket a migrénre jellemző metabolikus változásokhoz.

Eredményeink azt mutatják, hogy a migrénben szenvedőknél a teljes metabolikus útvonal (a SERO kivételével) csökkent az interiktális (rohammentes) periódusban, de az iktális fázisban a metabolitszintek emelkedésének tendenciája figyelhető meg. Szignifikánsan alacsonyabb metabolitok (TRP, KYN, ANA, XA és PICA) plazmakoncentrációját mutattuk ki a migrénes betegek interiktális fázisban levett mintáiban ($n = 38$), az egészséges kontrollcsoporthoz ($n = 34$) képest (7. ábra). A MELA hasonló tendenciát mutatott, de nem érte el a statisztikai szignifikanciát ($n_{\text{kontroll}} = 30$ vs. $n_{\text{interiktális}} = 37$ vs. $n_{\text{iktális}} = 10$), és a koncentrációk LOQ alattiak. A migrénes betegek iktális fázisában ($n = 12$) a TRP metabolitszintek emelkedésének tendenciája volt kimutatható a rohammentes időszakhoz képest, de csak a PICA koncentrációi tértek el szignifikánsan ($34,9 \pm 13,7$ vs. $46,0 \pm 24,4$; $p < 0,049$). A SERO szintje ellentétes eltéréseket mutatott a kontrollok ($n = 17$) és a betegek ($n_{\text{interiktális}} = 25$, $n_{\text{iktális}} = 8$) között a többi metabolithoz képest, de a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. A statisztikai problémák elkerülése érdekében ebből a vizsgálatból kizártuk 10 migrénes beteg interiktális adatait, akiknek plazmamintáját mindkét időszakból gyűjtöttük.



7. ábra: A TRP, KYN, ANA, XA és PICA plazmában mért koncentrációi a kontroll- és migrénben szenvedő csoportban, az interiktális/iktális fázisban (az ábrán a medián, az interkvartilis tartomány, a minimum, maximum értékek és a kiugró értékek láthatók).

Alanyok száma: egészséges kontroll (n = 34), migrén - interiktális fázis (n = 38), migrén - iktális fázis (n = 12). Szignifikancia szintek: * p < 0,05, ** p < 0,01.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

- I. UHPLC–MS/MS módszert terveztünk a TRP és metabolizmusának két útvonalán (KP és SP) szereplő 11 legfontosabb metabolitjának egyidejű mennyiségi meghatározására humán liquorban, szérumban és plazmában. Bár három metabolitot (3-HK, PICA és QUIN) derivatizált formában vizsgáltunk, ezeket kilenc, nem származékképzett metabolittal együtt, egyetlen futtatásban elemeztük.
- II. A kromatográfiás elválasztást négy tesztfuttatás adatainak alkalmazásával DryLab®4 szoftverrel *in silico* optimalizáltuk. A gradiens összetételének, alakjának és idejének, ill. az oszlophőmérsékletnek hosszas manuális optimalizálása helyett a szoftverrel mindezt gyorsan elvégeztük. A 12 analitot 3,5 perces kromatográfiás időablakban elválasztottuk és a komponensek retenciós idejei jól egyeztek a szoftver által „jósolt” értékekkel.
- III. Az új módszer validálása során vizsgált paraméterek (szelektivitás, linearitás, LOD és LOQ, , precizitás, pontosság és visszanyerés) értékei az ICH és az FDA által támasztott elfogadási tartományokon belül voltak.
- IV. Eredményeink azt mutatják, hogy a TRP és metabolitjai a sclerosis multiplex diagnosztikai markereiként szolgálhatnak, mivel a sclerosis multiplexben szenvedő betegekben meghatározott KYNA/KYN, PICA/QUIN és QUIN/KYNA arányok szignifikánsan eltérnek a kontroll csoportban mért értékektől.
A migrénes betegekben meghatározott TRP metabolitok koncentráció-szintjeinek vizsgálatából levonható, hogy a betegség interiktális periódusában a TRP és katabolikus termékeinek szintje (a SERO kivételével) csökkent, azonban az iktális fázisban eléri a kontroll betegeknél mért értékeket. Mivel a migrén többtényezős betegség, a terápiás stratégiák javítása érdekében előnyös lehet több figyelmet fordítani az összetett metabolikus útvonalakra.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezen kutatások és eredmények nem jöhettek volna létre azon kutatók, családtagok és barátok nélkül, akik támogattak az út során.

Szeretném megragadni az alkalmat és köszönetet mondani Dr. Tóth Gábor professzor úrnak és Dr. Martinek Tamás professzor úrnak, hogy lehetővé tették számomra, hogy tudományos kutatási tevékenységet végezhsek a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében.

Hálás vagyok két mélyen tisztelt professzornak. Először is témavezetőmnek, Janáky Tamás professzor úrnak, az évek során nyújtott útmutatásért, támogatásért, bátorításért és a hasznos szakmai tanácsokért. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Vécsei László professzor úrnak, hogy részt vehettem a kinureninekkal kapcsolatos kutatásokban.

Köszönettel tartozom barátomnak, Bruszel Bellának is, aki projektmunkára hívott az Omikai Kutatócsoportba, majd pedig a szegedi gasztronómia megismertetésével tartotta bennem a lelket a nehezebb napokon.

Ezúton is szeretném megköszönni Kecskeméti Gábornak a mintaelőkészítésben és módszerfejlesztésben nyújtott segítségét. Izgalmas volt együtt felfedezni a bioanalitika érdekes és izgalmas világát. Köszönettel tartozom Dr. Ábrahámné Szendrei Ritának is, aki kezdetekben segített megszokni az új környezetet, valamint segített a mintaelőkészítésben is. Köszönöm Szabó Zolának és Kele Zolinak a humort, a vidám hangulatot és a tömegspektrometriával kapcsolatos hasznos ötleteket, tanácsokat, megoldásokat.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Berkecz Róbertnek, aki megmutatta nekem az analitika rejtett szépségeit és Körmöczy Tímeának.

Köszönettel tartozom továbbá az Orvosi Vegytani Intézet és a Neurológiai Klinika munkatársainak, különösen Dr. Cseh Edinának és Dr. Tuka Bernadettnek a sikeres együttműködésért és segítségért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném kifejezni szeretetemet és hálámat újkígyósi és szegedi családjaimnak és barátaimnak feltétlen támogatásukért, szeretetükért, megértésükért és biztatásukért.

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani minden anyagi támogatásért, amelyet a következő pályázatok biztosítottak: GINOP-2.3.2-15-2016-00034, GINOP-2.3.2-15-2016-00060, EFOP-3.6.1-16-2016-00008, és TKP2020.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A doktori értekezés alapját képező tudományos publikációk:

- I. Ferenc Tömösi**, Gábor Kecskeméti, Edina Katalin Cseh, Elza Szabó, Cecília Rajda, Róbert Kormány, Zoltán Szabó, László Vécsei, Tamás Janáky

A validated UHPLC-MS method for tryptophan metabolites: Application in the diagnosis of multiple sclerosis

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 185, 113246 (2020)

IF₂₀₂₀: 3.935

- II.** Bernadett Tuka, Aliz Nyári, Edina Katalin Cseh, Tamás Körtési, Dániel Veréb, **Ferenc Tömösi**, Gábor Kecskeméti, Tamás Janáky, János Tajti, László Vécsei

Clinical relevance of depressed kynurenine pathway in episodic migraine patients: potential prognostic markers in the peripheral plasma during the interictal period

The Journal of Headache and Pain, 22(1), 60 (2021)

IF₂₀₂₀: 7.277

A doktori értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora:¹ 11.212

¹ A JCR Clarivate – Web of Science alapján

Egyéb, a disszertációban nem tárgyalt tudományos közlemények:

1. Ádám Annus, **Ferenc Tömösi**, Ferenc Rárosi, Evelin Fehér, Tamás Janáky, Gábor Kecskeméti, József Toldi, Péter Klivényi, László Sztriha, László Vécsei
Kynurenic acid and kynurenine aminotransferase are potential biomarkers of early neurological improvement after thrombolytic therapy: A pilot study
Advances in Clinical and Experimental Medicine, 30(12):1225-1232. (2021)
IF₂₀₂₀: 1.727
2. Dezső P. Virok, **Ferenc Tömösi**, Anikó Keller-Pintér, Kitti Szabó, Anita Bogdanov, Szilárd Poliska, Zsolt Rázga, Bella Bruszel, Zsuzsanna Cseh, Dávid Kókai, Dóra Paróczai, Valéria Endrész, Tamás Janáky, Katalin Burián
Indoleamine 2,3-Dioxygenase Cannot Inhibit Chlamydia trachomatis Growth in HL-60 Human Neutrophil Granulocytes
Frontiers in Immunology, 12:717311. (2021)
IF₂₀₂₀: 7.561
3. Péter Traj, Ali Hazhmat Abdolkhalik, Anett Németh, Sámuel Trisztán Dajcs, **Ferenc Tömösi**, Tea Lanisnik-Rizner, István Zupkó, Erzsébet Mernyák
Transition metal-catalyzed A-ring C–H activations and C(sp²)–C(sp²) couplings in the 13 α -estrone series and in vitro evaluation of antiproliferative properties
Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 36, 1 pp. 895-902., 8 p. (2021)
IF₂₀₂₀: 5.051
4. Areen Alshweiat, Ildikó Csóka, **Ferenc Tömösi**, Tamás Janáky, Anita Kovács, Róbert Gáspár, Anita Sztojkov-Ivanov, Eszter Ducza, Árpád Márki, Piroska Szabó-Révész, Rita Ambrus
Nasal delivery of nanosuspension-based mucoadhesive formulation with improved bioavailability of loratadine: preparation, characterization, and in vivo evaluation
International Journal of Pharmaceutics, 579, 119166, 9 p. (2020)
IF₂₀₂₀: 5.875

5. Rita Ambrus, Péter Gieszinger, Róbert Gáspár, Anita Sztojkov-Ivanov, Eszter Ducza, Árpád Márki, Tamás Janáky, **Ferenc Tömösi**, Gábor Kecskeméti, Piroska Szabó-Révész, Csilla Bartos
Investigation of the Absorption of Nanosized lamotrigine Containing Nasal Powder via the Nasal Cavity
Molecules, 25, 5, 1065, 15 p. (2020)
IF₂₀₂₀: 4.411
6. Gábor Katona, György Tibor Balogh, Gergő Dargó, Róbert Gáspár, Árpád Márki, Eszter Ducza, Anita Sztojkov-Ivanov, **Ferenc Tömösi**, Gábor Kecskeméti, Tamás Janáky, Rita Ambrus, Edina Pallagi, Piroska Szabó-Révész, Ildikó Csóka
Development of Meloxicam-Human Serum Albumin Nanoparticles for Nose-to-Brain Delivery via Application of a Quality by Design Approach
Pharmaceutics, 12, 2, 97, 22 p. (2020)
IF₂₀₂₀: 6.321
7. Csaba Bartos, Rita Ambrus, Gábor Katona, Tamás Sovány, Róbert Gáspár, Árpád Márki, Eszter Ducza, Anita Ivanov, **Ferenc Tömösi**, Tamás Janáky, Piroska Szabó-Révész
Transformation of Meloxicam Containing Nanosuspension into Surfactant-Free Solid Compositions to Increase the Product Stability and Drug Bioavailability for Rapid Analgesia
Drug Design Development and Therapy, 13 pp. 4007-4020., 14 p. (2019)
IF₂₀₁₉: 3.216
8. Csilla Bartos, Rita Ambrus, Anita Kovács, Róbert Gáspár, Anita Sztojkov-Ivanov, Árpád Márki, Tamás Janáky, **Ferenc Tömösi**, Gábor Kecskeméti, Piroska Szabó-Révész
Investigation of Absorption Routes of Meloxicam and Its Salt Form from Intranasal Delivery Systems
Molecules, 23, 4, 784, 13 p. (2018)
IF₂₀₁₈: 3.060

9. Róbert Berkecz, **Ferenc Tömösi**, Tímea Körmöczi, Viktor Szegedi, János Horváth, Tamás Janáky
Comprehensive phospholipid and sphingomyelin profiling of different brain regions in mouse model of anxiety disorder using online two-dimensional (HILIC/RP)-LC/MS method
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 149 pp. 308-317., 10 p. (2018)
IF₂₀₁₈: 2.983
10. Róbert Berkecz , Tímea Körmöczi, **Ferenc Tömösi**, Viktor Szegedi, János Horváth, Nóra Kovács, Tamás Janáky
Plasma phospholipid profiling of a mouse model of anxiety disorder by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry
Biomedical Chromatography, 32, 6, e4202, 9 p. (2018)
IF₂₀₁₈: 1.748

A disszertációban nem tárgyalt közlemények összesített impakt faktora²: 41.953

Kumulatív impakt faktor²: 53.165

² A JCR Clarivate – Web of Science alapján

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Co-author certification

Alulírott Prof. Dr. Vécsei László (felelős szerző) kijelentem, hogy Tömösi Ferenc (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2021. július 15.
Dátum



A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Bernadett Tuka, Aliz Nyári, Edina Katalin Cseh, Tamás Körtési, Dániel Veréb, **Ferenc Tömösi**,
Gábor Kecskeméti, Tamás Janáky, János Tajti, László Vécsei

*Clinical relevance of depressed kynurenine pathway in episodic migraine patients: potential
prognostic markers in the peripheral plasma during the interictal period*

THE JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN

22, 60 (2021)

<https://doi.org/10.1186/s10194-021-01239-1>