

RÁKKUTATÁS VATTÁVAL

Mindannyian jól ismerjük a hétköznapi életben használt vattát, nagyon jól alkalmazható például smink vagy körömlakk lemosásához, de a túl nagy cipő orrát is ki lehet vele tömni, hogy tökéletesen a lábunkra illeszkedjen. Sok-sok hétköznapi felhasználás, rengeteg eddig feltérképezetlen lehetőség. Arról viszont bizonyára kevesebben hallottak, hogy a vatta szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszer állófázisként is alkalmazható biológiai minták tisztítása során. Nekem csakúgy, mint a többi alkalmazás, ez is a mindennapjaim részét képezi. De lássuk, hogy pontosan mi is ez a módszer, hogyan használható a vatta biológiai minták tisztítására, és mindez hogyan kapcsolódik a rákkutatás tárgyköréhez!

Az írás a BME – Pro Progressio Alapítvány – Élet és Tudomány 2022. évi cikkpályázatára készült.



PRO PROGRESSIO ALAPÍTVÁNY

ÉLET-TUDOMÁNY

Az előbbi kérdések megválaszolásához picit messzebbre kell indulnunk. Szervezetünk fő építőkövei a fehérjék. Ezek a molekulák számtalan feladatot látnak el, amelyek folyamatosan változnak attól függően, hogy éppen milyen állapotban van a szervezetünk. Saját magunkon ezt nem feltétlenül vesszük észre, de gondoljunk csak a pillangó és a hernyó esetére. A védtelen kis hernyó látványosan különbözik a kifejlett lepkétől, pedig a kettő ugyanaz az élőlény, ugyanazokat a tulajdonságokat kódoló génekkel. A merőben eltérő fizikai jellemzők a két életszakaszban jelentősen különböző fehérjekészletüknek köszönhetők. Ugyan a mi életünk során a hernyóhoz hasonló mértékű átalakulás nem fordul elő, azonban a fehérjék szerepe szervezetünk működése szempontjából ugyanolyan jelentős.

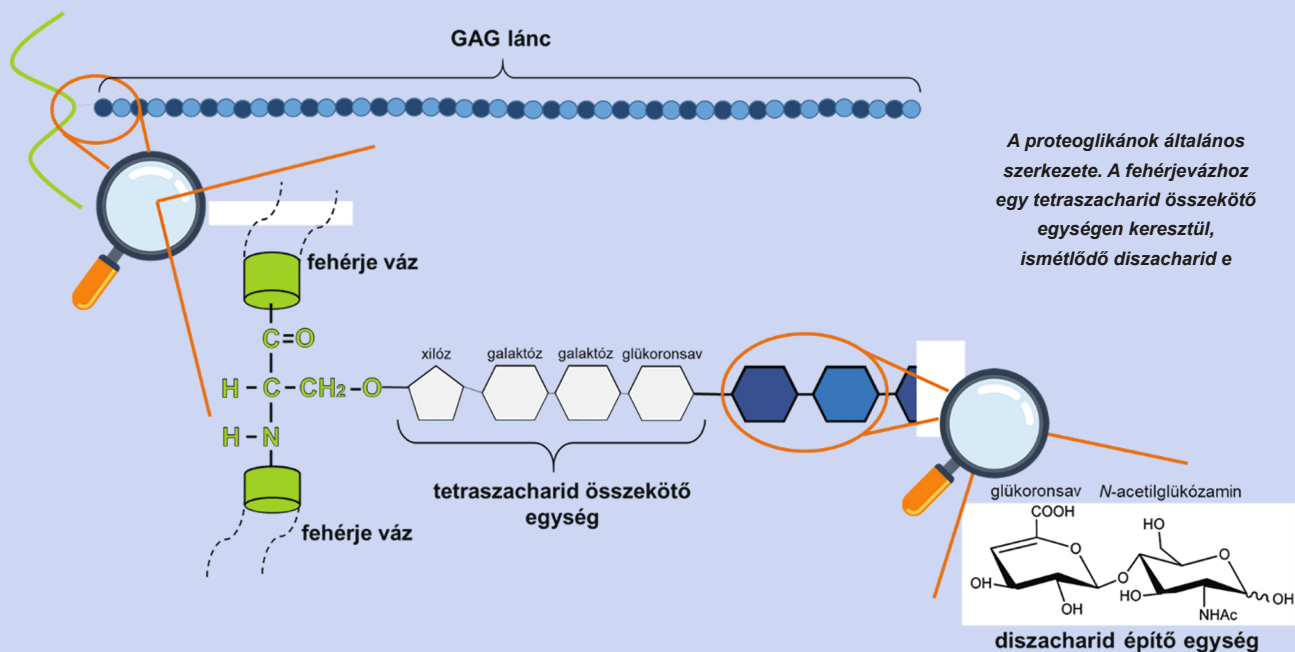
Egy élőlény életciklusához hasonlóan bizonyos betegségek kialakulását és előrehaladását is egyes fehérjék megváltozása kísérheti. Ezért is fontos, hogy rendszeresen ellenőrizzük szervezetünk állapotát, figyeljük, hogy minden rendben van-e és időben észrevegyük az esetleges elváltozások kialakulását. Ezt megtehetjük például az egyszerűen követhető fizikai paraméterek mérésével (pl. vérnyomásmérés, EKG), de mindezek mellett ajánlott fél évente vérvételre is járunk, ahol a vérből kimutatható



A vatta sokszínű felhasználási lehetőségei.

ionok, molekulák mennyiségének változása jelezheti betegségek kialakulását. Ahhoz, hogy lehetséges legyen egy adott betegség vérből való kimutatása, találnunk kell egy olyan molekulát (*biomarkert*) a szervezetben, aminek a mennyisége vagy

szerkezete jelentősen megváltozik egy adott betegség kialakulásának következtében. Egy-egy ilyen biomarker felfedezését és klinikai gyakorlatba való bevezetését általában több évtizedes alapos kutatómunka előzi meg. Ennek a folyamatnak



a kiindulópontjánál – a felfedező kutatásoknál – kapcsolódik be kutatócsoportunk a rákkutatási láncba.

Vadászat a molekuláris különbségekre

Kutatásaink célja molekuláris különbségek keresése egészséges és rákos szövetek között, hogy egy nap a szövetből történő mintavétel nélkül, egy egyszerű vérvételt követően ki lehessen mutatni a szervezetben fellépő daganatos elváltozást, így lehetővé téve a még időben történő beavatkozást.

A molekuláris különbségek kutatásánál vizsgálhatjuk magukat a fehérjemolekulákat, vagy a hozzájuk kapcsolódó úgynevezett poszt-transzlációs módosulásokat (PTM-eket). A PTM-ek a fehérjelánc szintézisét követően alakulnak ki, különböző molekulák fehérjelánchoz történő kapcsolódásával. Ezek a molekulák sok esetben nagymértékben befolyásolhatják a fehérjek funkcióit, tulajdonságait. Ezen túl igen sokfélék lehetnek, mint például foszfátcsoport, acetilcsoport, különböző lipidek, szénhidrátok stb. Én kutatómunkám során glükózaminoglikánok (GAG-ok) vizsgálatával foglalkozom, amelyek a glikozilációs (szénhidrátok kapcsolódásával létrejövő) PTM-ek közé tartoznak. A fehérjék és GAG láncok kapcsolódásával létrejövő molekulákat proteoglikánoknak nevezzük.

A GAG-ok olyan poliszacharid láncok, amelyek egy tetraszacharid- (négytagú szénhidrát) molekulán keresztül kapcsolódnak a fehérjelánchoz.

Maguk a láncok diszacharid- (kéttagú szénhidrát) egységek ismétlődésével épülnek fel, amikhez különböző pozíciókban szulfátcsoportok is kapcsolódhatnak. Hasonló szénhidrátok a mindennapi életünkben jól ismert cukrok is. Diszacharid például a közönséges répacukor, a legismertebb monoszacharid (egytagú szénhidrát) pedig minden bizonnyal a vércukorszintért felelős glükóz, hétköznapi nevén szőlőcukor.

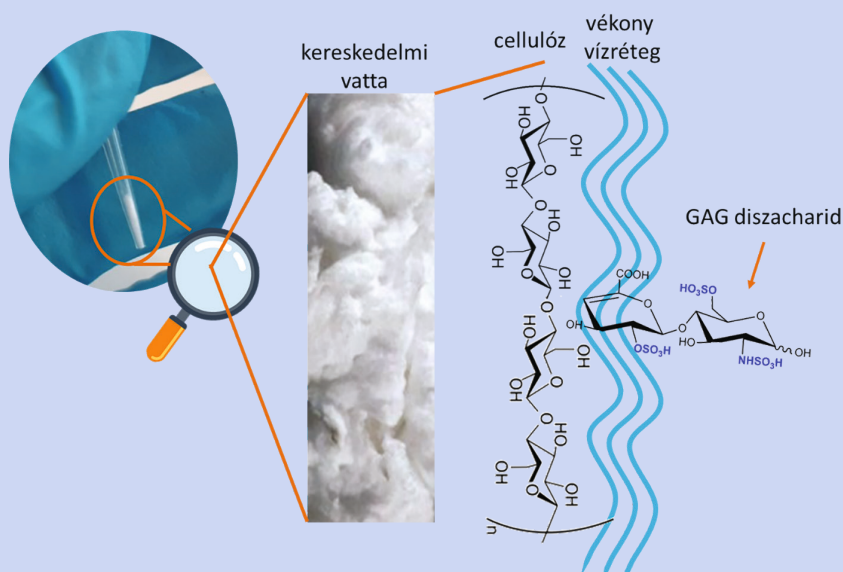
Kevésbé közismert azonban, hogy a cukorbetegségen kívül számos más kóros elváltozás során is bekövetkezik különböző szénhidrátok mennyiségének változása. Egy példa erre a mukopoliszacharidózis. Ez egyfajta anyagcserezavar, amely kiváltó oka bizonyos enzimek alulműködése a szervezetben. Ennek hatására egyes poliszacharidok, köztük a GAG-ok lebontása károsodik, melynek eredménye, hogy káros hatású bomlástermékek halmozódnak fel a sejtekben. Mindezen túl egyre több kutatás foglalkozik a GAG-ok mennyiségének változásával különböző stádiumú és eredetű daganatok esetén. A fentiek alapján látható, hogy kifejezetten fontos ezen molekulák vizsgálata.

Tűt keresni a szénakazalban

A GAG-ok vizsgálatának legelterjedtebb módja, hogy a hosszú láncokat diszacharid építőegységeikre bontjuk, és ezután műszeres analitikai módszerrel, például nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával (HPLC-MS)

határozzuk meg a mennyiségüket. Nézzük ezt a munkafolyamatot részletesebben! Első lépésként vizsgálni kívánt szöveti biopsziákra enzimoldatot csepegtetve leválasztjuk a fehérjevázról a GAG-láncokat, és ezzel együtt felhasítjuk őket diszacharid építőegységeikre. Az emésztést végző enzimek olyan fehérjék, amelyek képesek a molekulák meghatározott helyeken történő felhasítását elvégezni. Ezt követően egy tisztítási lépés következik, majd a HPLC segítségével szétválogatjuk a diszacharid molekulákat a szerkezeti eltéréseik alapján. Végül a tömegspektrometriás készülékben zajlik a diszacharidok molekulatömegének és mennyiségének meghatározása, melyet a vizsgálatok eredményeinek bioinformatikai értékelése követ. A fent részletezett munkafolyamat során tehát HPLC-MS technikával azt vizsgáljuk, hogy megfigyelhető-e eltérés a különböző pozíciókban szulfátcsoportot tartalmazó diszacharidok mennyiségében, azaz a különböző építőegységekben az egészséges és rákos, illetve különböző stádiumú daganatos minták között.

A folyamatnak ugyan nagyon fontos része a műszeres mérés, de mindez mit sem ér a tisztítási lépés nélkül. A tisztításra azért van szükség, mivel egy biológiai eredetű mintában nagyon sokféle anyag lehet jelen, amelyek a vizsgálat szempontjából éppen nem relevánsak, vagy akár zavarhatják is azt. Ilyenek például az emésztési folyamat során alkalmazott fehérjék és sók, valamint a szövetekből kivont egyéb molekulák.



Vatta, mint HILIC típusú állófázis. A pipettahegybe töltött vatta felületén jelenlévő hidroxilcsoportok egy vékony vízréteget m

Ezek esetenként sokkal nagyobb mennyiségben lehetnek jelen a mintában, mint a GAG-ok, így komoly kihívásnak néziünk elébe, ha ezek változását akarjuk megmérni a sokaságban. Ezt a jelenséget ahhoz hasonlíthatjuk, mint amikor egy világos szobában kapcsolunk ki és be egy kis zseblámpát. A sok külső fénytől nem látunk semmi változást. De ha ugyanezt a kísérletet egy sötét szobában ismételiük meg, már jól látszik a zseblámpa fényének változása. Hasonlóképpen, ha eltávolítunk minél több zavaró komponenszt a vizsgálandó molekulák mellől, sokkal jobban megfigyelhetővé válnak a különböző mintacsoportok közti különbségek is.

Ideális anyag

A zavaró komponensek eltávolításához mi egy speciális tisztítási módszert alkalmaztunk, amit a szakirodalom szilárdfázisú extrakciónak („solid phase extraction”, SPE) nevez. Ehhez a módszerhez szükség van egy olyan megkötő anyagra (állófázisra), amihez nagyon jól hozzákötődnek a vizsgálni kívánt molekulák, míg az egyéb zavaró komponenseket el tudjuk mosni mellőlük. A folyamat végén egy leoldási (elúciós) lépéssel nyerhetjük ki az így már megtisztított célmolekulákat.

Az állófázis és az alkalmazott oldószerek kiválasztását nehezíti, hogy rendkívül sokféle lehetnek. Hogy mik a főbb elvárások ezekkel szemben? Az egyik szempont, hogy az állófázis kösse meg a mérni kívánt cukrokat, de

ne annyira erősen, hogy ne legyünk képesek a tisztítás végén leoldani róla. A másik főbb követelmény pedig az, hogy a szennyező molekulák ne kötődjenek hozzá jelentős mértékben. Ha ezeket teljesítettük, mindenképp érdemes figyelembe venni azt is, hogy könnyen, gyorsan hozzáférhetőek legyenek, valamint hogy legyenek olcsók és környezetbarátok. Ezek aztán a kihívások!

Az eddigi kísérleteink alapján minden jel arra utal, hogy felfedeztünk egy, az elvárásoknak megfelelő anyagot a vatta képében. A vatta anyaga cellulóz, melynek felülete hidroxilcsoportokat (–OH) tartalmaz, amik képesek megkötni a vizet. Így, ha az oldószerben kis mennyiségben víz is jelen van, a vatta felületén egy vékony vízréteg tud kialakulni, amiben a legtöbb GAG diszacharid megkötődik, míg az egyéb, vízben rosszul oldódó szennyezők könnyen elmoshatók mellőle. Ez a módszer az úgynevezett HILIC-típusú (hidrofil interakciós kromatográfia) tisztítási módszer. Ha minden zavaró anyagot sikeresen eltávolítottunk, utolsó lépésként ammóniaoldatot használunk a GAG diszacharidok leoldására, mivel ennek segítségével vízben kiválóan oldódó sókat képeznek ezek a molekulák.

Az eljárás előtt a vattát én magam töltöttem bele kisméretű pipettahegyekbe 2–3 mm-es magasságban, ahogy az az ábránkon is látható. A fejlesztés során kísérleteket végeztem eltérő mennyiségű vatta alkalmazásával, részlegesen

és 100%-ban pamutot (cellulózt) tartalmazóval, valamint többféle márkájú vattát is összehasonlítottam. Eredményeim azt mutatták, hogy minden fenti tulajdonság változtatása jelentős eltéréseket eredményezett a hatékonyság tekintetében. Ezért a következő alkalommal egy drogériában járva érdemes átgondolni a vásárlásunkat. Ha igazán multifunkcionális vattát szeretnénk, ami akár GAG-diszacharidok SPE tisztítására is alkalmas lehet, csak 100% pamuttartalmúban gondolkodjunk. Az ember sose tudhatja, mire lehet egyszer szüksége...

Vizsgálataink igazolták, hogy a vatta megfelel a megkötési elvárásoknak, tehát valóban alkalmas GAG-diszacharidok tisztítására. Mi a helyzet azonban a többi szemponttal? A vatta ezeknek az elvárásoknak is megfelelt, hiszen nagy mennyiségben hozzáférhető, emellett cellulózból van, ami környezetbarát, lebomló anyag, így nem terheli nagymértékben a természetet. Végül pedig lényegesen olcsóbb, mint a kereskedelemben kapható általánosan használt extrakciós állófázisok.

Mindezekből úgy tűnhet, hogy megtaláltuk a tökéletes megoldást, azonban a vatta kiválasztásával korán sem ért még véget a feladatunk. A módszerfejlesztés során teszteltünk számos oldószert, oldószertérfogatókat, savakat, lúgokat, különböző hőmérsékleteket a mosási lépéshez, mindezt a leghatékonyabb tisztítás elérése érdekében. Közel egy éves munka után pedig, két GAG-osztályra (heparán-szulfátokra, kondroitin-szulfátokra) is sikerült kifejlesztenünk egy-egy optimális tisztítási módszert.

A szükséges – igen különleges – módszerek kifejlesztése után elérkeztünk a biológiai vizsgálatok elvégzéséhez, amelyek során emberi szövetmetszetek GAG diszacharidjait fogjuk összehasonlítani. Különbségeket, hasonlóságokat, mintázatokat kutatunk különböző szervekből származó, azonban hasonló patológiai karakterisztikájú minták esetében. A felfedezett molekuláris mintázatok segíthetnek a betegségek biokémiai lefolyásának mélyebb megértésében, ezáltal lehetővé tehetik a tumoros megbetegedések korai diagnosztizálását vagy hatékonyabb terápiás célpontok azonosítását.

FÜGEDI KATA DORINA