

Szemelvények a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében folyó tudományos kutatásokról

AGÓCS Attila^a, DELI József^{a,b}, MÁRK László^{a,c,d} és ifj. GALLYAS Ferenc^{a,*}

^a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Szigeti út 12., 7624 Pécs, Magyarország

^b PTE GYTK Farmakognóziás Intézet, Rókus utca 2., 7624 Pécs, Magyarország

^c Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium, PTE Szentágothai János Kutatóközpont, Ifjúság útja 20., 7624 Pécs, Magyarország

^d MTA-PTE Humán Reprodukciós Kutatócsoport, Édesanyák útja 17., 7624 Pécs, Magyarország

Intézetünk szerteágazó nemzetközi és ipari kapcsolatrendszerrel rendelkezve igen széleskörű kutatási feladatokat lát el a biokémia, analitikai kémiai és szintetikus szerves kémia területén. A főbb tudományos témaköröket jól reprezentálja az Intézet keretein belül működő négy Tanszék (Analitikai Biokémia, Orvosi Biokémia, Orvosi Kémia, Patobiokémia). Közleményünkben, a teljesség igénye nélkül, be szeretnénk mutatni néhány olyan kutatási témát, amelyek meghatározó jelentőségűek Intézetünk profiljában. Ezek főként tömegspektrometriára épülő kvantitatív és kvalitatív analitikai vizsgálatok illetve a karotinkémiát érintő területek.

1. Patobiokémia

Intézetünkben 2005 óta működik olyan tömegspektrometriás facilitás, amely alkalmas peptidok, lipidek, fehérjék kvalitatív és kvantitatív vizsgálatára. A közel két évtizedes munka során az orvostudomány számos ágát érintő patológias folyamatokra jellemző diagnosztikai értékkel rendelkező biomarker molekula kimutatásával foglalkoztunk. Vizsgálataink többek között kiterjedtek a neuropeptidok, hibernációs folyamatok, tumordiagnosztika, paleoproteomika területeire.

A patológias körülményekre jellemző molekuláris folyamatok diagnosztikája során a legváltozatosabb típusú és koncentrációjú biomolekulák, többek között proteinek, peptidok, hormonok, gyógyszer metabolitok megbízható, minőségi és mennyiségi vizsgálatát igényli. Ennek a kihívásnak megfelelően a klinikai és biokémiai laboratóriumok a legmodernebb analitikai módszerekkel vértetik fel magukat, ebben az eszköztárban többek között megtalálható a gáz- és folyadékromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria is. A különböző polaritású és szerkezetű biomarkerek vizsgálata során szinte az összes ionforrás és analizátor típust alkalmazzák, de a legelterjedtebbek az elektroporlasztásos és a lézer deszorpciós ionizáción alapuló, valamint a kvadrupól, ionscspadás és repülési idő analizátorral, illetve ezek kombinációjával ellátott készülékek. A jelenlegi gyakorlatban a tömegspektrometriát elsősorban a kis molekulású vegyületek meghatározására használják, így nagy jelentősége van az újszülöttkori szűrés,

az endokrin betegségek diagnosztikája, a toxikológia és a farmakológia területén. A biopolimerek, elsősorban peptidok, polipeptidok és fehérjék tömegspektrometriára épülő diagnosztikus vizsgálata teljesen új és rendkívül perspektivikus irányt képvisel a laboratóriumi medicina területén. Segítségével nem csupán a vegyületek mennyiségi vizsgálatát lehet elvégezni, de megvalósítható a potenciális biomarkerek szekvenciájának, poszt-transzlációs kémiai módosításainak és metabolitjainak vizsgálata egyaránt.

A proteomika napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő tudományága, amely az elmúlt évtizedekben, mind módszertanát, mind bioinformatikai háttérét tekintve forradalmi változásokon ment keresztül. A proteomika kifejezést először 1995-ben kezdték el használni egy sejt, szövet vagy szerv összes fehérjéjének kvalitatív és kvantitatív meghatározására. A proteom a genom által kifejezett teljes fehérjeállományt jelenti, így e fogalom az élő szervezetben előforduló összes, szerkezetében akár a legkisebb mértékben eltérő fehérje megismerésével foglalkozó tudományterület, amely a genommal kapcsolatos kutatás kiegészítőjeként jött létre. Mára már önálló területté nőtte ki magát a tudományos köztudatban. Jelentőségét az is nagyon jól bizonyítja, hogy a proteomikai vizsgálatok a korszerű gyógyszerkutatás- és az orvostudomány tovább fejlesztésében illetve a mainál hatékonyabb diagnosztikai eljárások és terápiás szerek kifejlesztésében elengedhetlenné vált. Proteomika kutatási területébe tartozik a fehérje eredetének felderítése, rendszertani besorolása, a különböző forrásból származó, de azonos biológiai funkciót ellátó proteinek szerkezetének és lokalizációjának meghatározása, jelenlétének vagy hiányának igazolása. A modern fehérjeanalitikai eljárások segítségével lehetővé vált a komplex biológiai rendszerek teljes proteomjának akár szubfémtomol tartományban történő kvalitatív és kvantitatív vizsgálata. A tömegspektrometriás eljárások nagy érzékenységüknek, rendkívüli specifikusságuknak, széles koncentráció tartományon belül történő alkalmazhatóságuknak, reprodukálhatóságuknak illetve automatizálhatóságuknak köszönhetően kiválóan alkalmazhatóak a klinikai diagnosztikában. A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) – a jelenleg általánosan alkalmazott rutin-diagnosztikai eljárásokkal szemben –

* Tel.: +36 72 536 276; e-mail: ferenc.gallyas@aok.pte.hu

olyan dinamikus analitikai szemléletmódot tesz lehetővé, amely egyedülálló lehetőségeket nyújt többek között a diagnosztikai jelentőségű biomarkerek kimutatása, a lipidomika illetve a metabolomika területén. Segítségével lehetőségünk van a már jól bevált és pontosan validált diagnosztikai biomarkerek mellett, azok analógjainak, izoformáinak, metabolitjainak és molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálatára, illetve új diagnosztikus jelentőségű biomolekulák kimutatására. A tömegspektrometria további előnye, hogy az archivált tömegspektrumok kiértékelése és statisztikai elemzése bármikor megismételhető, így a jövőben olyan paraméterek és komponensek is elemezhetőek, amelyek patológias és diagnosztikai szerepe a vizsgálatok lefolytatásakor még nem ismert.

2. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria igen gyors és hatékony diagnosztikai módszer lehet a fertőző humán patogének kimutatására. Intézetünkben széleskörű kutatásokat végzünk különböző kórokozók jelenlétének gyors kimutatása érdekében, amely eredményeit az ipar is felhasználja (antibakteriális textília, antibakteriális bőrkesztyű). Különböző intakt mikroorganizmusok, úgy, mint baktériumok, vírusok és gombák kimutatására elsősorban a MALDI TOF tömegspektrometriát alkalmazzák, amelynek többek között rendkívüli előnye a nagy mintaátesztelő képessége és egyszerű mintaelőkészítési igénye, valamint az, hogy széles tömegtartományban (kb. 50 Da-tól 500 000 Da-ig) alkalmazható. A módszert hatékonyan alkalmazzák olyan tömegesen előforduló fertőzések esetében, mint például a mikobakteriális fertőzések és malária, de nem csupán a kórokozók kimutatása végezhető el a MALDI TOF MS segítségével, hanem meghatározható az új multidroeg rezisztens patogének jelenléte és kialakulása egyaránt. A humán patogének proteomjának meghatározása alkalmas fajspecifikus diagnózis felállítására, amelyet kiválóan kiegészít a kórokozókra jellemző kisebb molekulatömegű komponensek például mikobaktérium esetében a sejtmembránt felépítő specifikus mikolsavak azonosítása. Rendkívül perspektívus alkalmazási terület a vírusfertőzések (HBV, HCV, HPV stb.) során a fertőzött sejten belül tapasztalható proteomikai változások tömegspektrometriás vizsgálata, amelyre 2D-PAGE gélelektroforézist, MALDI TOF MS-t, folyadékromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriát, SELDI proteinchip-et és protein mikroarray technikákat lehet alkalmazni. A gazdasajt expressziós proteomikai elemzésén kívül, diagnosztikai szempontból jelentős lehet a gazdaszervezet immunválaszára jellemző biopolimerek, biomarkerek kimutatása és a fertőző patogén proteomjának és annak módosulásainak evolúciós vizsgálata^{1,2}.

Az újszülöttkori szűrések esetében a tömegspektrometria egy jól bevált, hatékony diagnosztikai módszer, azonban főként a különböző lipidek és egyéb kis molekulatömegű biomarkerek (pl. aminosavak) kimutatására használják. Viszonylag kevés az olyan applikáció, amelyben diagnosztikai jelentőségű peptidok és fehérjék kimutatását végzik el.

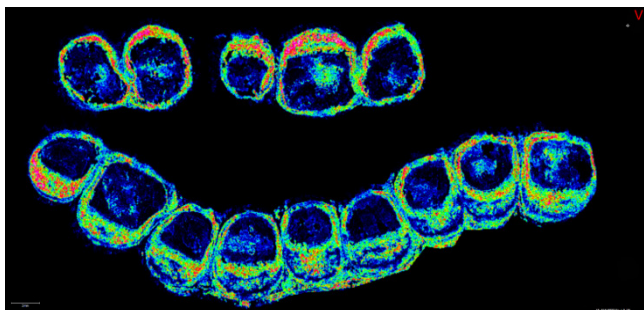
Ezek közül az egyik legjelentősebb a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) jelenlétének, lokalizációjának és koncentrációjának vizsgálata³.

A tömegspektrometriára épülő peptidomika és proteomika egyik legnagyobb felhasználási területe az onkológia. A benignus és malignus elváltozások korai fázisban történő kimutatása és differenciálása, valamint a gyógyszeres- és sugárterápia nyomon követése egyaránt elvégezhető a modern tömegspektrometria segítségével. Számos olyan vizsgálat látott napvilágot, amelyekben különböző testfolyadékok (vér, szérum, vizelet, nyál stb.) proteomikai vizsgálatát végezték el tumorokra jellemző, korai fázisban is kimutatható biomarkerek céljából. Többek között ilyen potenciális tumor biomarkerek lehetnek az annexin 1 és 2 valamint a peroxiredoxin-2, amelyek hatékonyan mutathatók ki nem invazív módon például a betegek nyálából is⁴.

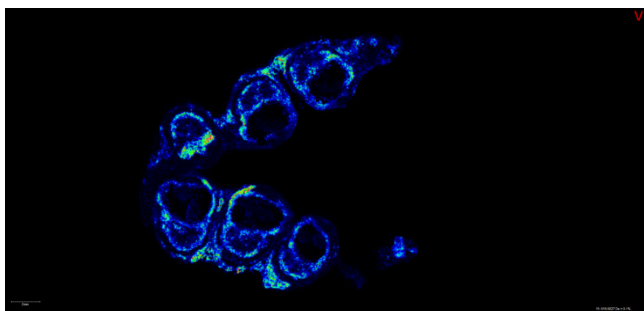
A központi idegrendszerben, igen kis mennyiségben előforduló neuropeptidek és proteinek nagyhatékonyságú vizsgálata az egyik legfontosabb alkalmazási területe a tandem tömegspektrometriának. Ennek kiváló példája a már említett PACAP MALDI TOF és ESI tömegspektrometriás vizsgálata. Legnagyobb mennyiségben a PACAP a központi és perifériás idegrendszerben fordul elő, de kimutatható más szövetekben is, úgymint az endokrin mirigyekben, ivarszervekben, gasztrointesztinális traktus teljes hosszában és a kardiovaszkuláris rendszerben egyaránt. A PACAP számos endokrin hatása ismert úgy, mint a pajzsmirigy-, gonadális szteroidogenezis-, spermiogenezis-, és az ovarialis follikuláris fejlődés befolyásolása, a pankréász inzulin termelésének- és a mellékvese katekolamin szintézisének stimulációja és a memória folyamatok serkentése. Központi szerepet játszik a ritmusszabályozásokban, mint pl.: alvásszabályozás, hőszabályozás. Részt vesz a húgyúti szervek vizeletürítési reflexében, a simaizom reflexáns hatásában és a stressz adaptációs magatartás szabályozásában. A PACAP-nál beszélünk kell neurotrofikus és neuroprotektív hatásról is. A PACAP különböző jelátviteli utakon keresztül fejti ki antiapoptotikus-, protektív hatásait, melyek egymással szorosan konvergálnak. A citoprotektív hatásokért, majdnem minden esetben a PAC1 receptor felelős, de a hatások közvetítésében a VPAC is szerepet játszik. E vegyület neuroprotektív hatásával, szorosan összefügg az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepe. A PACAP és receptorai már igen korán megjelennek az új idegrendszerben, és szerteágazó hatásokkal bírnak a neurogenézisre, a neuronális differenciációra, az idegrendszeri mintázat kialakítására és a gliasejtek fejlődésére.

Napjaink egyik legígéretesebb peptid és protein biomarker diagnosztikai alkalmazása a MALDI TOF/TOF tömegspektrometriára épülő képpalkotó módszer (MALDI Imaging), melynek során egy speciális mintatartóra 10-20 mikronos szövettani metszetet és mátrixot szárítunk. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több ezer tömegspektrumot vesszünk fel, amelyeket a megfelelő szoftver az egyes m/z értékekhez tar-

tozó intenzitások eloszlását képként jeleníti meg (1. ábra, 2. ábra). A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (in vivo fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT IR) képalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát⁵.



1. Ábra. Reprezentatív lipidomikai MALDI TOF képalkotási tömegspektrometriás vizsgálat 10 napos embrionális életkorú normál fejlődésű egér embriókról



2. Ábra. Reprezentatív lipidomikai MALDI TOF képalkotási tömegspektrometriás vizsgálat 10 napos embrionális életkorú IVF (in-vitro fertilizált) egér embriókról

3. Karotinoidkémia

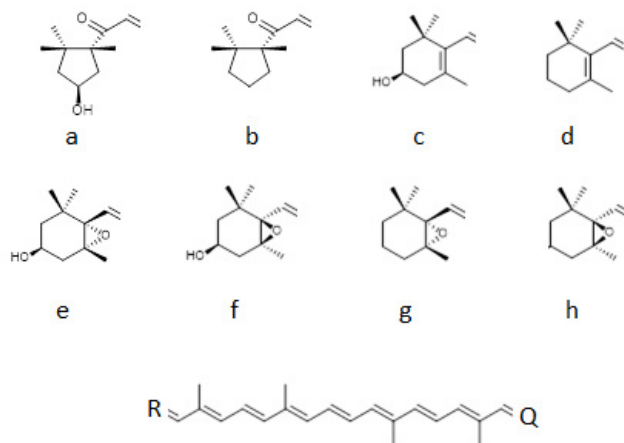
A karotinoidkémiai kutatócsoport hagyományos kutatási területe a karotinoidok izolálása és szerkezetazonosítása. Az 1980-1990-es években, számos, a κ -végcsoportú karotinoidok (kapszantin (1), kapszorubin (2)) képződéséhez kapcsolódó 3,6-epoxi- β -, 3,5,6-trihidroxib- és 6-hidroxib- γ -végcsoportot tartalmazó karotinoidot izoláltunk, és határoztuk meg szerkezetüket.

Ezek a karotinoidok jellemzően a piros paprikában található, illetve kis mennyiségben még egy-két, más növényben, mely a hazai éghajlaton előfordul. 2009-ben kapcsolatba kerültünk a Panamai Egyetem professzorával, Enrique Murilloval, aki segítségünket kérte trópusinövények κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidjainak azonosításához. A piros húsú mamey (*Pouteria sapota*) aranybányának bizonyult számunkra, nagy mennyiségben tartalmazott ugyanis olyan karotinoidokat, amelyek κ -végcsoportja nem tartalmaz hidroxil-csoportot, és amelyek eddig ismeretlenek voltak. HPLC analízis alapján⁶ a mamey fő karotinoidja a kriptokapszin (3) (kis mennyiségben előfordul a piros pap-

rikában is) mellett a sapotexantin (4), melyet kristályos állapotban izoláltunk⁷. Mindkettő A-provitamin karotinoid.

A későbbiek során izoláltuk a kriptokapszin 5,6-epoxidot (5)⁸, a 3'-dezoxi-kapszantin 5,6-epoxidot (6)³, a 3'-dezoxi-kapszantin (7)⁹ és a sapotexantin 5,6-epoxidot (8)¹⁰.

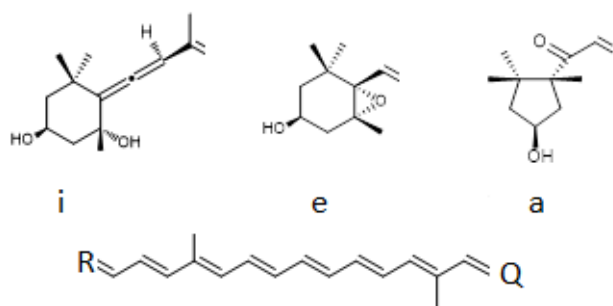
A kriptokapszin 5,6-epoxid és a sapotexantin 5,6-epoxid szerkezetigazolásához kriptokapszin, illetve sapotexantin epoxidálásával előállítottuk a felszintetikus termékeket is. Az epoxidálás során mindig két epoxid-izomer, az 5*R*,6*S* (8), illetve az 5*S*,6*R* (9) komponens keletkezik.



- 1 Kapszorubin R=Q=a; 2 Kapszantin R=c, Q=a
- 2 Kapszantin R=c, Q=a
- 3 Kriptokapszin R=d, Q=a
- 4 Sapotexantin R=d, Q=b
- 5 Kriptokapszin 5,6-epoxid R=g, Q=a
- 6 3'-Dezoxi-kapszantin 5,6-epoxid R=e, Q=b
- 7 3'-Dezoxi-kapszantin R=c, Q=b
- 8 (5*R*,6*S*)-Sapotexantin 5,6-epoxid R=g, Q=b
- 9 (5*S*,6*R*)-Sapotexantin 5,6-epoxid R=h, Q=b
- 10 (5*S*,6*R*)-Kriptokapszin 5,6-epoxid R=h, Q=a
- 11 3'-Dezoxikapszorubin R=a, Q=b
- 12 3,3'-Didezoxikapszorubin R=Q=b

Ha a ciklohexángyűrű nem tartalmaz hidroxilcsoportot, akkor oszlopkromatográfiával a termékek nem választathatók szét. Mindkét esetben királis fázison, HPLC-ECD technikát alkalmazva választottuk szét a diasztereomereket (8 és 9 illetve 5 és 10), és határoztuk meg a konfigurációjukat^{8,10}, Kurtán Tibor csoportjával (Debreceni Egyetem) kooperálva. Ugyancsak izoláltuk, a kapszorubin dezoxi-származékait is, a 3'-dezoxi-kapszorubint (11) és a 3,3'-didezoxi-kapszorubint (12)¹¹.

Mameyből allén-végcsoportot tartalmazó karotinoidokat, neoxantint (13), (9*Z*)-neoxantint ((9*Z*)-13) és kapszoneoxantint (14) is izoláltunk, és először adtuk meg teljes ¹H és ¹³C-NMR asszignációjukat¹².



13 Neoxantin R=i, Q=e; 14 Kapszoneoxantin R=i, Q=a

További növényi forrásokat vizsgálva, két olyan növényi forrást, a Jipi-japa (*Carludovica palmata*) termését és a Zamia pálma (*Zamia dressleri*) levelét találtunk, amelyekben a fő komponens a kapszorubin¹³. Munkánk hozzájárult a κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok szintézisének a tisztázásához.

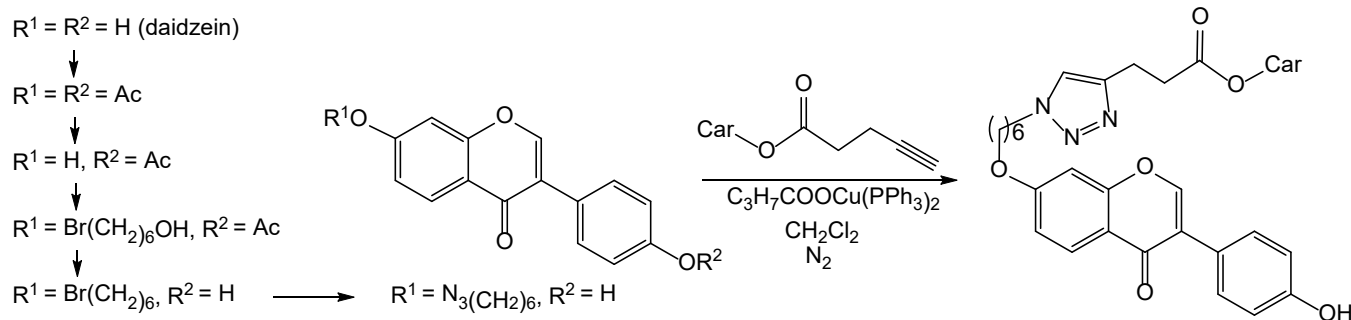
A kutatócsoport másik kutatási területe a származékképzés és a szintézis. Ezen a területen a következő előrelépések történtek:

A karotinoidok lényegében hidrofób antioxidánsok. A hidrofóbítás ebben az összefüggésben meglehetősen hátrányos, mivel a karotinoidok felhasználása a gyógyászatban antioxidánsként vagy az élelmiszerkémiaiában színezékként

némi vízben való diszpergálhatóságot igényel a hatékony felszívódáshoz. Ez a felismerés arra készítetett minket, hogy fokozott vízoldékonyságú karotinoid-származékokat készítsünk. Egyszerű módszert dolgoztunk ki polietilén-glikol (PEG) -karotinoid konjugátumok észterképzéssel történő szintézisére. Számos hidroxi- és dihidroxi-karotinoid-szukcinátot kapcsoltunk mono- (PEG-550-OMe) és bifunkcionális polietilén-glikolokhoz. Karotinoid-tioglikozidokat szintetizáltunk új módszerrel, karotinoid-dikationokat alkalmazva, valamint karotinoid-alkoholok glikozilezését is sikeresen elvégeztük. Kutatócsoportunk használt először alkin-azid click-reakciót karotinoid-származékokon, ezt számos vegyületsoport szintézisére felhasználtuk és a jövőben is fel kívánjuk használni.

A hidrofíl származékok szintézisének kívül, illetve azokkal részben átfedésben megvalósítottuk karotinoid-konjugátumok szintézisének különböző bioaktív vegyületekkel, így például C-vitaminnal, melatoninnal, kurkuminnal és flavonoidokkal (3.ábra).

Az utóbbi két évben elkezdtük a szintetizált vegyületek antioxidáns vizsgálatát in vitro ABTS és FRAP módszerekkel, valamint gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatát sejtenyíveszeten. A karotinoidok és különösen amfipatikus származékaik hajlamosak lehetnek aggregációra/szupramolekuláris szerveződésre vizes közegben. Az aggregátumok kialakulása hatással lehet a biológiai aktivitásra (pl. antioxidáns hatás), ezért az önszerveződést is vizsgáljuk természetes karotinoidoknál és származékaiknál is.



3. Ábra. 7-azidoheptil-daidzein kapcsolása karotinoid-pentinoátokhoz

Hivatkozások

- Boros-Major A.; Bona A.; Lovasz G.; et al. *J Archeol. Sci.* **2011**, *38*, 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.09.008>
- Lipson M.; Széchenyi-Nagy A.; Swapan M.; et al. *Nature* **2017**, *551*, 368-372. <https://doi.org/10.1038/nature24476>
- 3Nakamachi T.; Ohtaki H.; Seki T.; et al. *Nature Comm.* **2016**, *7*, 12034-12047. <https://doi.org/10.1038/ncomms12034>
- Schmidt J. Kajtár B.; Juhász K.; et al. *Oncotarget* **2020**, *11*, 2702-2717. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27649>
- Li H.; Smith B.K.; Shrestha B.; Mark L.; Vertes A. *Mass Spectrometry of Small Molecules*, Springer, **2015**, 117-127. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1357-2_12
- Murillo, E.; Turcsi, E.; Szabó, I.; Mosquera, Y.; Agócs, A.; Nagy, V.; Gulyás-Fekete, G.; Deli, J. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 7148-7155. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03146>
- Murillo, E.; McLean, L.; Britton, G.; Agócs, A.; Nagy, V.; Deli, J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 283-285. <https://doi.org/10.1021/np1006982>

8. Gulyás-Fekete, G.; Murillo, E.; Kurtán, T.; Papp, T.; Illyés, T.Z.; Drahos, L.; Visy, J.; Agócs, A.; Turcsi, E.; Deli, J. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (4), 607-614.
<https://doi.org/10.1021/np3007827>
9. Turcsi, E.; Murillo, E.; Kurtán, T.; Szappanos, Á.; Illyés, T.Z.; Gulyás-Fekete, G.; Agócs, A.; Avar, P.; Deli, J. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6059-6065.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01936>
10. Murillo, E.; Agócs, A.; Nagy, V.; Király, S. B.; Kurtán, T.; Toribio, E. M.; Lakey-Beitia, J.; Deli, J. *Chirality* **2020**, *32*, 579-587.
<https://doi.org/10.1002/chir.23206>
11. Murillo, E.; Mosquera, Y.; Kurtán, T.; Gulyás-Fekete, G.; Nagy, V.; Deli, J. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 983-988.
<https://doi.org/10.1002/hlca.201100493>
12. Agócs, A.; Murillo, E.; Turcsi, E.; Béni, Sz.; Darcsi, A.; Deli, J. *J. Food Comp. Anal.* **2018**, *65*, 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.004>
13. Murillo, A.; Deli, J.; Nagy, V.; Toribio, E. M.; Sándor, V.; Marton, K.; Agócs, A. *J. Food Comp. Anal.* **2021**, *97*, 103798.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103798>

Excerpts from the scientific research carried out at the Institute of Biochemistry and Medical Chemistry of the University of Pécs

With a diversified international and industrial network, our institute carries out a wide range of research tasks in the fields of biochemistry, analytical chemistry and synthetic organic chemistry. The main scientific topics are well represented by the four Departments operating within the Institute (Analytical Biochemistry, Medical Biochemistry, Medical Chemistry, Pathobiochemistry).

The diagnosis of molecular processes characteristic of pathological conditions requires reliable, qualitative and quantitative testing of the most diverse types and concentrations of biomolecules, including proteins, peptides, hormones, and drug metabolites. In response to this challenge, clinical and biochemical laboratories are equipped with state-of-the-art analytical methods, including tandem mass spectrometry coupled with gas and liquid chromatography. Almost all types of ion sources and analyzers are used to study biomarkers of different polarities and structures, but the most common are devices based on electrospray and laser desorption ionization, as well as quadrupole, ion trapping, and flight time analyzers, or a combination thereof. In current practice, mass spectrometry is primarily used to determine low molecular weight compounds and is therefore of great importance in neonatal screening, endocrine disease diagnosis, toxicology and pharmacology.

Proteomics is one of the most dynamically evolving disciplines today, undergoing revolutionary changes in both its methodology and its bioinformatics background in recent decades. The field of research in proteomics includes the discovery of the origin of a protein, its taxonomic classification, the determination of the structure and localization of proteins from different sources but with the same biological function, and the confirmation of their presence or absence. With the help of modern protein analysis methods, it has become possible to qualitatively and quantitatively study the entire proteome of complex biological systems, even in the subfemtomole range. Mass spectrometric methods are excellent in clinical diagnostics due to their high sensitivity, extreme specificity, applicability over a wide concentration range, reproducibility and automation. In contrast to the currently commonly used routine diagnostic procedures, MS allows for a dynamic analytical approach that offers unique capabilities in the detection of biomarkers of diagnostic significance, lipidomics, and metabolomics, among others. With its help, in addition to the already well-proven and accurately validated diagnostic biomarkers, we have the possibility to study their analogues, isoforms, metabolites and molecular interactions, as well as to detect new biomolecules of diagnostic significance.

Mass spectrometry can be a very fast and efficient diagnostic method for the detection of infectious human pathogens. For the detection of various intact microorganisms, such as bacteria, viruses and fungi, MALDI TOF mass spectrometry is mainly used, which has the extreme advantage of high sample permeability and ease of sample preparation, as well as the ability to (to). A promising field of application is the mass spectrometric study of proteomic changes within an infected cell during viral infections (HIV, HBV, HCV, HPV, etc.) using 2D-PAGE gel electrophoresis, MALDI TOF MS, liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry, protein microarray techniques can be used. In addition to the proteomic analysis of host cell expression, the detection of biopolymers and biomarkers characteristic of the host immune response and the evolutionary study of the proteome of the infectious pathogen and its modifications may be of diagnostic importance^{1,2} For neonatal screening, mass spectrometry is a well-established and effective diagnostic method, but it is mainly used to detect various lipids and other low molecular weight biomarkers (e.g., amino acids). There are relatively few applications in which diagnostic peptides and proteins are detected. One of the most significant of these is the study of the presence, localization, and concentration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)³.

One of the most promising diagnostic applications of peptide and protein biomarkers today is the MALDI TOF / TOF mass spectrometry imaging method, in which a 10-20 micron histological section and matrix are dried on a special sample holder. Thousands of mass spectra are then recorded from the sample in a predetermined system and with laser intensity, and the appropriate software displays the distribution of intensities for each m/z value as an image. The huge advantage of the method is that it can be used in parallel with other (in vivo fluorescent, NMR, MRI, CT, FT IR) imaging methods, thus providing new scientific and diagnostic results that revolutionize the current methodology of clinical diagnostics⁵.

The traditional research area of the carotenoid chemistry research group is the isolation and structural identification of carotenoids. In the 1980s and 1990s, a number of 3,6-epoxy- β -, 3,5,6-trihydroxy- β - and 6-hydroxy- γ -terminated carotenoid was isolated and its structure determined. These carotenoids are typically found in red peppers and in small amounts in one or two other plants that occur in the domestic climate. In 2009, we contacted a professor at the University of Panama, Enrique Murillo, who asked for our help to identify κ -terminal carotenoids in tropical plants. The red-fleshed mamey (*Pouteria caropota*) proved to be a gold

mine for us, as it contained large amounts of carotenoids whose κ -terminal group does not contain a hydroxyl group and which were previously unknown. Based on HPLC analysis⁶, the major carotenoid in mamey, in addition to cryptocapsin (also present in small amounts in red pepper), is sapotexanthin, which was isolated in a crystalline state⁷. Both are provitamin A carotenoids. Subsequently, cryptocapsin 5,6-epoxide⁸, 3'-deoxycapsanthin 5,6-epoxide³, 3'-deoxycapsanthin⁹ and sapotexanthin 5,6-epoxide¹⁰ were isolated. To confirm the structure of cryptocapsin 5,6-epoxide and sapotexanthin 5,6-epoxide, we also prepared semi-synthetic products by epoxidation of cryptocapsin and sapotexanthin, respectively. During epoxidation, two epoxide isomers, 5*R*,6*S* and 5*S*,6*R*, are always formed. If the cyclohexane ring does not contain a hydroxyl group, the products cannot be separated by column chromatography. In both cases, the diastereomers were separated on a chiral phase using HPLC-ECD technique and their configuration was determined^{8,10} in cooperation with Tibor Kurtán (University of Debrecen). Deoxy derivatives of capsorubin, 3'-deoxycapsorin and 3,3'-dideoxycapsubin, have also been isolated¹¹.

Carotenoids containing an allenic end group, neoxanthin, (9*Z*)-neoxanthin and capsoneoxanthin were also isolated from Mamey and first reported as complete 1H and 13C-NMR¹².

Examining additional plant sources, we found two plant sources, the fruit of Jipi-japa (*Carludovica palmata*) and the leaf of Zamia palm (*Zamia dressleri*), in which the main component is capsorubin¹³. Our work contributed to the elucidation of the biosynthesis of κ -terminal carotenoids.

Carotenoids are essentially hydrophobic antioxidants. Hydrophobicity is quite disadvantageous in this context, as the use of carotenoids as an antioxidant in medicine or as a colorant in food chemistry requires some dispersibility in water for efficient absorption. This realization has led us to make carotenoid derivatives with increased water solubility. We have developed a simple method for the synthesis of polyethylene glycol (PEG)-carotenoid conjugates by ester formation. Carotenoid thioglycosides were synthesized, as well, by a new method using carotenoid dications, and glycosylation of carotenoid alcohols was successfully performed. Our research group used the alkyne azide click-reaction on carotenoid derivatives for the first time, it has been used for the synthesis of several groups of compounds and we intend to use it in the future.

In addition to or partially overlapping with the synthesis of hydrophilic derivatives, we synthesized carotenoid conjugates with various bioactive compounds such as vitamin C, melatonin, curcumin, and flavonoids (Figure 3).

In the last two years, we started the in vitro antioxidant study of the synthesized compounds by ABTS and FRAP methods, as well as the anti-inflammatory and ROS-reducing effect in cell culture. Carotenoids, and especially their amphipathic derivatives, may be prone to aggregation / supramolecular organization in aqueous media. The formation of aggregates can affect the biological activity (eg antioxidant effect), therefore the self-organization of natural carotenoids and their derivatives is also studied.