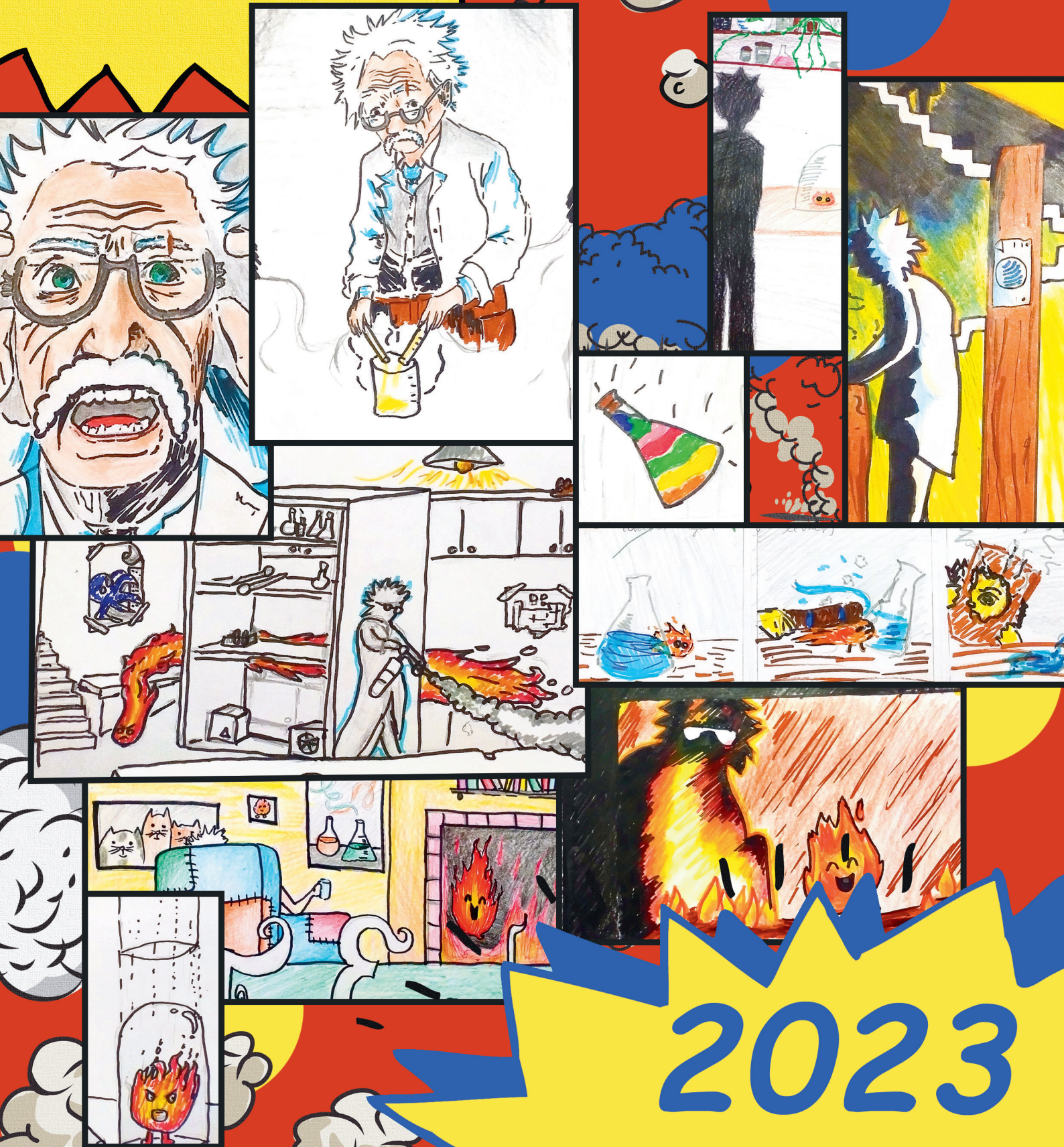


KRÓNIKA

**AKI**

**Kíváncsi Kémikus**

Biológiai témákkal  
bővített kutatótábor





# IMPRESSZUM

**Felelős kiadó:** Dr. Tompos András

**Kiadja:** HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont  
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.

**Honlap:** [www.ttk.hu/aki/2023-aki-kivancsi-kemikus-nyari-tabor/](http://www.ttk.hu/aki/2023-aki-kivancsi-kemikus-nyari-tabor/)

**Szerkesztő:** Nagyné Dr. Bereczki Laura

**Layout:** Turcsányi Mária

A borítótérket Turcsányi Mária készítette  
Behofsits Maja, Darázs Anna, Fekete Balázs,  
Katreiner Kíra és Krámlí Petra rajzait felhasználva.

Készült a Possum Kft. gondozásában

**Felelős vezető:** Várnagy László

**Telefon:** (20) 93-45-318

**E-mail:** [info@possumkft.hu](mailto:info@possumkft.hu)

ISSN 2677-1772



**AKI Kiváncsi kémikus nyári kutatótábor középiskolás diákoknak a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont szervezésében**



**A tábor támogatója a Richter Gedeon Nyrt.**

## A tábor létrejöttéhez hozzájárultak:

Andrásiné Antal Éva  
Bebesi Tímea  
Dr. Békési Angéla  
Bod Réka  
Bodnár Anikó  
Budai Eszter Anna  
Dr. Demeter Attila  
Ferdinánd Milán  
Dr. Gaál Anikó  
Hermann Petra  
Holub Eszter  
Ilyés Kinga

Kiss Nóra  
Kollár Levente  
Dr. Kovács Péter  
Lendvayné Dr. Győrik Gabriella  
Dr. Leveles Ibolya  
Dr. Mihály Judith  
Nárai Ádám  
Némethy Kornélia  
Dr. Orbán Tamás  
Romsics Imre  
Sármezey Bence  
Dr. Asmaa Selim

Simon Ádám  
Dr. Szántay Csaba  
Dr. Szíjjártó Gábor  
Dr. Telbisz Ágnes  
Teski Tamara  
Tóth Estilla  
Dr. Turczel Gábor  
Dr. Vakli Pál  
Dr. Varga Zoltán  
Dr. Wacha András

## A tábor szervezői:

Nagyné Dr. Bereczki Laura  
Dr. Keszler Anna Mária  
Bajcsi Áron  
Balterer Bence  
Grádné Szabó Rita  
Jámbor Andrea

## Bíráló bizottság:

Dr. Mihály Judith  
Dr. Tantos Ágnes  
Novákné Dr. Czégény Zsuzsa  
Bajcsi Áron



**Itt élünk.  
Itt kutatunk.  
Itt fejlesztünk.**

A Richter magyarországi központú, innovációra épülő, specializált multinacionális gyógyszerceg. A magyar irányítású Richter gyógyszergyártással, kutatás-fejlesztéssel, kereskedelemmel, valamint marketinggel foglalkozik. Stratégiája az organikus növekedésre alapoz, célirányos akvizíciós tevékenységgel kiegészítve, elsősorban a nőgyógyászat területén. A cég küldetése, hogy az egészség megőrzését és az életminőség javítását szolgálja, többek között olyan magas hozzáadott értékű, originális és bioszimiláris termékek piacra vitelével, melyeknek a fejlesztésében és előállításában speciális tudása van. Az 1901-ben alapított Richternek az anyavállalat mellett öt országban működnek termelő leányvállalatai, termékeit saját piachálózatán keresztül a világ csaknem száz országába juttatja el. A Richter Csoport tevékenységét hazai és nemzetközi munkatársai elkötelezettségére, évszázados gyártási és kutatási tapasztalatára alapozza, valamint szorosan együttműködik stratégiai partnereivel annak érdekében, hogy innovatív készítményeit elérhetővé tegye világszerte.

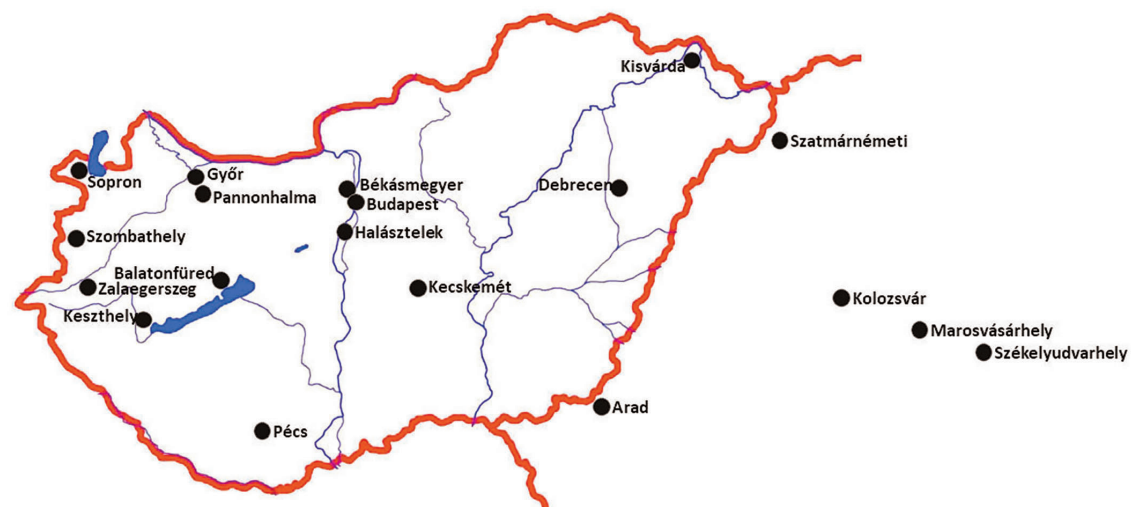
[www.gedeonrichter.com](http://www.gedeonrichter.com)

 **RICHTER GEDEON**  
Az egészség a küldetésünk



# TARTALOMJEGYZÉK

1. Előszó	5
2. Résztvevő diákok	6
3. Kutatási témák	7
4. Program	8
5. Miniszimpozium	9
6. Dolgozatok	10
<b>Tarnóczy Márton, Takács Márton Tibor, Király Tamás Gábor</b> Tüzelőanyag-cellák	16
<b>Fekete Balázs, Szabó Barnabás, Bencze Mátyás</b> Polimer keverékek és kompozitok 3D nyomtatása mérnöki alkalmazásokhoz	22
<b>Katreiner Kira Luca, Szabó Orsolya</b> Polimer gélek kémiája, kísérletek gumimacival és társaival	26
<b>Krámli Petra, Lengyel Judit Kata</b> Extracelluláris vezikulák vizsgálata	31
<b>Hangya Kinga Imola, Skorcov Tünde</b> Röntgensugár mint nanomérőród	36
<b>Machlik Míra, Szalai Nikolett</b> Rat-ical art: alkossunk remekműveket idegsejtekből és antitestekből	39
<b>Kopacz Melánia, Petrovánszki Lilla</b> Rákerápiás gyógyszer-célpont és DNS-módosító enzimfehérjék nyomkövetése gyógyszerkezelt vastagbélrák sejtvonalon	42
<b>Tomka Dorottya, Varga Dorina</b> Az agy biológiai életkorának becslése MRI felvételek alapján mesterséges intelligencia (MI) segítségével	47
<b>Jánosik Jázmin, Viczkó Csaba Péter</b> Szerves molekulák vizsgálata NMR spektroszkópiával	52
<b>Batka András, Behofsits Maja</b> ABC multidrogranszporterek hatása a gyógyszerkezelések hatékonyságában	58
<b>Darázs Anna, Káldy Fruzsina</b> Új, potenciálisan bioaktív molekulák előállítás és jellemzése	63
<b>Szilágyi Zsuzsanna Tímea, Gelencsér Artúr</b> „Ugráló gének” a sejtbiológiai kutatásokban	



## 1. ELŐSZÓ

Dr. Tompos András, Anyag- és Környezetkémiai Intézet igazgató



2023-ban 13. alkalommal rendeztük meg „AKI Kíváncsi Kémikus” elnevezésű nyári táborunkat. A tábor jelenleg már a kémián kívül a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont összes kutatási területén kínál témákat a résztvevő diákoknak. Idén a HUN-REN TTK összes intézete részt vett a tábor megrendezésében, melyek az Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Enzimológiai Intézet, Szerves Kémiai Intézet, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet, Szerkezetkutató Központ, Agyi Képző Központ. A diákok így a kémia népszerű területein (szerves kémia, polimerkémia, elektrokémia, gyógyszerkémia, szerkezetvizsgálat) kívül bekapcsolódhattak a sejtbiológia vagy az idegtudomány területein végzett kutatásokba is.

A tábor egyik célja, hogy segítséget nyújtson a természettudományos érdeklődésű középiskolásoknak a pályaválasztáshoz. A diákoknak így lehetőséget adtunk egy beszélgetésre olyan egyetemista hallgatókkal, akik jelenleg a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán, az ELTE Természettudományi Karán, illetve a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karán vagy Gyógyszerésztudományi Karán tanulnak. Így a diákok első kézből kaphattak választ a továbbtanulással kapcsolatos kérdéseikre.

Nagy örömünkre szolgál, hogy a táborunk iránt országszerte, és a határainkon túl is nagy az érdeklődés. Idén tizennyolc városból fogadtunk összesen 26 diákot, közülük ötven Erdélyből érkeztek.

Prof. Dr. Szántay Csaba, tudományos főtanácsadó, egészségügy- és oktatástámogatási vezető, Richter Gedeon Nyrt.



A tudományban a „tehetség” roppant komplex jelenség. Ennek megfelelően a tehetséget komplex módszertani eszközökkel kell életre hívni, erősíteni, a valós kutatások „tehetségigényének” megfelelő útra terelni. Az igazán jó eszközök megtalálása azonban közel sem magától értetődő dolog. Ugyanakkor az ilyen eszközök alkalmazása létfontosságú, ha alkotni vágyó és alkotni képes, magabiztos, alázatos, motivált tehetségeket akarunk nevelni a jövő számára. Az AKI Kíváncsi Kémikus Tábor ilyen eszköz. Mint a régió legnagyobb multidiszciplináris tudáscentruma, legmarkánsabb és hosszú távra tervező innovációs bázisa, a Richter Gedeon Nyrt. büszkén és elkötelezetten támogatja a tábor anyagi és szellemi értelemben egyaránt. Hisszük, hogy ezzel érdemben segítjük nemcsak a tábor működését, hanem a tábor diákjait is abban, hogy saját tehetségprofiljukat jobban megismerjék, ezen keresztül pedig személyes küldetésüket megtalálják!

Nagyné Dr. Bereczki Laura, tudományos munkatárs, szervező



A Természettudományi Kutatóközpont nyári tábora azért különleges, mert itt a diákok nem csak előadások vagy laborgyakorlatok formájában találkozhatnak a tudománnyal, hanem egy héten keresztül lehetőségük van bekapcsolódni a tudományos kutatók felfedező munkájába. A hét során megtanulják használni az általunk is használt laboratóriumi eszközöket, megismerkednek a kutatási módszereinkkel, és részt vehetnek a nagyműszereinkkel végzett mérésekben.

A tábor során jelentős szerepet kapott a diákok közötti közösség és együttműködés kialakítása. A közös természettudományos érdeklődés, eleve jó alapot adott az ismerkedéshez. Az egyes kutatási témákon a diákok egymást segítve párokban dolgoztak. A hét végére megoldottak egy rövid kutatási feladatot, melynek eredményét rövid előadásban mutatták be. A délutáni programokat is igyekeztünk a természettudományok és a csapatépítés jegyében megszervezni. A diákoknak a hét során egy játékos projektfeladatot

kellett megvalósítaniuk, melyen esténként öt-hat fős csoportokba szerveződve dolgoztak. Ennek eredményeként születtek többek között a címlap képregénykockái. Reméljük, hogy a nálunk szerzett tudományos tapasztalatokon túl a diákjaink talán életre szóló barátságokat is szereztek a tábor során!



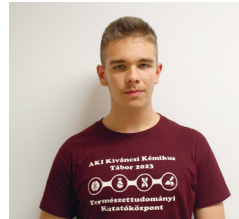
## 2. RÉSZTVEVŐK



Király Tamás Gábor



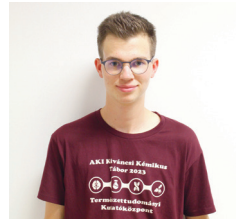
Tarnóczy Márton



Takács Márton



Fekete Balázs



Szabó Barnabás



Bencze Máttyás



Katreiner Kira Luca



Szabó Orsolya



Krámlí Petra



Lengyel Judit Kata



Hangya Kinga Imola



Skorcov Tünde



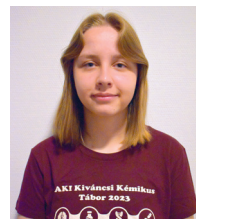
Machlik Míra



Szalai Nikolett



Kopacz Melánia



Petrovánszki Lilla



Tomka Dorottya



Varga Dorina



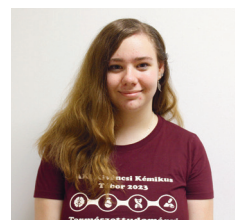
Jánosik Jázmin



Viczkó Csaba Péter



Batka András



Behofsits Maja



Darázs Anna



Káldy Fruzsina



Szilágyi Zsuzsanna Tímea



Gelencsér Artúr

## 3. KUTATÁSI TÉMÁK

### Tüzelőanyag cellák

**Király Tamás Gábor**, Kölcsey Ferenc Főgimnázium, Szatmárnémeti, **Tarnóczy Márton**, Hunyadi Máttyás Gimnázium, Halásztelek, **Takács Márton**, Karinthy Frigyes Gimnázium, Budapest  
Témavezetők: **Dr. Szíjjártó Gábor**, **Dr. Asmaa Selim**

### Polimer keverékek és kompozitok 3d nyomtatása

**Fekete Balázs**, Kecskeméti Bányai Júlia Gimnázium, **Szabó Barnabás**, Lóczy Lajos Gimnázium, Balatonfüred, **Bencze Máttyás**, Tamási Áron Gimnázium, Székelyudvarhely  
Témavezetők: **Romsics Imre**, **Ferdinánd Milán**

### Polimer gélek kémiája

**Katreiner Kira Luca**, Cisztréci Rend Nagy Lajos Gimnázium, Pécs, **Szabó Orsolya**, Báthory István Elméleti Líceum, Kolozsvár  
Témavezetők: **Sármezey Bence**, **Budai Eszter Anna**, **Bajcsi Áron**

### Extracelluláris vezikulák vizsgálata

**Krámlí Petra**, ELTE Trefort Ágoston Gyakorló Gimnázium, Budapest, **Lengyel Judit Kata**, Keszthelyi Vajda János Gimnázium  
Témavezetők: **Dr. Gaál Anikó**, **Bebesi Tímea**, **Ilyés Kinga**, **Dr. Mihály Judit**

### Röntgensugár mint nano-mérőőr

**Hangya Kinga Imola**, Kecskeméti Bányai Júlia Gimnázium, **Skorcov Tünde**, Budai Cisztréci Szent Imre Gimnázium  
Témavezetők: **Dr. Varga Zoltán**, **Dr. Wacha András**

### Rat-ical art: alkossunk remekműveket idegsejtekből és antitestekből

**Machlik Míra**, Pécsi Janus Pannonius Gimnázium, **Szalai Nikolett**, Zalaegerszegi Kölcsey Ferenc Gimnázium  
Témavezető: **Bod Réka**, **Tóth Estilla**

### Ráktérapiás gyógyszercélpont és DNS-módosító enzimfehérjék nyomon követése gyógyszerkezelt vastagbélrák sejtvonalon

**Kopacz Melánia**, Csiky Gergely Főgimnázium, Arad, **Petrovánszki Lilla**, Kisvárdai Bessenyei György Gimnázium és Kollégium  
Témavezetők: **Dr. Békési Angéla**, **Holub Eszter**

### Az agy biológiai életkorának becslése MRI felvételek alapján mesterséges intelligencia (MI) segítségével

**Tomka Dorottya**, Békásmegyeri Veres Péter Gimnázium, **Varga Dorina**, Debreceni Csokonai Vitéz Mihály Gimnázium  
Témavezetők: **Hermann Petra**, **Simon Ádám**, **Nárai Ádám**, **Dr. Vakli Pál**

### Szerves molekulák vizsgálata NMR spektroszkópiával

**Jánosik Jázmin**, Révai Miklós Gimnázium és Kollégium, Győr, **Viczkó Csaba Péter**, ELTE Apáczai Csere János Gyakorló Gimnázium, Budapest  
Témavezetők: **Dr. Turczel Gábor**, **Teski Tamara**, **Balterer Bence**

### ABC multidrogtranszporterek hatása a gyógyszerkezelések hatékonyságában

**Batka András**, Pannonhalmi Bencés Gimnázium és Szakkollégium, **Behofsits Maja**, Soproni Szent Orsolya Római Katolikus Gimnázium  
Témavezető: **Dr. Telbisz Ágnes**, **Bodnár Anikó**

### Új, potenciálisan bioaktív molekulák előállítása és jellemzése

**Darázs Anna**, Révai Miklós Gimnázium és Kollégium, Győr, **Káldy Fruzsina**, ELTE Bolyai János Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium, Szombathely  
Témavezetők: **Kollár Levente** és **Dr. Kovács Péter**

### „Ugráló gének” a sejtbiológiai kutatásokban

**Szilágyi Zsuzsanna Tímea**, Bolyai Farkas Elméleti Líceum, Marosvásárhely, **Gelencsér Artúr**, Budapest V. kerületi Eötvös József Gimnázium  
Témavezetők: **Némethy Kornélia**, **Dr. Orbán Tamás**





# 4. PROGRAM

## július 9. vasárnap

**15:00-17:00** Diákok érkezése a Baár-Madas Református Gimnázium kollégiumába  
**17:00-20:00** Ismerkedés, csapatépítés Csákváry-Kiss Nóra pszichológus vezetésével  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Megbeszélés

## július 10. hétfő

**9:00-10:00** Kutatótábor megnyitó  
Köszöntő: Dr. Tompos András Anyag- és Környezetkémiai Intézet igazgató  
Ismeretterjesztő előadás: Dr. Mihály Judith: Infravörös szinképelemzés: a csillagoktól az orvostudományig  
**10:00-10:30** Durkó Sándor László: tűz- és balesetvédelmi oktatás  
**10:30-12:00** Látogatás a Természettudományi Kutatóközpont laboratóriumaiban  
**12:00-13:00** Ebéd  
**13:00-13:30** Csoportfotó  
**13:30-17:00** Kutatómunka  
**17:30-20:00** Az ELTE Természettudományi Múzeum Biológiai és Őslénytani kiállítása, illetve az ELTE Ásvány- és Kőzettár megtekintése Dr. Sente István vezetésével  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Projektfeladat készítése



## július 11. kedd

**9:00-11:00** Látogatás a Természettudományi Kutatóközpont laboratóriumaiban  
**11:00-17:00** Kutatómunka (közben ebéd)  
**18:00-20:00** Beszélgetés egyetemistákkal a továbbtanulási lehetőségekről  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Projektfeladat készítése



## július 12. szerda

**9:00-11:00** Látogatás a Természettudományi Kutatóközpont laboratóriumaiban  
**11:00-17:00** Kutatómunka (közben ebéd)  
**18:00-20:00** Diák-témavezető sportmeccsek  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Projektfeladat készítése

## július 13. csütörtök

**9:00-14:00** Richter Gyógyszergyár látogatás (közben ebéd)  
**15:00-18:00** Kutatómunka  
**18:00-20:00** Gellért-hegyi séta  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Projektfeladat készítése



## július 14. péntek

**9:00-9:30** Látogatás a BME laboratóriumaiban  
**9:30-12:00** Kutatómunka  
**12:00-13:00** Ebéd  
**13:00-14:30** Készülés a prezentációkra  
**14:30-18:30** Miniszimpózium (közben állófogadás a kutatótáborozók és témavezetőik részére)  
**18:30-19:00** A kutatótábor Dr. Tompos András igazgató zárja  
**20:00-21:00** Vacsora  
**21:00-22:00** Projektjáték

## július 15. szombat

**11:00-ig** Diákok távozása a kollégiumból

# 5. MINISZIMPÓZIUM

14:30-14:35 **A miniszimpóziumot megnyitja: Dr. Tompos András** igazgató, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

14:35-16:05 **Anyag- és szerves kémiai szekció** vezeti: **Dr. Demeter Attila** tudományos tanácsadó

14:35-14:50 **Király Tamás Gábor, Takács Márton és Tarnóczy Márton**  
**Tüzelőanyag cellák**  
Témavezetők: **Dr. Szijjártó Gábor és Dr. Asmaa Selim**

14:50-15:05 **Skorcov Tünde és Hangya Kinga Imola**  
**Röntgensugár mint nano-mérő**  
Témavezetők: **Dr. Varga Zoltán, Dr. Wacha András**

15:05-15:20 **Jánosik Jázmin és Viczkó Csaba Péter**  
**Szerves molekulák vizsgálata NMR spektroszkópiával**  
Témavezetők: **Dr. Turczel Gábor, Teski Tamara, Balterer Bence**

15:20-15:35 **Darázs Anna és Káldy Fruzsina**  
**Új, potenciálisan bioaktív molekulák előállítása és jellemzése**  
Témavezetők: **Kollár Levente és Dr. Kovács Péter**

15:35-15:50 **Fekete Balázs, Bencze Mátyás és Szabó Barnabás**  
**Polimer keverékek és kompozitok 3D nyomtatása mérnöki alkalmazásokhoz**  
Témavezetők: **Romsics Imre és Ferdinánd Milán**

15:50-16:05 **Katreiner Kira Luca és Szabó Orsolya**  
**Polimer gélek kémiája, kísérletek gumimacival és társaival**  
Témavezetők: **Sármezey Bence, Budai Eszter Anna, Bajcsi Áron**

16:05-16:40 **Uzsonna szünet, állófogadás**

16:40-18:10 **Biológiai és idegtudományi szekció** vezeti: **Dr. Tantos Ágnes** tudományos főmunkatárs

16:40-16:55 **Szilágyi Zsuzsanna Tímea és Gelencsér Artúr**  
**„Ugráló gének” a sejtbiológiai kutatásokban**  
Témavezetők: **Némethy Kornélia, Dr. Orbán Tamás**

16:55-17:10 **Batka András és Behofsits Maja**  
**ABC multidrogranszporterek hatása a gyógyszerkezelések hatékonyságában**  
Témavezető: **Dr. Telbisz Ágnes, Bodnár Anikó**

17:10-17:25 **Krámlí Petra és Lengyel Judit Kata**  
**Extracelluláris vezikulák vizsgálata**  
Témavezetők: **Dr. Gaál Anikó, Bebesi Tímea, Ilyés Kinga, Dr. Mihály Judith**

17:25-17:40 **Machlik Míra és Szalai Nikolett**  
**Rat-ical art: alkossunk remekműveket idegsejtekből és antitestekből**  
Témavezetők: **Bod Réka és Tóth Estilla**

17:40-17:55 **Kopacz Melánia és Petrovánszki Lilla**  
**Ráktérapiás gyógyszer-célpont és DNS-módosító enzim-fehérjék nyomonkövetése gyógyszerkezelt vastagbélrák sejtvonalon**  
Témavezetők: **Dr. Békési Angéla, Holub Eszter**

17:55-18:10 **Tomka Dorottya és Varga Dorina**  
**Az agy biológiai életkorának becslése MRI felvételek alapján mesterséges intelligencia segítségével**  
Témavezetők: **Hermann Petra, Nárai Ádám, Simon Ádám, Dr. Vakli Pál**

18:10-18:30 **Kutatótábor zárás és értékelés**  
**Nagyné Dr. Bereczki Laura** szervező, Anyag- és Környezetkémiai Intézet  
**Dr. Tompos András** igazgató, Anyag- és Környezetkémiai Intézet





# 6. DOLGOZATOK

## Tüzelőanyag-cellák

**Tarnóczy Márton**

Hunyadi Mátyás Általános Iskola, Gimnázium és Alapfokú Művészeti Iskola, Halásztelek

**Takács Márton Tibor**

Karinthy Frigyes Gimnázium, Budapest

**Király Tamás Gábor**

Kölcsey Ferenc Főgimnázium, Románia, Szatmárnémeti

### Témavezetők:

**Dr. Szijjártó Gábor** tudományos munkatárs

**Dr. Asmaa Selim** tudományos segédmunkatárs

### Kutatócsoport:

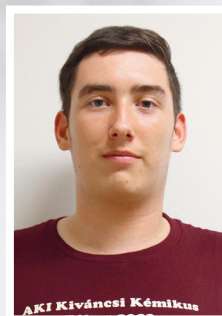
Megújuló Energia Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

### Mik is a tüzelőanyag-cellák és hogyan működnek?

A tüzelőanyag-cellák olyan berendezések, amelyek kémiai energiát közvetlenül alakítanak át elektromos energiává. Többféle tüzelőanyag-cella típus létezik, mi a munkánk során a protoncserélő membrános tüzelőanyag-cellákkal (lásd: 1. ábra) foglalkoztunk (angolul Proton Exchange Membrane Fuel Cell - PEMFC), melyek tüzelőanyaga a hidrogén. A PEMFC-k gyakorlati jelentőségét az adja, hogy olyan nagy teljesítmény leadására is alkalmasak, ami az akkumulátoroknál már nem lehetséges gazdaságosan.

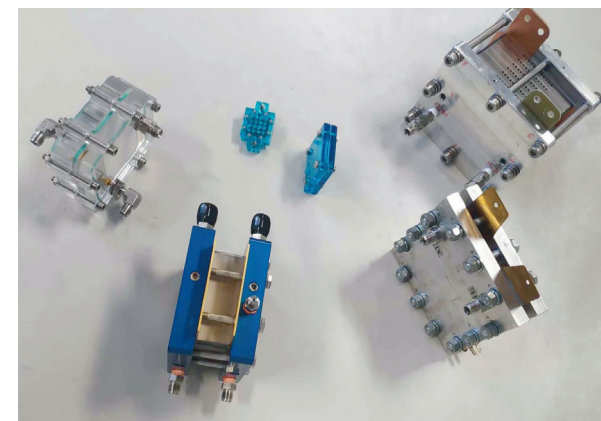
A működéséhez a hidrogénen kívül oxigén is szükséges, melyekből az elektromos energia mellett víz keletkezik. A cella belseje egy anód és egy katód térből áll, melyet az úgynevezett membránelektrod-együttes (angolul Membrane Electrode Assembly - MEA) választ el. A MEA a protoncserélő membránból, a két oldalán található katalizátorrétegből és az azokon

található gázdifúziós rétegekből (angolul Gas Diffusion Layer - GDL) áll. A hidrogén az anód térbe vezetve a katalizátorréteg segítségével oxidálódik, így hidrogénion és elektron keletkezik. A hidrogénion (proton) a membránon keresztül átdiffundál a katód térbe. A membrán az elektronokat nem ereszt át, ezért azok megkerülik a membránt: a szénpapíron, vagyis a gázdifúziós rétegen keresztül a bipoláris lemezre, majd az áramszedőre kerülnek. Innen az elektronok, az áramszedő lapokból a kábeleken át a fogyasztóhoz jutnak, onnan pedig további vezetékkel végül vissza a katód térbe. Ott a fogyasztóról érkező elektronok a katód katalizátorréteg segítségével a membránon átdiffundáló protonokkal és az ide betáplált oxigénnel vízzé egyesülnek. A víz egy része megnedvesíti a membránt, a maradék pedig távozik a rendszerből gőz formájában. A protoncserélő membránok számára fontos a nedvesség, mert szárazon rosszul működnek.



### Tüzelőanyag-cellák a mindennapokban:

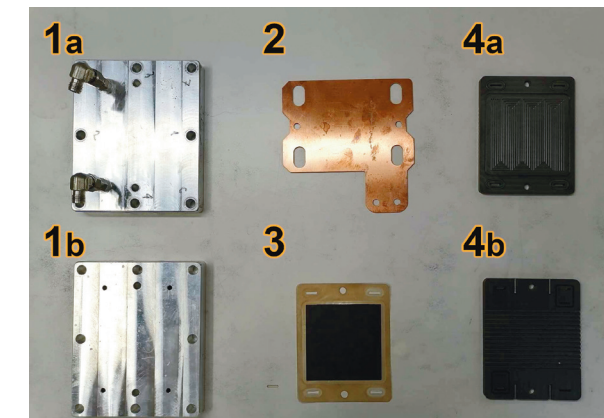
A celláknak számos olyan tulajdonsága van, ami miatt alkalmazásuk előnyösebb a kémiai energia hagyományos átalakító berendezéseire képest: kiemelkedő a hatásfokuk (60%, vagy fölötte), nem tartalmaznak mozgó alkatrészt (mechanikai kopásból fakadó problémákkal nem kell számolni), illetve működés közben nem bocsátanak ki káros anyagokat (mivel az egyetlen keletkező melléktermék a víz). Az egyedüli környezetterhelő tulajdonsága az előállításából; döntően a protoncserélő membránként használt Nafion polimer gyártásából adódik. A cella működéséhez egyszerűen hidrogénre és oxigénre van szükségünk. Szerencsénkre az emberiség rendelkezik egy kiváló oxigén forrással, ami nagyon egyszerűen el is érhető számunkra: a minket körülvevő légkör. A levegő helyett a cella katódjára az oxigén tisztán is betáplálható, amivel a teljesítmény jelentősen növelhető (ahogy a kutatásunkban később be is mutatjuk). A kísérletekben használt 50 cm<sup>2</sup>-es egység képes volt az 1 V-os feszültség és 30 A-es áramerősség stabil megteremtésére is. A tüzelőanyag-cellás technológia jelenleg a járműiparban szerez magának egyre nagyobb figyelmet. Számos autómobilban (pl.: Toyota Mirai) alkalmaznak már ilyen rendszereket, nem is beszélve a buszokról, amiket ma már a tömegközlekedés során igénybe is vehetünk (Solaris Urbino 12 Hydrogen).



1. ábra: Különböző méretű PEM tüzelőanyag-cellák

### Tüzelőanyag-cellák felépítése

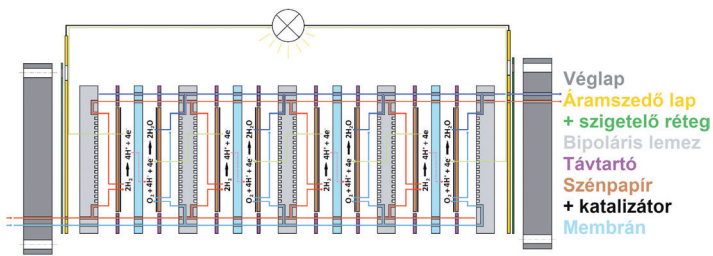
Ahogy a 2. ábrán is látható, a tüzelőanyag-cella a következő alkatrészből állhat: (1) Véglapokból, (2) Áramszedő lemezekből, (3) Membránelektrod-Együttesből (MEA), (4) Bipoláris lemezekből (A mi bipoláris lemezeinket két fél alkotta).



2. ábra: A tüzelőanyag-cellánk alkatrészei

A tüzelőanyag-cella nagy előnye, hogy egy kötegben egyszerre több MEA-t is el lehet helyezni, ezzel növelve teljesítményét. Ebből eredően vannak alkatrészek, melyek többször is előfordulnak egy kötegben belül. Képzeljük el a szerkezetet úgy, mint egy szendvicset: A véglapok a két kenyér, az áramszedők a vaj és köztük van a töltelék. A tölteléket alkotja a MEA és az azt körülvevő két-két bipoláris lemez. A tölteléket elméletben bármennyiszer ismételve egymásra pakolhatjuk. Egy MEA névleges feszültsége 1V és ahány MEA-t tartalmaz a köteg, lényegében annyi V érhető el. A MEA felületének nagysága pedig meghatározza, hogy mekkora áramerősség lehet a cellán, vagy a kötegben (a MEA-k számától függetlenül). A feszültség és az áramerősség szorzata fogja megadni az elektromos teljesítményt. A 3. ábrán egy 4 MEA-s cellaköteg felépítése látható, amely a cellák működését is szemlélteti. Az ábra segítségével megérthetjük, hogy a bipoláris lemez miért bipoláris, mivel annak egyik oldalán az oxigén redukálódik (katódként viselkedik), másik oldalán pedig a hidrogén oxidálódik (anódként viselkedik).





3. ábra: 4 MEÁs cellaköteg felépítése és működése

A bipoláris lemezek feladata a gázok egyenletes eloszlása a gázdifúziós elektródokon (GDE), valamint az elektronok vezetése a GDE és az áramszedők között. A gázok szállításához a bipoláris lemezek felületén a legkülönbözőbb geometriájú áramlási csatornák kialakítása lehetséges.

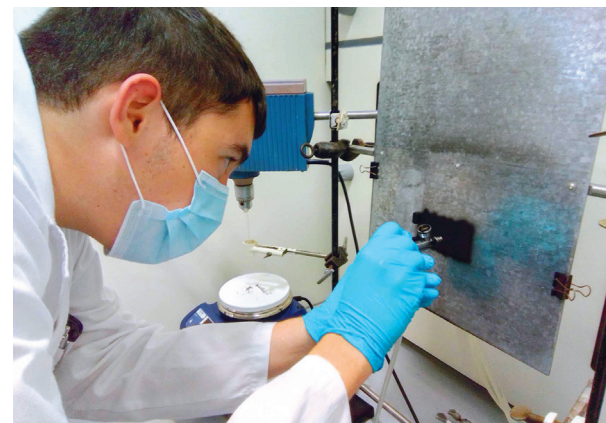
Fontos, hogy a közismert étkezési szendvicsekkel ellentétben a tüzelőanyag-cellákat fokozatosan, egyenletesen elosztott erővel össze kell nyomni a megfelelő tömítés érdekében. Ez a művelet kulcsfontosságú, mivel a nem megfelelő tömítés gázszivárgáshoz vezet, ami a cella teljesítményének csökkenését, vagy rosszabb esetben robbanást okozhat. Az összenyomás a véglapok segítségével történik, amelyhez az összehúzó csavarok kapcsolódnak.

### MEA elkészítése, cella összeállítása

A szénpapírra festékszóró pisztollyal (AB-200 Airbrush – Conrad) ráfújtuk a katalizátor-elegyet (ez az ún. spray-coating módszer, lásd: 4. ábra), melynek aktív komponense a platina volt. A szénpapírra  $0,15 \text{ mgPt/cm}^2$  mennyiséget vittünk fel. A katalizátorral ellátott szénpapírt hívjuk gázdifúziós elektródnak (GDE). Ebből az elektródból kettő kell, hogy majd közé lehessen préselni a protoncserélő membránt. A szénpapír azon tulajdonságát használjuk ki, hogy nagy porozitása, így a gázok könnyen átjutnak a felületén a katalizátorhoz, és emellett elektromosan vezető is, tehát az elektronok áramlását is biztosítani tudja a membrán felületével érintkező katalizátorréteg és a bipoláris lemezek között.

A tüzelőanyag-cellák működése nagyban függ a membrán minőségétől. A MEA elkészítéséhez egy előre elkészített Nafion membránra fűthető présel ráréseltük a gázdifúziós elektródokat és az azok körül lévő távtartókat. A távtartók azért szükségesek, mert a membrán szélessége nagyobb, mint az elektródoké. Így ahhoz, hogy elérjük az egyenletes felszínt, az elektródok köré távtartókat tettünk. A préselést présforma segítségével  $120^\circ\text{C}$ -on  $4,5 \text{ t}$  nyomáson 3 percig végeztük. A művelet után a kész MEÁt a présformában hagytuk lassan kihűlni.

A cellát egy erre a célra kialakított szerelőállványon állítottuk össze. 2 db  $50 \text{ cm}^2$  aktív felületű MEA-ból álló rövid cellaköteget (short stack) építettünk fel. A bipoláris lemezek anyaga grafit volt. A cella részei között a tömítést cserélhető Viton70 (halogéntartalmú hő- és vegyszerálló szintetikus gumi) O-gyűrűkkel biztosítottuk. A véglapok egyenletes összehúzásához fokozatosan növeltük a nyomatékot a csavarokon, egészen  $4 \text{ Nm}$ -ig, ami az 5. ábrán látható. Ez után a kész cellát összekapcsoltuk a teszter berendezéssel.



4. ábra: GDE készítése (spray-coating)



5. ábra: A tüzelőanyag-cella összerakása

### Tüzelőanyag-cellás mérések

A saját tüzelőanyag-cellánk elkészítése után a teszter berendezés segítségével méréseket végeztünk, hogy tudjuk működését jellemezni. A teszter biztosítja a cella gázellátást a megfelelő hőmérsékleten, nyomáson és áramlási sebességgel, valamint a termelődő áram elvételét, a feszültség és áramerősség mérését. A teszteren a következő mérési beállításokkal dolgoztunk:

Cellahőmérséklet:  $80^\circ\text{C}$ , katódgáz:  $\text{O}_2$ , áramlási sebesség:  $300 \text{ ml/perc}$ , páratartalom:  $30 \%$ , nyomás:  $230 \text{ kPa}$ , anódgáz:  $\text{H}_2$ , áramlási sebesség:  $300 \text{ ml/perc}$ , páratartalom:  $50 \%$ , nyomás:  $250 \text{ kPa}$

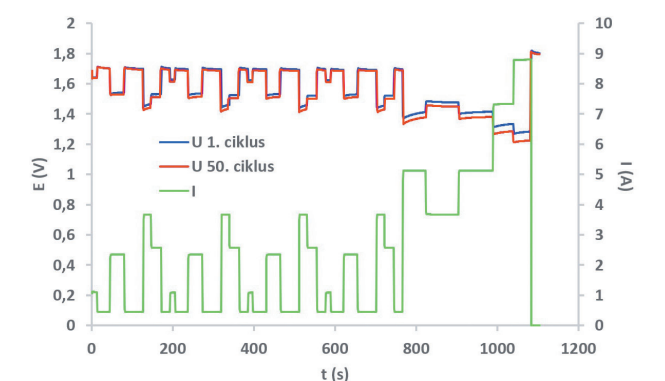
Meg kellett győződnünk róla, hogy jól van összerakva a cella, nem szivárog (tartja a nyomást) és működik-e egyáltalán, vagyis van-e nyílt áramköri potenciál, amikor a katódon és az anódon a megfelelő gáz áramlik, de még nincs áram. (Működött;  $1,779 \text{ V}$ -ra állt be, ahogyan az a 6. ábrán is látható). Ez után aktiváltuk a cellát, amelynek során a feszültséget beállítjuk egy állandó, alacsonyabb értékre és várjuk, hogy az áram beálljon egy állandó értékre. Az aktiválás feszültsége  $400$  vagy  $600 \text{ mV}$  egy MEA esetén. Mi  $600 \text{ mV}$ -ot használtunk, tehát a teszteren  $1200 \text{ mV}$ -ot állítottunk be, mivel 2 db MEÁt mértünk, cellaköteggént sorba kötve. Az aktiválás célja egyrészt a gázdifúziós elektródok tisztítása az összeállítás során esetlegesen belekerülő szennyeződésektől, másrészt gázáramlási csatornák kialakítása a GDE felületén.



6. ábra: Nyílt áramköri potenciál ellenőrzése

A tüzelőanyag-cellákat legpontosabban a róluk felvett polarizációs (U-I) görbék alapján jellemezhetjük, amelyeken a cella feszültségét ábrázoljuk az áramerősség, vagy az áramsűrűség függvényében. A görbék felvételéhez mi olyan programot használtunk, amelyben az áramerősséget változtattuk. Nyílt áramköri potenciálról ( $0\text{A}$ ) indultunk, majd  $2$  percenként  $1\text{A}$ -rel növeltük az áramot addig, amíg a feszültség  $800 \text{ mV}$  alá nem süllyedt (a teljes cellaköteg feszültségét néztük). A tüzelőanyag-cellán egy méréssorozat keretében azt vizsgáltuk, hogy a különböző működési paraméterek (a nyomás, valamint a katód gáz  $\text{O}_2$  tartalma) változtatása hogyan befolyásolja a polarizációs görbét.

A cella élettartama kulcsfontosságú a gyakorlati felhasználás szempontjából, ezért a MEÁk degradációját is mértük, amelyhez egy EU szabványos protokollt használtunk. Ezt eredetileg tüzelőanyag-cellás járművek teszteléséhez fejlesztették ki. A mérés lényege, hogy a cellán lefuttatunk egy  $16,4$  órás programot (DLC – Dynamic Load Cycle), amely  $50$  db ismétlődő ciklusból áll, ahogyan az a 7. ábrán is látható. Magát a MEA degradációját lényegében ezzel gyorsítjuk, illetve idézzük elő. A protokoll szerint egy ilyen típusú és időtartamú terhelés a cellán annak felel meg, mint amikor egy tüzelőanyag-cellás jármű  $550 \text{ km}$ -t tesz meg (ami benzinmotoros autónál kb. az egy tankolással megtehető út hossza). Az  $50$  ciklusos protokoll előtt és után is polarizációs görbét vettünk fel. Mindkettőnél leolvastuk a legnagyobb mért áramsűrűséghez tartozó feszültséget és ezek különbségét elosztottuk a  $16,4$  órával, így megkaptuk a cellák degradációjának az értékét mikroV/h egységben.

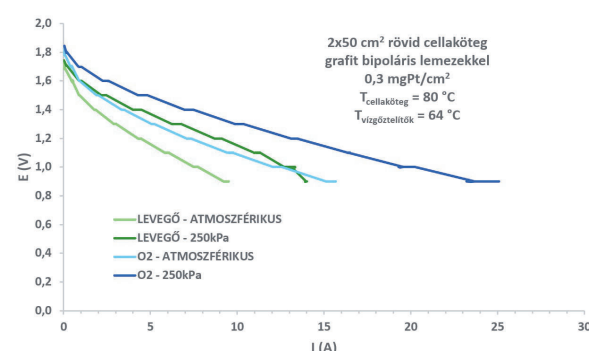


7. ábra: A degradáció létrehozásához használt Dynamic Load Cycle program



## Eredmények és értékelésük

A 8. ábrán a különböző mérési beállításokkal felvett polarizációs görbék láthatóak. A katódon levegőt (21V/V% O<sub>2</sub>) valamint tiszta oxigént (100V/V% O<sub>2</sub>) használtunk. A várakozásnak megfelelően tiszta O<sub>2</sub>-ben ugyanahhoz az áramerősség értékhez nagyobb feszültség tartozott, mint amikor csak sűrített levegőt engedtek a cellapárra. A levegő esetén a nitrogéntartalom lényegében feleslegesen van jelen, emiatt kevesebb O<sub>2</sub> jut a cellára és rosszabb lesz a teljesítmény.



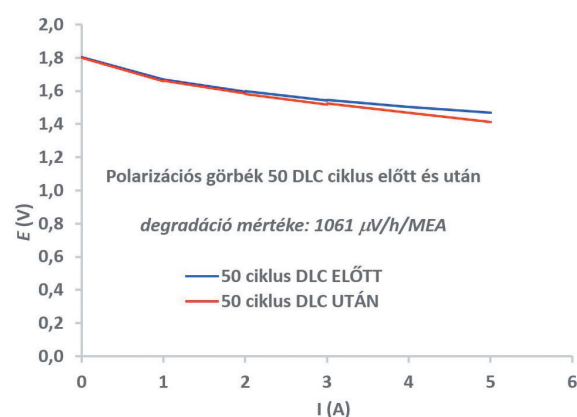
8. ábra: A katódi gáz O<sub>2</sub> tartalmának, illetve a cellában lévő túlnyomásnak a hatása a polarizációs görbére

A másik változó paraméter a nyomás beállítása volt. A világosabb színű görbék esetén nem adtunk túlnyomást a cellára; a gázok abból légköri nyomáson távozhattak. A sötét görbék esetében 250 kPa túlnyomás volt a rendszerben, amit a cella utána elhelyezkedő hátsónyomás-szabályzó szelep segítségével állítottunk be. Látható, hogy a túlnyomás megnövelte a cella teljesítményét, ami érthető, mivel ez mindkét oldalon a gázok gyorsabb elreagálását, tehát hatékonyabb elektrokémiai reakciót eredményezett.

A 9. ábrán látható, hogy a degradáció meghatározása során a várakozásnak megfelelően a DLC program lefuttatása után a cellakötegnek kis mértékben romlott a teljesítménye, mivel az ott mért polarizációs görbe a kezdetben mért alatt fut. A cellaköteg degradációjának értéke a 16,4 órás fárasztás (DLC) után:

Polarizációs görbék I max (5A) értékéhez tartozó feszültségek:  
1,5041V (előtte)  
1,4693V (utána)  
DLC teszt időtartama: 16,4h  
MEÁk száma: 2 db

Ebből az 1 db MEÁra eső degradáció értéke:



9. ábra: Cellaköteg degradációjának meghatározása

## Kutatómunka jövője

A tüzelőanyag-cellák számos esetben megállják a helyüket (ahogy a működő cellás buszok és autók is bizonyítják), de a kialakításukkal és működésükkel kapcsolatban sok olyan részterület van, amelyeket kutatva új, jobb eredményeket; hatékonyabb, gazdaságosabb, üzembiztosabb működést érhetünk el.

Először is, a tüzelőanyag-cellák egyik főbb tulajdonsága, hogy a MEÁk száma és aktív felületük nagysága együttesen meghatározzák a cellaköteg teljesítményét és a méretét is. A fejlesztés célja itt a minél vékonyabb bipoláris lemezek előállítása (hogy ugyanakkora cellaköteg-térfogattal nagyobb feszültséget érjünk el), illetve a bipoláris lemezek optimális áramlási geometriájának a kialakítása (amivel a MEÁk áramsűrűsége növelhető).

Másodszor, jelenleg a rendelkezésre álló hidrogént legnagyobb részét földgázból, gőzreformálással állítják elő. Ennek hátránya az, hogy a kinyert hidrogén tartalmazni fog szén-monoxidot, mely a MEA működését

károsítja, mivel lemérgezi a katalizátort. Ezt úgy lehet kiküszöbölni, ha nagyobb hőmérsékleten működtetjük a tüzelőanyag-cellát, vagy ha a MEÁkhoz szén-monoxid tűrő katalizátorokat tervezünk. A vízbontással történő hidrogén előállítás szélesebb körű elterjedése szintén megoldást jelenthetne, mivel az nem tartalmaz CO-t.

Harmadszor, a protoncserélő membrán főbb komponense a Nafion, melynek előállítása környezetszennyező hatással jár. Ha a tényleges célunk a környezet kímélése, akkor érdemes más alternatívát találni.

Végezetül, a hidrogén nagy mennyiségű tárolása egyelőre nem gazdaságos. Két lehetőség van: a fém-hidrides tartályok, vagy pedig a szálerősített kompozit alapú tároló egységek fejlesztése. A szálerősített kompozitos palackok több hidrogént képesek tárolni, viszont kinyeréséhez nyomásátalakító szükséges. A fém-hidrides tartályba kevesebb hidrogén tölthető, viszont az rögtön a felhasználási nyomáson fog rendelkezésre állni; nem kell hozzá visszaalakító reduktor.

## Köszönetnyilvánítás

Az öt nap alatt számos hasznos tudással lettünk gazdagabbak. Nemcsak a tüzelőanyag-cellákat ismertük meg alaposabban, hanem a kutatói világba is betekintést nyertünk. Mindhárman jobb jövőképet kaptunk a kémia világában és a tábor vége óta vissza is sírjuk a kutatólaborban töltött időt. Utólag is szeretnénk köszönetünket kinyilvánítani a témavezetőknek és az AKI Kíváncsi Kémikus tábor szervezőinek, akik mérhetetlen szaktudásuknak és türelmüknek hála egy felejthetetlen élményben lehetett részünk.





# Polimer keverékek és kompozitok 3D nyomtatása mérnöki alkalmazásokhoz

**Fekete Balázs**

Kecskeméti Bányai Júlia Gimnázium

**Szabó Barnabás**

Lóczy Lajos Gimnázium, Balatonfüred

**Bencze Mátyás**

Tamási Áron Gimnázium, Székelyudvarhely

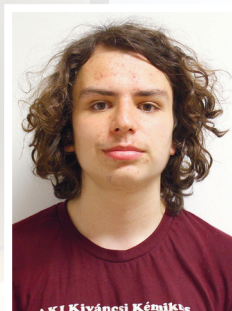
**Témavezetők:**

**Romsics Imre** kutatómérnök

**Ferdinánd Milán** PhD hallgató

**Kutatócsoport:**

Polimerfizikai Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

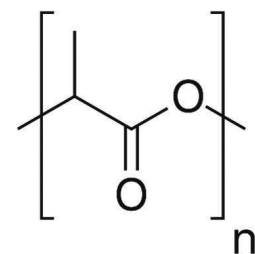


## Bevezető

Munkánk során a fő célunk az alapvető műanyagipari feldolgozótechnológiákba, a mérnöki tervezésbe és a műanyagipari mérések folyamataiba való betekintés volt. A munkánk végére kiderítettük, hogy milyen adalékanyagokkal dolgozhatunk a lebomló műanyagok gyártásakor, továbbá megismertük ezeknek az adalékanyagoknak a műanyagtermékek minőségére gyakorolt hatását. A tábor végén saját termékek tervezésével és 3D nyomtatásával is foglalkoztunk.

## Polimerek

Témánk legfontosabb alapköveként nem szabad megfedkezni a polimerekről, hiszen a műanyagipar elkerülhetetlen részei ezek a molekulák és azok szerkezeti ismerete.



1. ábra: Politejsav (PLA) szerkezeti képlete

A polimer kifejezés alatt makromolekulák halmazát értik. A makromolekulák nagyszámú kis-molsúlyú molekula, monomerek összekapcsolódásával jönnek létre. Ilyen monomer például az 1. ábrán látható tejsav is, mely a kutatásunk egyik központi eleme volt. Az egyedi makromolekulák energetikai okok miatt a gombolyodott alak elérésére törekszenek; nagy méretük miatt pedig több ponton is összegabalyodnak egymással, fizikai térhálópontokat hozva létre. Magas hőmérsékleten nyírás hatására a fizikai térhálópontok egy része lebomlik, a makromolekulák nagy mozgékonyosságuk miatt elmozdulnak egymáshoz képest, a polimer alakíthatóvá válik. A témánk során ily módon feldolgozható, ún. hőre lágyuló műanyagokkal foglalkoztunk.

## Műanyag vagy polimer?

A polimerhez a gyártás során kis mennyiségben szinte mindig adnak adalékanyagokat. Az adalékanyagokat tartalmazó polimert műanyagoknak nevezik.

## Mintakészítés

A tábor első kutatással eltöltött napját az ELTE TTK épületének műanyagipari laboratóriumában kezdtük, ahol egy kétcsigás extruder



2. ábra: Granulátum

és egy granulálóegység segítségével PLA/falistsz kompozit alapanyagot készítettünk. Ezt követően a BME H épületében a már előre elkészített PLA/PBAT keverékből, tiszta PLA-ból és a PLA/falistsz kompozit alapanyagból fröccsöntéssel szabványos próbatesteket állítottunk elő.

Ahogy a 2. ábrán is látszik, granulátumokat készítettünk egy kétcsigás extruder segítségével, amely azért fontos, mert az egycsigás extruderrel ellentétben ez homogén terméket állít elő, így csak ilyennel lehet megfelelő granulátumot létrehozni. A homogenitás jelen esetben a falistsz szerepe miatt volt fontos, hiszen a PLA-ban eloszlatva fontos volt, hogy mindenhol gyakorlatilag ugyanolyan mennyiségű kompozitanyag jusson. Érdekes megjegyezni továbbá, hogy a falistsz betöltése, mint az a 3. ábrán is látszik, az extruder egy későbbi szakaszán kerül be főkomponensünk mellé az extruderben.



3. ábra: Falistsz betöltése az extruderbe

Mivel az extruder a rajta lévő fejjel csak hosszú szálak gyártását tudja kivitelezni, ezért a szálakat egy, a 4. ábrán is látható granulálóegységbe adagoltuk, amely körülbelül azonos méretű darabokat vág le a szálból.



4. ábra: Granulálóegység

Az így kapott granulátumot bezacsizóztunk, fóliahegesztő segítségével lezártuk. A granulátumot ezután átvittük a BME épületébe, ahol nekikezdünk a termékkészítésnek. A granulátumunkat az 5.a ábrán látható fröccsöntőgép segítségével a mérésekhez szükséges 5.b ábra piskótaformába fröccsöntöttük, így a PLA/falistsz kompozit termékünk, a PLA és PLA/PBAT keverék termékeinkkel együtt már majdnem teljesen készen álltak a mérések elvégzéséhez.



5a. ábra: Fröccsöntőegység





5b. ábra: A piskóta alakú próbatetek

### Mérési előkészületek

A szakítószilárdság méréséhez a próbatetünk tökéletes volt, azonban a törési mérés elvégzéséhez még szükség volt pár további előkészülethez. Ezek közül az egyik a piskóta-forma kiszélesedő fej részének levágása volt, amire a töréstesztet végző gép kialakítása miatt volt szükség. Ezután a töréstesztet formákba 2 milliméter mélyen háromszög alakú mélyedést vágtunk, amely a törés során, mint mesterséges hibahelyként működik. Ezt a folyamatot a 6. ábrán láthatjuk. Erre azért volt szükség, hogy minden törés esetében a tönkremenetel irányított, megismételhető legyen.



6. ábra: Törési minták előkészítése

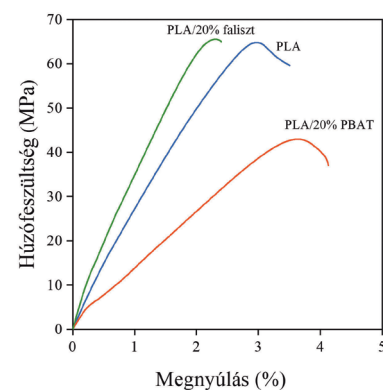
### Mérések Szakítás

Az előkészített mintáinkon méréseket végeztünk, első vizsgálataink, a szakító- és törési vizsgálatok eredményei gyakorlatilag azonnal megvoltak.



7. ábra: A szakitógép

Az anyag szakítószilárdságának nevezzük a tönkremenetelhez tartozó feszültségértéket. Ennél a mérésnél fontos a 7. ábrán látható szakitógép relatíve lassú munkavégzése, mivel az anyag a gyors igénybevételre egészen más mechanikai jellemzőket mutat. Például az ütésállóság mérésénél, a szakítószilárdság mérésével ellentétben, a mechanikai igénybevétel gyakorlatilag pár ms alatt megtörtént. A szakítószilárdságot meghatározó méréseknél azt tapasztaltunk, hogy a különböző adalékanyagok viszonylag nagy mértékben változtatják meg az anyagaink mechanikai tulajdonságait. A 8. ábrán az alapanyagaink szakítógörbéi találhatóak. Látható, hogy a PLA/faliszt kompozitunk a sima PLA-hoz képest kisebb mértékben nyúlt meg, de közel azonos erő kifejtésekor szakadtak el. Ezzel ellentétben a PLA/PBAT keverékünk nagyobb nyúlás mellett kisebb kifejtett erő mellett szakadt el. Tehát még a faliszt a termékünket merevebbé, addig a PBAT rugalmasabbá tette. Ugyanezt az eredményt mutatja az 1. táblázat is.



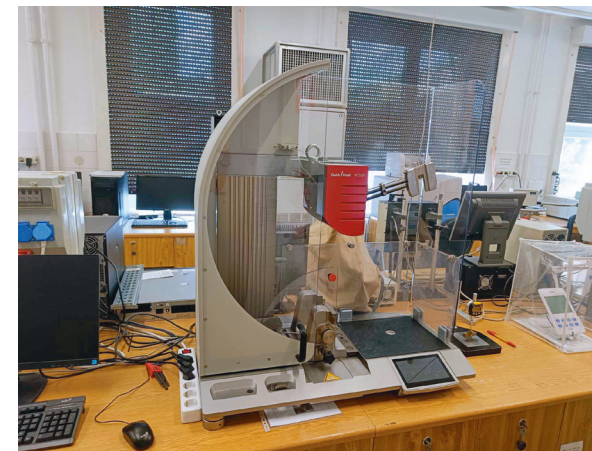
8. ábra: A vizsgált próbatetek szakítógörbéi

Anyag	Modulus (GPa)	Szakítószilárdság (MPa)	Szakadási nyúlás (%)
PLA	3,18	59,69	3,50
PLA/20% faliszt	4,90	65,05	2,40
PLA/20% PBAT	2,31	31,58	4,16

1. táblázat: A vizsgált próbatetek szakítóvizsgálatából származó eredményei

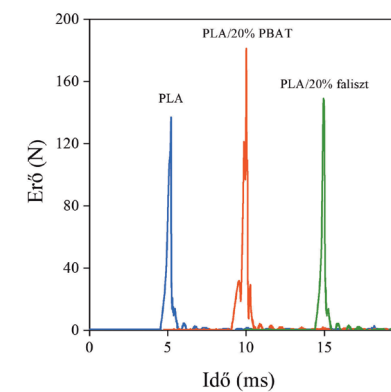
### Törés

Következő mérésenként az ütésállóságot vizsgáltuk meg.



9. ábra: A törőberendezés

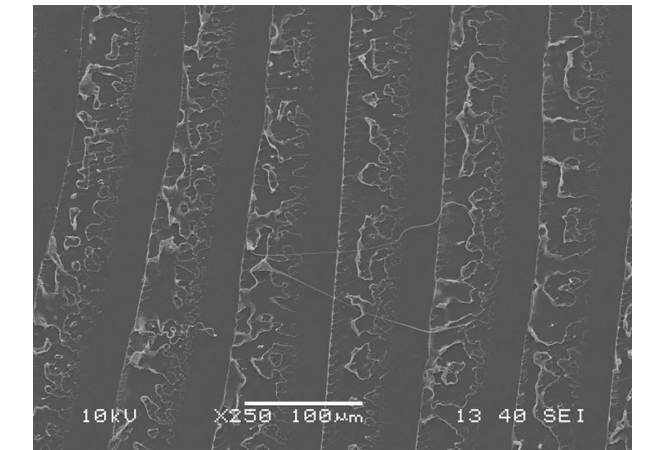
Az ütésállóságot a 9. ábra törőberendezése abból számítja ki, hogy a lendületben lévő kalapács az ütközés során mennyi energiát veszít. A törési energia és a keletkezett új felület hányadosa az ütésállóság, amelyet kJ/m<sup>2</sup> mértékegységben adunk meg. A 10. ábráról és a 2. táblázatról is leolvasható, hogy a PLA/PBAT keverék esetén történt a legnagyobb erő kifejtés a repedés elindulásához, míg a PLA esetében a legkisebb. A 11. a, b és c ábrák a törések közben keletkezett új felszíneket mutatják.



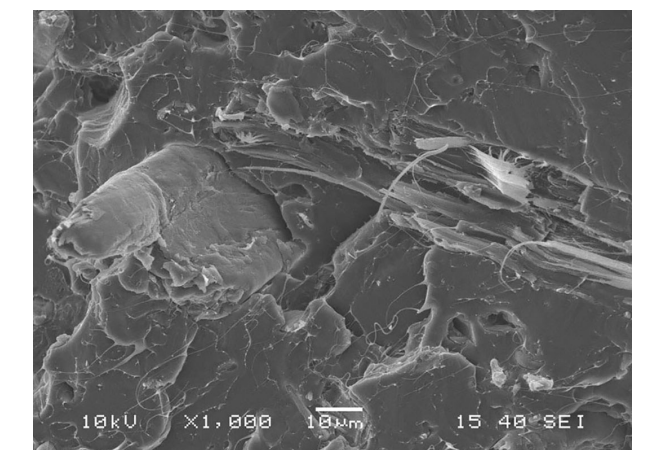
10. ábra: A vizsgált minták törése során mért erő-idő görbék

Anyag	Ütésállóság (kJ/m <sup>2</sup> )	
	átlag	szórás
PLA	2,49	0,31
PLA/20% faliszt	2,70	0,36
PLA/20% PBAT	4,01	0,24

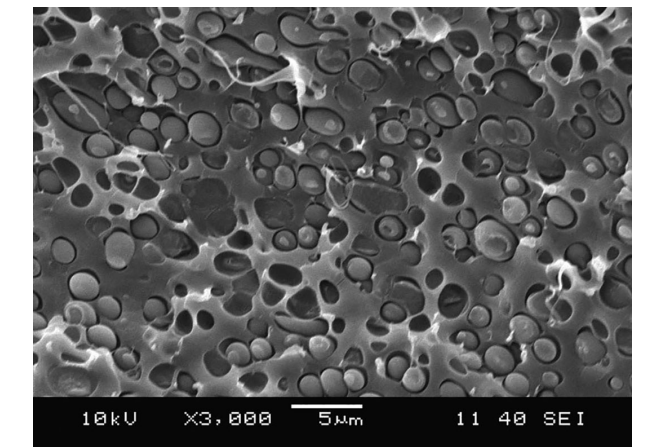
2. táblázat: A vizsgált minták törése során kiszámolt ütésállóság értékek



11a. ábra: A PLA sima felszínének SEM felvétele



11b. ábra: A PLA/20% faliszt kompozit szemcsés felszínének SEM felvétele

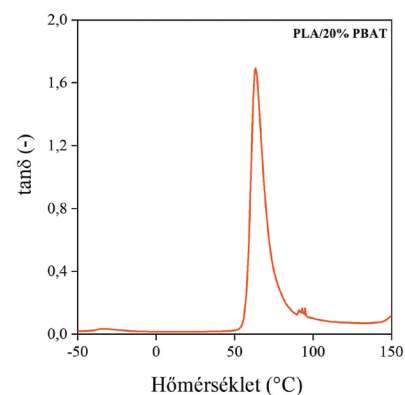


11c. ábra: A PLA/20% PBAT keverék törési felszínének SEM felvétele

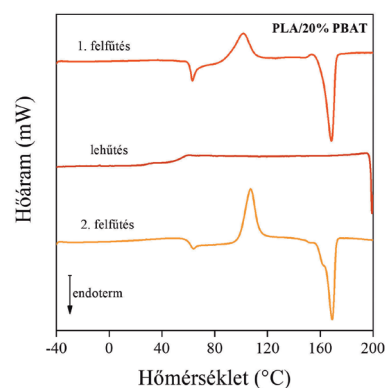


## Termikus vizsgálatok

A következő két mérés a kalorimetrikus, avagy DSC, és a dinamikus mechanikus analízis, avagy DMA vagy DMTA voltak. Ezekkel a módszerekkel az anyagok szerkezeti tulajdonságait vizsgálhattuk, mint például az üvegesedés és a kristályosodás. Ezek alapján, habár ismertük, hogy a PLA/PBAT keverékünk többfázisú, ezt mérésrel is igazolhattuk, hiszen a PLA/PBAT keverék DMTA görbéjén, melyet a 12. ábra mutat, két üvegesedési átmenet is megjelenik. A DSC mérés folyamán felismertük, hogy a keverékünk képes a kristályosodásra, de ezt a fröccsöntés során alkalmazott gyors hűtés miatt nem tapasztaljuk. Ezt a 13. ábrán a 100 Celsius fok feletti csúcsonál ismerhetjük fel.



12. ábra: A DMTA mérés eredménye



13. ábra: A DSC mérés eredménye

## 3D tervezés és nyomtatás

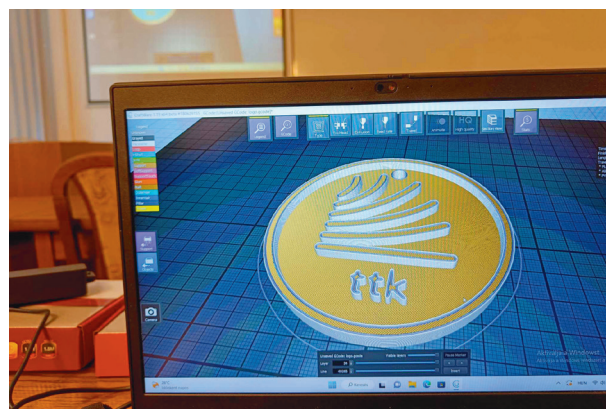
Harmadik munkanapunkon megkezdhattuk a 3D nyomtatással készülő testek modellezését. A választott mintánk, amit megtervez-

hettünk az ELTE TTK logója, illetve egy sárkány volt, amiket kulcstartóként szerettünk volna a későbbiekben használni. A tervezés folyamán két programmal dolgoztunk. Az egyik ezek közül a Blender volt, ami egy közkedvelt, ingyenes és nyílt alkalmazás a 3D modellezések során. A másik programunk a Craftware volt, ami a nyomtatónk saját programja. Ez utóbbival szeleteltük fel és dolgoztuk át a modelljeinket a nyomtató számára is értelmezhető kód formába.



14. ábra: Közös modellezés

A modellezés megkezdéséhez a Blender program alapvető használatának megtanulására volt szükség. A 14. ábrán éppen ezt tettük. Ez kifejezetten nehezen indult, de a későbbiekben egyre könnyebbnek bizonyult. A program alapvető megismerése után már kicsit jobban belerázódtunk a munkafolyamatba és meg is kezdhettük a modellezést. A modellünk henger alapot kapott, amit egy másik hengerrel „kifűrtünk”, így egy tál szerű testet kaptunk. Ennek a testnek az üregébe került az ELTE TTK logója. A kész modellünket a 15. ábra mutatja.

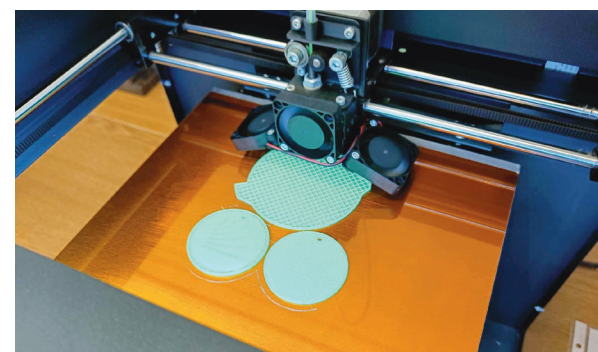


15. ábra: Modellünk a programban

Ezután a kész modellünket STL fájlformátumba exportáltuk, majd a Craftware szoftverben szeleteltük. Ez azért fontos, mert a nyomtató egymásra húzott rétegekből építi fel a termékeinket, ami szükségessé teszi a szeletelés lépését, ahol a modellünket ilyen különböző rétegekre bontjuk. A szoftverben beállított adatok szerint a program automatikusan megtervezi a rétegzés lépéseit és a rétegek egymásra fektetését.

## Nyomtatás megkezdése

Ezután a modell szeletelt gépi kódját a nyomtatóba feltöltve már csak a filament befűzése maradt hátra a nyomtatás megkezdése előtt. Ezt egy, az általunk választott filamenttel el is végeztük, így meg is kezdhettük a nyomtatást. Ezt mutatja a 16. ábra. Ezután a késztermékeinket megvizsgáltuk egy mikroszkóp alatt is, és szemmel látható volt a rétegzési folyamat negatív oldala, miszerint a termékünk egyáltalán nem egy homogén test, hanem inkább összeolvadt szálak összessége, ami nagyban csökkentheti a termékünk minőségét, ahogy ez a 17. ábrán is látszik.



16. ábra: A nyomtatás folyamata



17. ábra: A nyomtatott termékek szerkezete mikroszkóp alatt

## Összegzés

A tábor során megtanultuk, hogy mik is azok a polimerek, illetve az adalékok. Saját kompozitot készítettünk, majd ebből termékeket gyártottunk. Más anyagokból előre legyártott termékekkel összehasonlítva megállapíthattuk, hogy miben és hogyan befolyásolják az adalékanyagok a műanyagunk szerkezetét, minőségét. Megtanultuk a modellezési folyamat különböző lépéseit, és ezt használva saját termékeket gyártottunk egy 3D nyomtató segítségével. Későbbiekben a különböző termékeket megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a nyomtatóval készített termékeink minősége jóval gyengébb a fröccsöntöttekétől, hiszen a fröccsöntés folyamán egy homogén testet kapunk, amely jóval stabilabb a nyomtatás során, szálhúzásos technológiával készített termékekhez képest, melynek egyes szálai közt akár levegő is található. Ezen folyamatok során végig lebomló alapanyagokkal dolgoztunk, így egyben megtanultuk azt is milyen sokféleképpen lehet ezeket az anyagokat kombinálni, felhasználni. Összegezve mondhatjuk azt, hogy rengeteg rendkívül hasznos dolgot tanultunk a táborban, illetve ezt mind egy kiemelkedően jó közegben tehattük, ahol körül voltunk véve sok, rendkívül tehetséges emberrel, ami már önmagában hatalmas élmény volt.





# Polimer gélek kémiája, kísérletek gumimacival és társaival

**Katreiner Kira Luca**  
Cisztréci Rend Nagy Lajos Gimnázium, Pécs

**Szabó Orsolya**  
Báthory István Elméleti Líceum, Kolozsvár

## Témavezetők:

**Budai Eszter Anna** MSc hallgató

**Sármezey Bence** PhD hallgató

**Bajcsi Áron** PhD hallgató

## Kutatócsoport:

Polimer Kémiai Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet



A polimer gélek kémiája izgalmas, emellett rendkívül hasznos terület, amelybe a 2023-as AKI Kíváncsi Kémikus táborban bepillantást nyerhettünk. A tábor során nemcsak a polimerkémia elméleti alapjaival ismerkedtünk meg, hanem saját kezűleg is elkészíthettük őket a laboratóriumban.

A polimerek kovalens kötással összekapcsolódó monomerekből álló makromolekulák, ám nem keverendők össze a műanyagokkal. A műanyagok ipari úton, mesterségesen előállított anyagok, melyek a polimerekből különféle adalékanyagok hozzáadásával készülnek. A polimereket többféle szempont alapján csoportosíthatjuk. Lehet a szerkezetük akár térhálós, mint a bakelit, de akár lineáris is, mint a polietilén. A polimerek nem csak mesterségesen hozhatók létre, de a természetben is találkozhatunk velük, mint például cellulóz.

Továbbá a polimereket csoportosíthatjuk szerkezetük alapján: homopolimerekre vagy kopolimerekre. A homopolimerizáció során egyféle, míg a kopolimerizáció során két vagy többféle monomerekből álló polimer jön létre. Előállítás módja szerint lehet lánc- vagy lépcsős polimerizáció. A láncpolimerizációnál szükségünk van egy iniciátorra, míg a lépcsős polimerizációnál nincs szükség. Ennél a csoportnál a reakció közben kiválhat

egy kisebb molekula. Ebbe a csoportba soroljuk a poliaddíciót és polikondenzációt. A láncpolimerizációnak több fajtája van: gyökös, ionos és koordinatív. Munkánk során térhálós polimereket állítottunk elő gyökös láncpolimerizációval.

A gyökös mechanizmusú láncpolimerizáció során monomer molekulák kapcsolódnak egymáshoz szabadgyökök segítségével. Ezáltal polimereket alkotnak. A szabadgyökök olyan atomok vagy molekulák, amelyeknek párosítatlan elektronjuk van a külső héjon, és ezért nagyon reaktívak. Ezen mechanizmus három fő lépésből áll: iniciálás, láncnövekedés és láncletörés (azon belül lánczáródás).

Az iniciálás során egy gyökképző vegyület (iniciátor) bomlik szabadgyökökre hő, fény, sugárzás, vagy egyéb hatásra. A mi esetünkben ezt egy koiniciátor idézte elő. A koiniciátor egy olyan vegyület, amely segíti az iniciátort a gyök képzésben.

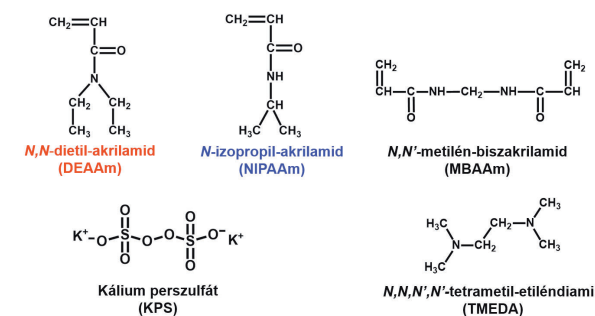
A szabadgyökök reagálnak a monomer molekulákkal, és így makrogyököket képeződnek. Amelyek további monomer molekulákkal reagálnak, és így a polimer lánc növekedni kezd, tehát a láncreakció elindult. Ez a láncnövekedési fázis.

A lánczáródás során a polimer láncok lezáródnak, amikor két makrogyök egyesül, vagy amikor egy makrogyök elveszíti a párosítatlan elektronját.

Gyökös polimerizációval sokféle polimert elő lehet állítani, például polisztirolt vagy polivinil-kloridot.

Munkánk fő célja volt megismerkedni a polimerkémia használatos eszközökkel, módszerekkel, és előállítani különböző térhálós polimereket. Célkitűzéseink közé tartozott tulajdonságaik szisztematikus vizsgálata különböző összetétel szerint. Majd az így kapott térhálók összehasonlítása mérésekkel, különböző körülmények között: duzzasztás, mechanikai tulajdonság és termoreszponzív tulajdonság vizsgálata.

A minták előállításához az 1. ábrán feltüntetett anyagokat használtuk. Monomerként N,N-dietil-akrilamidot (DEAAM) és N-izopropil-akrilamidot (NIPAAm), keresztkötőként az N,N'-metilén-biszakrilamidot (MBAAm). Iniciátorként kálium perszulfátot (KPS), koiniciátorként pedig N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamint (TMEDA).



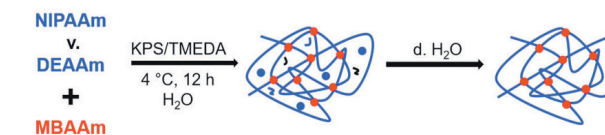
1. ábra: Szintézis során felhasznált anyagok

Az 1. táblázatban látható paraméterek alapján állítottuk elő a különböző mintákat. Ezekben a keresztkötő (MBAAm) arányát változtattuk. A szintézist oldószer, desztillált víz jelenlétében végeztük. A törzsoldatok koncentrációja: cMBAAm = 20 mg·ml<sup>-1</sup>, cKPS = 50 mg·ml<sup>-1</sup>, cNIPAAm = 250 mg·ml<sup>-1</sup>.

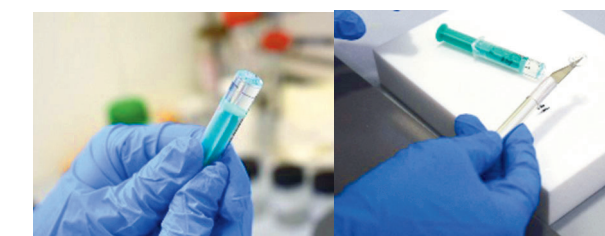
Mintaazonosító	Bemért tömeg (mg)			Bemért térfogat (μl)				
	M	MBAAm	KPS	M	MBAAm	KPS	Víz	
NIPAAm	SZO230711_001	100	1,4	2,4	400	68,1	48,3	484
	SZO230711_002	100	0,9	2,4	400	45,4	48,1	506
	SZO230711_003	100	0,7	2,4	400	34,1	48,0	518
DEAAM	KK230711_001A	100	1,2	2,1	108	60,6	42,9	788
	KK230711_001B	100	0,8	2,1	108	40,4	42,8	809
	KK230711_001C	100	0,6	2,1	108	30,3	42,7	819

1. táblázat: P(DEAAM-I-MBAAm) és P(NIPAAm-I-MBAAm) térhálós polimerek bemérési adatai. A táblázatban az M a monomert jelöli.

A szintézis (2. ábra) 4°C-on, 12 óra alatt végeztük. Am a keletkezett gélek (3. ábra) még tartalmazhattak szennyeződések, el nem reagált monomereket, dimereket, oligomereket, vagy a felhasznált anyagok maradékait. Ezért az elkészült mintákat desztillált vízzel extraháltuk.



2. ábra: A szintézis és extrakció menete.

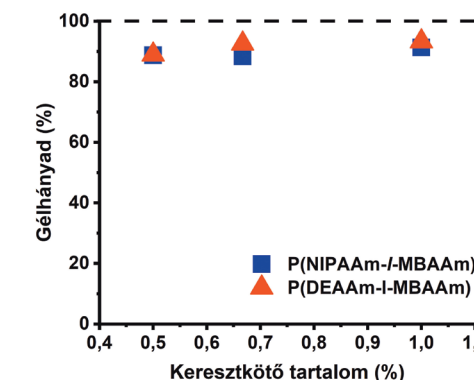


3. ábra: Szintetizált PNIPAAm tartalmú minta (SZO230711\_003) az extrakció előtt (balra) és után (jobbra).

Gélhányad értéket az 1. egyenlet szerint számoltuk ki. Ahol az mbemért az összes bemért reaktáns tömege, és a mext az extrakciós maradék tömege.

$$\text{Gélhányad}\% = \frac{m_{\text{bemért}} - m_{\text{ext}}}{m_{\text{bemért}}} \quad (1)$$

A meghatározott gélhányad értékek (4. ábra) minden mintánál közel 90 %-os értékeket mutatnak, így elmondható, hogy a szintézisek sikeresek voltak.



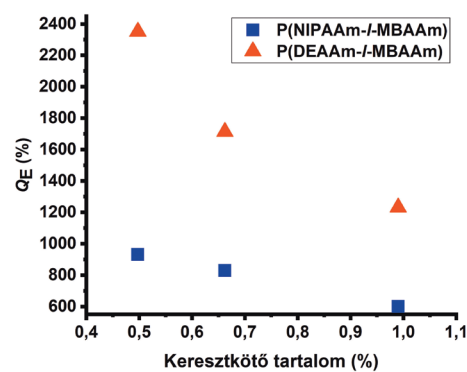
4. ábra: P(DEAAM-I-MBAAm) és P(NIPAAm-I-MBAAm) minták gélhányad értékei különböző keresztkötő tartalom szerint.



A gélek egyensúlyi duzzadásának vizsgálatához a 2. egyenletet segítségével kiszámítottuk a duzzadási fokokat. Ahol az  $m_{duzz.}$  vízben duzzasztott gél tömege, és az  $m_{száraz}$  kiszáritott gél tömege.

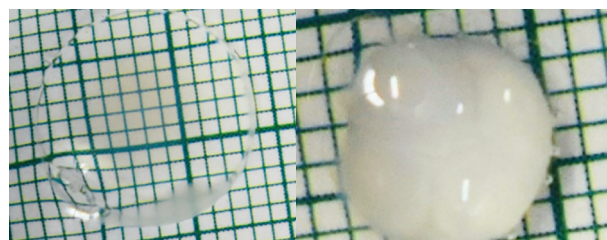
$$Q_e = \frac{m_{duzz.} - m_{száraz}}{m_{száraz}} \quad (2)$$

Amikor az adott polimer már nem képes további oldószerfelvételre, akkor elérte az egyensúlyi duzzadási fokot. A minták egyensúlyi duzzadási fok értékeit ábrázoltuk az összetétel szerint (5. ábra). Jól látható, hogy minél több keresztkötőt tartalmazott a minta, annál kevésbé duzzadt meg az anyag.



5. ábra: P(DEAAm-I-MBAAm) és P(NIPAAm-I-MBAAm) minták egyensúlyi duzzadás értékei különböző keresztkötő tartalom szerint, desztillált vízben duzzasztva.

Ezek után vizsgáltuk a gélek termoreszponzív tulajdonságát. Megfigyeltük, hogy 27 °C-on átlátszóak voltak, majd melegítés hatására, 63 °C-on beopálosodtak és a térfogatuk lecsökkent (6. ábra).

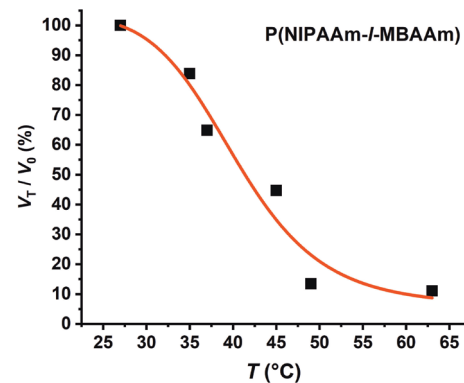
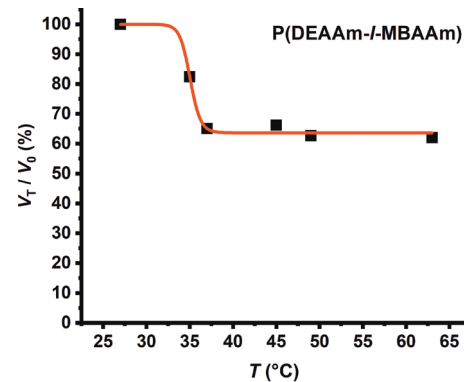


6. ábra: Az SZO230711\_003 minta termoreszponzív tulajdonságának vizsgálata, 27 °C-on (balra) és 63 °C-on (jobbra).

A hőmérséklettől való függést a következőképpen vizsgáltunk. 27 °C-on megmértük a gél metszetének átmérőjét, majd ezt megismételtük a különböző mértékben felmelegített állapotukban is. Ehhez a 3. egyenletet használtuk. Ahol a  $d_T$ : minta átmérője T hőmérsékleten, és a  $d_0$ : minta átmérője 27 °C hőmérsékleten.

$$\frac{V_T}{V_0} = \left(\frac{d_T}{d_0}\right)^3 \cdot 100\% \quad (3)$$

A kapott eredményeket a 7. ábrán ábrázoltuk. A grafikonokból megfigyelhető, hogy melegítés hatására a térfogatarány csökkent.



7. ábra: A KK230711\_001A (fent) és SZO230711\_003 (lent) térfogatváltozás értékei a hőmérséklet függvényében.

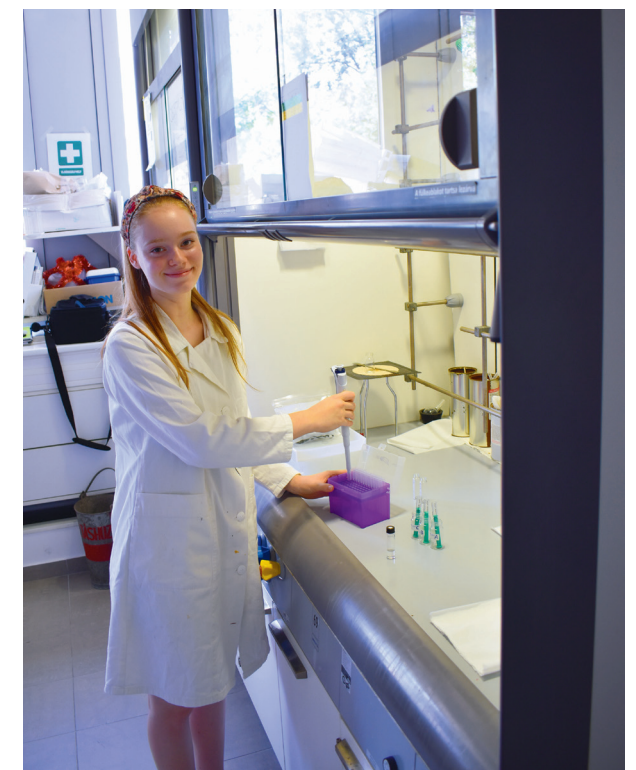
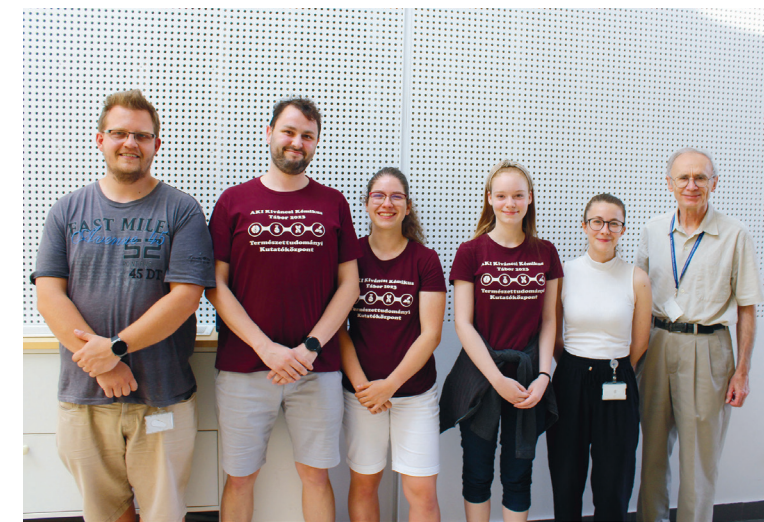
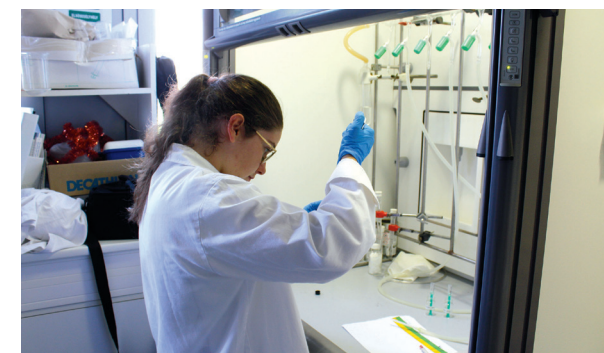
Végül a mechanikai vizsgálat során meghatároztuk a kotérhálók látszólagos rugalmassági modulus értékeit. Ehhez a 4. egyenletet használtuk. Ahol a  $\sigma$ : a mechanikai feszültség, a  $G$ : a Young modulus, és a  $\lambda$ : a relatív deformáció.

$$\sigma = G \cdot \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2}\right) \quad (4)$$

A Neo-Hook törvény alapján a kapott egyenes meredeksége a rugalmassági modulus értékét fogja megadni. A DEAAm-ot tartalmazó minták Young modulus értékei 18,03-36,51 kPa között, a NIPAAm-ot tartalmazó minták értékei 12,89-24,20 kPa között változtak.

Összefoglalásként: a tábor alatt megismerkedhettünk a polimerkémiaiban szükséges előállítási módszerekkel és műszerekkel. Sikeresen előállítottunk 1-1 sorozatban P(NIPAAm-I-MBAAm) és P(DEAAm-I-MBAAm) térhálós polimereket. Majd ezeknek megvizsgáltuk a fizikai tulajdonságaikat: duzzadási, és mechanikai tulajdonságok, termoreszponzív viselkedés.

Ezalatt az egy hét alatt nagyon sok mindent tanultunk. Bepillantottunk, hogy milyen a kutatói élet, mikre kell odafigyeljünk, és mennyi türelmet és elszántságot is igényel ez a munka. Köszönjük szépen a témavezetőinknek, Eszternek, Bencének és Áronnak mindazt, amit abban az egy hétben kaptunk tőlük. És nem utolsósorban szeretnénk köszönetet mondani a tábor szervezőinek, hogy egy ilyen lenyűgöző tábort szerveztek és együtt tölthettük ezt az egy hetet!





# Extracelluláris vezikulák vizsgálata

**Krámlí Petra**

ELTE Trefort Ágoston Gyakorló Gimnázium, Budapest

**Lengyel Judit Kata**

Keszthelyi Vajda János Gimnázium

**Témavezetők:**

**Dr. Gaál Anikó** tudományos munkatárs

**Bebesi Tímea** PhD hallgató

**Ilyés Kinga** PhD hallgató

**Dr. Mihály Judith** tudományos főmunkatárs

**Kutatócsoport:**

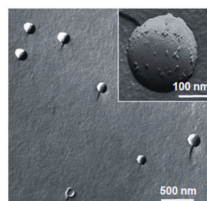
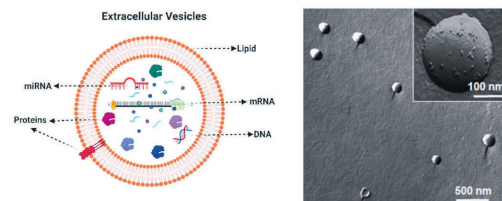
Biológiai Nanokémia Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) az extracelluláris térben található kettős-fosfolipid membránnal határolt sejt eredetű nanorészecskék (1. ábra), melyek kutatása 2010

a káros vagy felesleges anyagokat. Különböző fiziológiás és patológiás folyamatok során megváltozik a sejtek által kibocsájtott vezikulák összetétele és mennyisége, lehetőséget adva a vezikulák különböző testfolyadékokból — például vérből — való izolálása utáni diagnosztikai alkalmazásukra. Emellett - a liposzómához hasonlóan - az extracelluláris vezikulák is alkalmasak lehetnek biokompatibilis hatóanyag-szállításra. Általában méret- és eredet-alapján csoportosítják az EV-eket, de a terminológia még nem univerzálisan elfogadott. Megkülönböztetnek kis, közepes és nagyméretű vezikulákat.

**Célkitűzés**

A 2023-ban megrendezett 13. AKI Kíváncsi Kémikus Kutatótábor keretein belül vörösvértest eredetű extracelluláris vezikulákkal dolgoztunk, melyeket a kutatás elején mi izoláltunk vérmintából. Kitűzött célunk volt méretük és összetételük vizsgálata; az átlagos hemoglobin szint, az átlagos fehérje tartalom, illetve a spektroszkópiai fehérje-lipid arány mérése. A kutatás során azt is vizsgáltuk, hogy a vezikulaképződést elősegítő



**1. ábra:** Extracelluláris vezikulák sematikus ábrája (forrás: <https://www.researchgate.net/profile/Madhan-Jeyaraman/publication/361998395/figure/fig2/AS:1177793194921999@1657819188839/Composition-of-extracellular-vesicles-A-typical-EVs-consists-of-Lipids-proteins.png>) és elektronmikroszkópos felvétele

után indult robbanásszerű fejlődésnek. A test szinte összes sejtje bocsájt ki vezikulákat, amelyek excitózissal vagy a sejtmembrán lefűződésével kerülnek a sejt közötti térbe. Szerepük szerteágazó: fontos résztvevők az intercelluláris kommunikációban, képesek a sejtek között mikroRNS-t szállítani, valamint az extracelluláris vezikulák kibocsájtása arra is alkalmat ad, hogy a sejt eltávolítsa magából



**2. ábra:** CL-2B méretkizárásos kromatográfás oszlop töltése

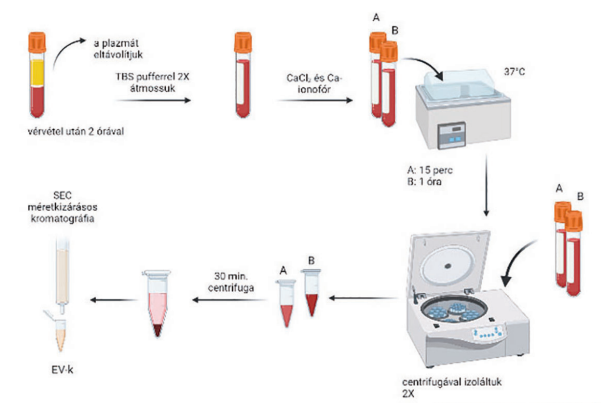
kalcium-ionofóros indukálás időtartama hogyan befolyásolja a vezikulák összetételét és minőségét.

**Előkészületek**

Az izolálás megkezdése előtt előkészítettük a későbbiekben felhasznált anyagokat és eszközöket. Két puffer oldatot — egy TBS puffer oldatot (TRIS és NaCl sók; pH=7,5) készítettünk, illetve PBS puffer oldatot (dinátrium-foszfát és NaCl sók; pH=7,4) mértünk ki — és egy CaCl<sub>2</sub> oldatot (c=100mM) készítettünk, valamint két CL-2B oszlopot is (2. ábra) töltöttünk, amiket az izolált vezikulák tisztítása során használtunk fel.

**Az EV-k izolálása**

A kísérletek során két mintával dolgoztunk. A vezikulák izolálása (3. ábra) két órával a vér-



**3. ábra:** CL-2B méretkizárásos kromatográfás oszlop töltése

vétel után kezdődött, így a vörösvértesteknek volt ideje leülepedni a vérvételi csövek aljára. Első lépésként a felülúszó rész, a plazma került eltávolításra. Ezt követően a mintákat térfogatuk háromszorosára hígítottuk



**4. ábra:** Vörösvértest koncentrátumok

TBS pufferoldattal (4. ábra), majd centrifuga segítségével átmostuk őket. A felülúszó részt eltávolítottuk, majd az atmoszt még egyszer megismételtük. A következő lépés a vörösvértestek vezikulakibocsátásának indukálása volt: ugyanannyi kalcium-klorid oldatot és ugyanannyi kalcium ionofórt adtunk mindkét mintához, így növelve a kalciumionok vörösvértestekbe való bejutásának mértékét. Ezek után a két mintát különböző időtartamokra inkubátorba helyeztük 37°C-on: az egyiket 60 percre, a másikat 15 percre. Az inkubálás idejének leteltével újfent centrifugáltuk a mintákat, leülepítve a vörösvértesteket. Ez alkalommal a felülúszó résszel dolgoztunk tovább, azt helyeztük át egy-egy újabb eppendorf csöbe. A két mintát magas fordulatszámon 30 percig centrifugáltuk, így különválasztva a vezikulákat és a felesleges



**5. ábra:** Centrifugálás utáni pelletek – vörösvértest eredetű vezikulák



felülúszót. A minták alján vöröses-rózsaszín pelleték voltak láthatóak (5. ábra). A mintákhoz a felülúszó eltávolítása után PBS puffert adtunk és felszuszpendáltuk benne a pelleteket (6. ábra). Az izolálás utolsó lépé-



6. ábra: A felszuszpendált vezikula minták

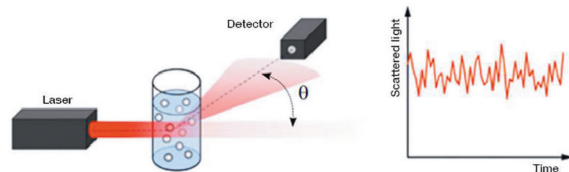
seként CL-2B géloszloppal SEC méretkizárásos kromatográfiát végeztünk, mely célja a vezikulák megtisztítása a náluk kisebb méretű szennyezőktől (pl. oldott fehérjék). Ennek eredményeként kaptuk meg a már elemzésre kész mintákat (7. ábra).



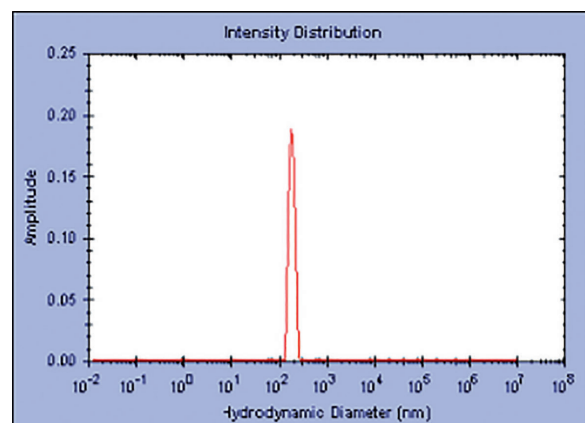
7. ábra: Elemzésre kész, tisztított vezikula minták

### Dinamikus fényszórásmérés (DLS)

A dinamikus fényszórásmérés egy olyan analitikai módszer, amely lehetővé teszi a nanométeres tartományú részecskék méretének és méreteloszlásának vizsgálatát. A technika a részecskék Brown-mozgásán alapul. A részecskékről szétszóródó fény intenzitását méri lézer segítségével (8. ábra). A két minta vizsgálata során monodiszperz eloszlást tapasztaltunk (9. ábra), azaz csak egy mérettartományba eső részecskéket

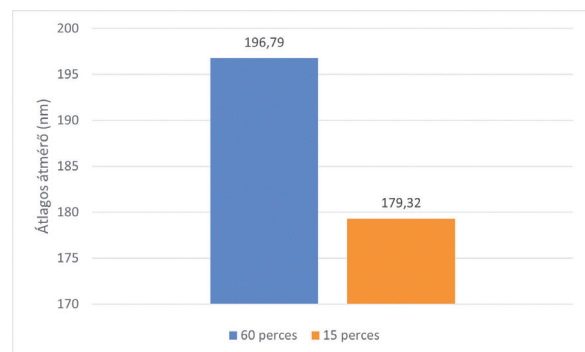


8. ábra: Dinamikus fényszórás (DLS) sematikus ábrája (forrás: [https://wiki.anton-paar.com/fileadmin/wiki/images/The\\_principles\\_of\\_dynamic\\_light\\_scattering/dls\\_2\\_new.JPG](https://wiki.anton-paar.com/fileadmin/wiki/images/The_principles_of_dynamic_light_scattering/dls_2_new.JPG))



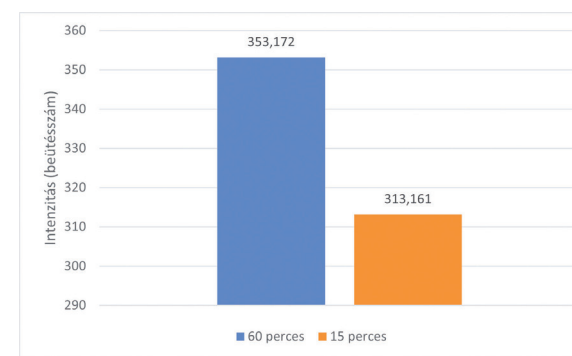
9. ábra: EV minta méreteloszlása (DLS eredmény)

mértünk, melyek a 200 nanométeres tartományba estek. Az átlagos átmérő a két minta esetében kissé eltérő volt: 196,79 nm a 60 percig inkubáltban, és 179,32 nm a 15 percig inkubáltban (10. ábra). A mérés során



10. ábra: EV minták átlagos méretei (DLS eredmény)

az intenzitást (beütésszámot) is vizsgáltuk, ami arányos a koncentrációval és molekulatömeggel. Az első mintában 353,172 értéket mértünk, míg a másodikban valamivel kevesebbet, 313,161-t (11. ábra). Az eredmények igazolták, hogy a minták EV-eket tartalmaznak, hiszen a részecskék a megfelelő mérettartományba estek. A mérések arra is

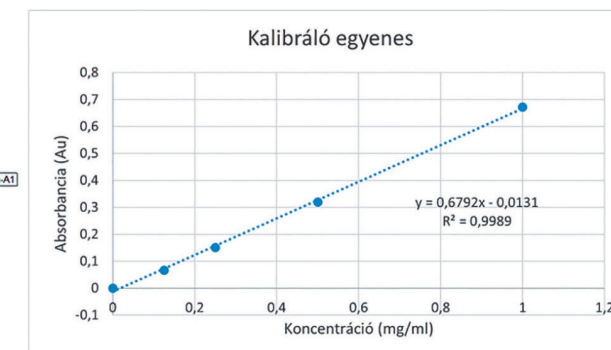
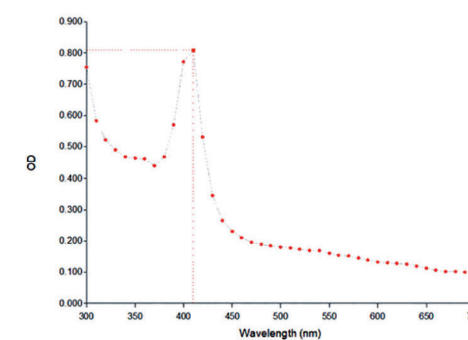


11. ábra: DLS mérés során mért beütésszámok (intenzitás)

utalnak, hogy a kalcium-ionofóros indukálás időtartamának növelésével nő a vezikulák átlagos átmérője és koncentrációja.

### EV-k hemoglobinszintjének mérése (UV-Vis spektroszkópia)

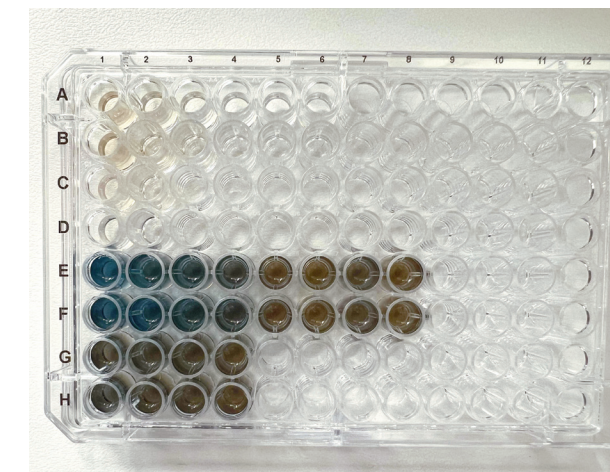
A hemoglobintartalom meghatározásához UV-látható spektroszkópiát alkalmaztunk. Első lépésként egy hemoglobin törzsoldatot készítettünk, amelynek felvettük az UV-Vis spektrumát és meghatároztuk a maximum elnyelési tartományának hullámhosszát ( $\lambda=410$  nm) (12. ábra, bal). A törzsoldatból ismert koncentrációjú oldatsorozatot hígítottunk, majd 410 nm hullámhosszon mérve mértük az abszorbanciát, így készítve egy kalibráló egyenest (12. ábra, jobb). Ezt követően a 15 perces és 60 perces mintákat eredeti, valamint kétszeres térfogatra hígítva is megmértük. Az átlagos hemoglobinszint az eredeti 60 perces mintában 0,442 mg/ml, illetve a 15 percesben 0,222 mg/ml volt. (kép.15) Tehát a kalcium ionofóros indukálás idejének növelésével nőtt a minták hemoglobintartalma, ami szintén a megnövekedett vezikula-koncentrációra utal.



12. ábra: Hemoglobin törzsoldat UV-Vis spektruma (bal) és a kalibráló egyenes (jobb)

### Bradford kolorimetriás módszer

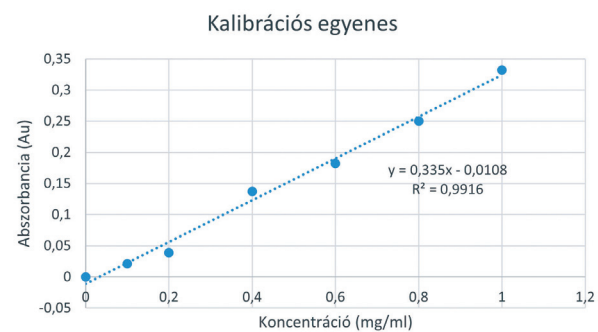
A Bradford kolorimetriás módszerrel végzett vizsgálatnak a célja a mintákban található fehérjék koncentrációjának kimutatása indirekt módon. A módszer a Coomassie-festék abszorbanciáján alapul. A Coomassie-festék ugyanis fehérjéhez kötődve színváltozást eredményez (13. ábra). Első lépésként



13. ábra: Bradford kolorimetriás módszer (96 lyukú tálca)

egy fehérje törzsoldatot készítettünk, ezt pedig ismert koncentrációkra hígítottuk. Az így kapott fehérjeoldatokhoz hozzáadtuk a festékünket és UV-látható spektroszkópiával mérve egy kalibrációs egyenest készítettünk (14. ábra). Ezek után a két mintát, a 15 perceset és a 60 perceset festettük meg: először az eredeti hígítással, majd a minták kétszeresre hígításával. Az így kapott értékekből a kalibrációs egyenes segítségével ki tudtuk számolni a minták átlagos fehérjekoncentrációját. Ez a 60 perces mintában 0,32 mg/ml, a 15 percesben pedig 0,25 mg/ml volt. A hemoglobintartalommal összevetve



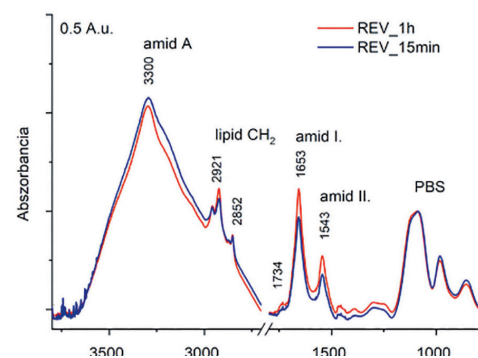


14. ábra: Bradford kolorimetriás módszer kalibráló egyenese

a látszólagos kevesebb összfehérjetartalom a módszer indirekt voltával magyarázható. A detektáláshoz használt festék valószínűleg a vezikulák belsejében lévő úgynevezett „cargo” fehérjékkel nem lépett reakcióba, így a valósnál kisebb koncentrációt mérünk.

### Infravörös (FT-IR) spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópia a molekulákat alkotó funkciók csoportok karakterisztikus rezgéseit detektálja. Extracelluláris vezikulák esetében a fehérjék jellegzetes rezgési sávjainak mérése által (15. ábra) - egy előzete-



15. ábra: A vezikula mintákról kapott IR szinképek

sen elkészített kalibráló sorozat segítségével - direkt módon meghatározható a fehérjekoncentráció. A 60 perces minta fehérjekoncentrációja 0,77 mg/ml, a 15 perces mintaé pedig 0,40 mg/ml volt. Az IR spektrumban jól elkülönülnek a fehérjékre (peptidkötés) és a lipidekre (acil szénlánc -CH<sub>2</sub> csoportjai) jellemző IR elnyelési sávok, így egy úgynevezett spektroszkópai fehérje/lipid arányt is meg

tudunk állapítani. Ez a spektroszkópai fehérje/lipid arány a hosszabb ideig inkubált mintában kisebb (1,18), mint a 15 perces mintában (1,43), amiből arra lehet következtetni, hogy az EV indukálás időtartama nemcsak a vezikulák méretét és koncentrációját befolyásolja, hanem kémiai összetételét is.

### Összegzés

Az EV-k, bár orvosdiagnosztikai szempontból rendkívül ígéretesnek bizonyulnak, izolálásuk, kimutatásuk és jellemzésük sok szempontból nehézséget jelentenek. Ugyanis ezek a nanorészecskék méretükben és összetételükben is igen különbözőek lehetnek. A kutatásunk célja a vörösvértest eredetű EV-k éppen ezen tulajdonságainak vizsgálata volt, különböző modern analitikai módszerek alkalmazásával. Kifejezetten arra voltunk kíváncsiak, hogy a kalcium-ionos indukálás miként befolyásolja a vezikulák minőségét és mennyiségét. A hosszabb indukálás több és nagyobb átlagos átmérőjű vezikulát eredményezett. A fehérje-lipid arány viszont csökkent az indukálás hosszával. Valószínűleg látszik, hogy a vörösvértestek először fehérjékben gazdagabb vezikulákat bocsájtanak ki (a fehérjétől igyekeztek megszabadulni), később változik a kibocsájtott vezikulák összetétele (16. ábra).

Összegzés	60 perces	15 perces
Átlagos átmérő (nm)	197	179
Átlagos hemoglobin szint (mg/ml)	0,442	0,222
Átlagos fehérjetartalom (Bradford) (mg/ml)	0,32	0,25
Átlagos fehérjetartalom (FT-IR) (mg/ml)	0,77	0,4
Spektroszkópai fehérje-lipid arány	1,18	1,43

16. ábra: A vezikula minták jellemzése: összefoglaló táblázat

A tábor során betekinthettünk a laboratóriumi munkába, és sokféle analitikai módszert, műszert ismertünk meg. Ezúton szeretnénk köszönetet mondani témavezetőinknek és a tábor szervezőinek az itt eltöltött élményekben és tudományos munkában egyaránt dús fantasztikus hétért.



## Röntgensugár mint nanomérőrúd

Hangya Kinga Imola  
Kecskeméti Bányai Júlia Gimnázium

Skorcov Tünde  
Budai Ciszterci Szent Imre gimnázium

### Témavezetők:

Dr. Wacha András tudományos munkatárs

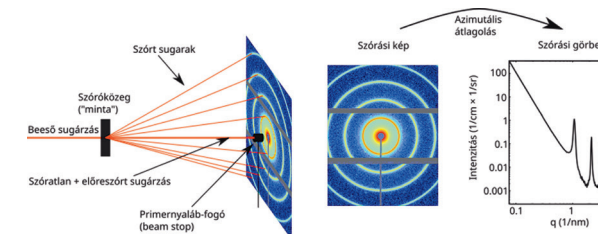
Dr. Varga Zoltán kutatócsoport vezető

### Kutatócsoport:

Biológiai Nanokémia Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

### Szórás kísérletek

Kutatótábori témánk a kisszögű röntgenszórás köré épült. De mi is az a szórás? Az ilyen kísérleteknél általában az anyag szerkezetére vagyunk kíváncsiak, ezért sugárzást engedünk rá. A nyaláb és a minta valamilyen kölcsönhatásba lép egymással és ez alapján a kölcsönhatás alapján tudunk következtetni a minta szerkezetére. Az 1. ábrán láthatjuk,



1. ábra: Egy tipikus szórás kísérlet sémája (balra); a szórás kép és a szórás görbe kapcsolata (jobbra)

hogy ez hogy néz ki a valóságban. Amikor a nyaláb találkozik a mintával és szétszóródik, a detektor ezt szórt sugarat érzékeli, és ez alapján készít egy szórás képet. A szórás kép körszimmetrikus és nehezen kezelhető, ezért

ebből még kell csinálni egy szórás görbét, amiről sokkal könnyebben leolvashatók az adatok.

### Kisszögű röntgenszórás (SAXS)

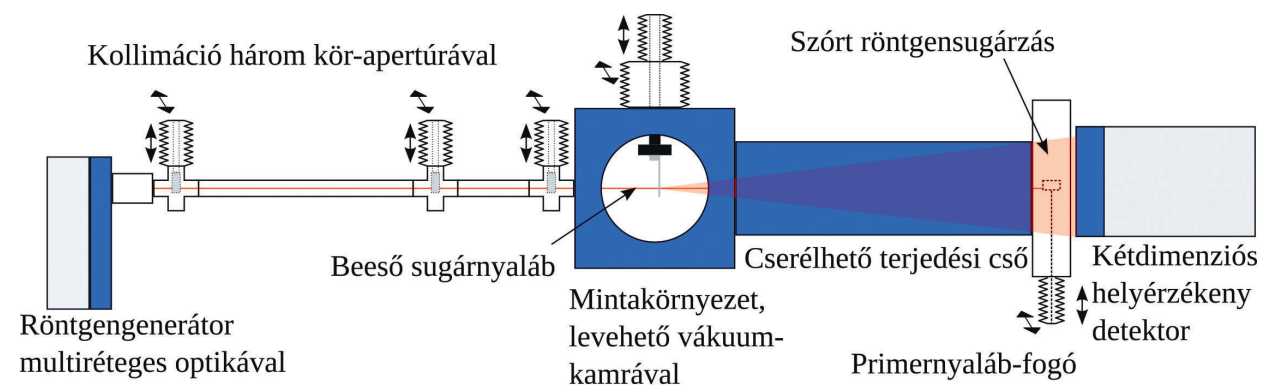
Mint minden mérési módszernek, a kisszögű röntgenszórásnak is megvannak az előnyei, illetve hátrányai. Egyik legnagyobb előnye, hogy metrológiai (méréstudományi) szempontból igen pontos adatokat nyújt, illetve a mérési eredmények statisztikailag reprezentatívak. Nem invazív eljárás, tehát roncsolásmentes, nem igényel mintaelőkészítést és a mérés során kevesebb műtermék keletkezik. A szubjektív emberi tényezők jól kiküszöbölhetők, például az elektronmikroszkóppal készített felvétellel szemben, ahol a kutatóknak kell saját kezűleg meghúznia a nanorészecské határát. Továbbá kiválóan automatizálható a mérés. A tábor során délután elindítottuk a mérést, éjszakára hagytuk dolgozni és másnap reggelre meg is lettek az eredményeink. Hátránya viszont, hogy a laboratóriumi berendezések esetén hosszú a mérési idő (egy éjszakán át tartott), azonban ez a szink-



rotronoknál akár néhány milliszekundumra is lerövidíthető. Ezenkívül a kisszögű röntgenszórás nem direkt módszer, az eredmények kiértékelése bonyolult. Nem rutin módszer, valamint a komplex, heterogén minták vizsgálatára kevésbé alkalmas.

Az utolsó mintánk a kollagén volt, melyben a rostok elrendeződésére, illetve azok távolságára voltunk kíváncsiak. Kollagént használnak a kozmetikában, a sejtenyésztéshez, valamint az inak és a kötőszövet fontos alkotója is.

### A CREDO berendezés és a méréseink



2. ábra: A CREDO berendezés bloksémája (fönt) és panorámaképe (lent)

A tábor során a méréseinket a TTK-ban található CREDO nevezetű berendezéssel (2. ábra) hajtottuk végre. Hazánkban ez az egyetlen kisszögű röntgenszórás berendezés.

A munkánk során a mérésekhez igyekeztünk olyan mintákat választani, amik mellett, hogy a kisszögű röntgenszórás adta lehetőségeket kihasználják, más tudományterületeken, illetve a mindennapi életben is fontos anyagok. Első mintáink különböző nanorészecskék voltak, melyek átlagos átmérőjére voltunk kíváncsiak. Nanorészecskéket gyakran használnak gyógyszerhordozóként, a tejpor csomósodásának gátlására, de széleskörű ipari felhasználása is ismert. Következő mintánk egy multilamellás vezikula volt, ahol a rétegek közti távolságot mértük meg. Ilyen multilamellás vezikulák a sejtmembránok, illetve különböző gyógyszerhordozók is.



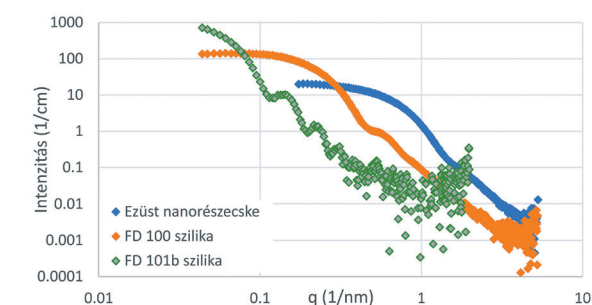
3. ábra: Minták felvétele



4. ábra: Méréseink kiértékelése

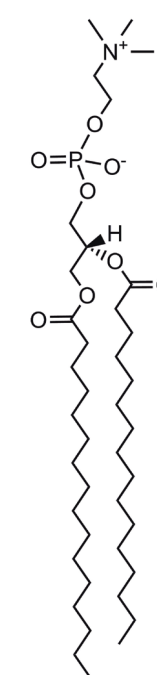
### Nanorészecskék

Három különböző méretű nanorészecskét vizsgáltunk. Mindhárom gömb alakú, ezért a szórás görbéjük nagyon hasonló. Az ábrázolásnál kettős logaritmikus grafikont használtunk, mert erről sokkal könnyebben leolvashatók az adatok, mint a lineárisról. Az y tengelyen az intenzitást mértük, ami arányos a beérkező fotonok számával, az x tengelyen pedig a szögfüggést fejeztük ki a  $q$ -val jelölt, úgynevezett szórás változóval, mely a  $2\theta$  szórás szöggel kapcsolatban van. Mivel  $\lambda$ , a hullámhossz távolság dimenziójú, ezért  $q$  mértékegysége  $1/\text{távolság}$ . Ez összefügg azzal az általános érvényű törvénnyel, hogy a nagy méretű részecskék a kis szögek felé szóródnak, a kis méretűek pedig a nagy szögek felé. Ez jól látszik az ábrán is, mivel az ezüst nanorészecske volt a legkisebb, az FD 101b szilika pedig a legnagyobb. A görbe elejére egy Gauss görbe illeszthető, aminek, ha vesszük a logaritmusát, akkor  $q^2$  függvényében ábrázolva egyenest kapunk. Ez a Guinier közelítés. Ennek az egyenesnek a meredekségéből ki lehet számolni a részecskék átlagos átmérőjét. Az ezüst nanorészecskéknél ez 7,4 nm lett. Az FD 100 és az FD 101b szilikák hivatalos, európai referencia minták, tanúsított részecskemérettel. Nekünk az FD 100 szilika méretére 23 nm jött ki, az FD 101b szilikára pedig 89,5 nm ami az irodalmi 21,8 nm és 87 nm értékekkel nagyon jól egyezik.



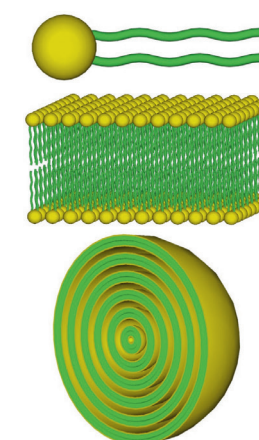
5. ábra: Három nanorészecske-szuszpenzió szórás görbéje

### DPPC multilamellás vezikula



A DPPC (2,3-di (hexadecanoiloxi) propil 2- (trimetilazani) etil-foszfát) egy lipid, kémiaiailag amfipatikus molekula, tehát tartalmaz egy hidofil fejcsoportot és egy hidrofób szénláncot. (6. ábra.). Ez a molekula vízben oldva spontán önszerveződik, így kettős réteg, majd multilamellás vezikula alakul ki, amely egy periodikus, réteges felépítésű képződmény (7. ábra). Ezek a lipid kettősrétegek képezik az élő szervezetek sejtmembránjainak alapját.

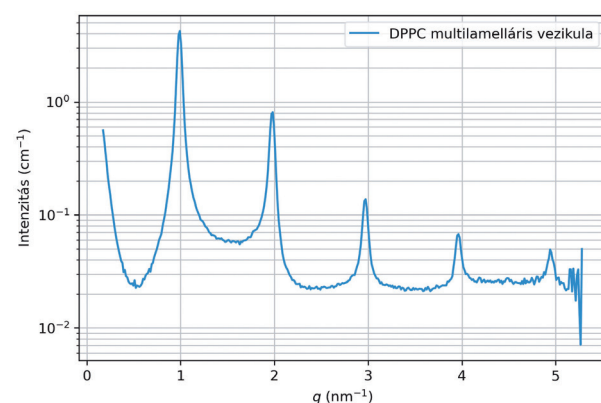
6. ábra: A DPPC molekula képlete



7. ábra: Lipidek önszerveződése: különböző amfipatikus molekula (fent), kettősréteg (középen) és multilamellás vezikula (lent)



A mérés után kapott szórásí gőrbén magas intenzitású, éles csúcsokat figyelhetünk meg (8. ábra), melyekből arra következtethetünk, hogy a szórásnak egy speciális esete, diffrakció történt. Kiszámoltuk, hogy a csúcsok egymástól egyenlő távolságra helyezkednek el (amely a periodikus szerkezet következménye) (1. táblázat), így a Bragg egyenletet alkalmazva ( $q=2\pi/d \cdot n$  ( $n \in \mathbb{N}$ )) ki tudtuk számítani a multilamellás vezikulában a rétegek egymástól való távolságát, ami 6,36 nm-nek adódott.



8. ábra: DPPC multilamellás vezikula szórásí gőrbéje

Csúcs sorszáma ( <i>i</i> )	Csúcs helyzete ( $q_i$ ; nm <sup>-1</sup> )	$q_i/q_1$
1	0,99	1,00
2	1,98	2,00
3	2,97	3,00
4	3,96	4,01
5	4,95	5,01

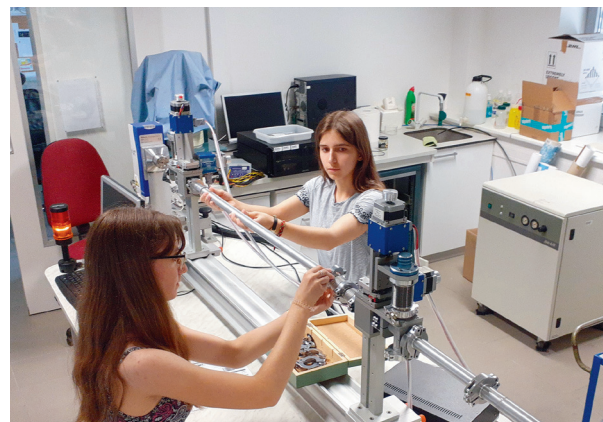
1. táblázat: A DPPC multilamellás vezikula szórásí gőrbéjén megjelenő csúcsok középpontjainak abszolút és relatív helyei

### Kollagén

Az utolsó mintáink kipreparált csirke inak voltak, melyek vizsgálata során a kollagén szerkezetére voltunk kíváncsiak. Továbbá szerettük volna megtudni, hogy az etanolos mosás, illetve a főzés hatással van-e a kollagén szerkezetére. Így 4 mintát készítettünk: nyers-szárított, nyers-mosott, főtt-szárított és főtt-mosott.

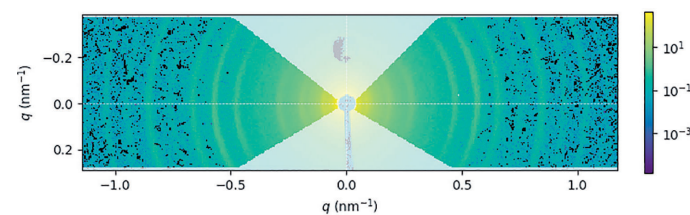
Mielőtt ezt a mintát mértük, át kellett építenünk a berendezést, hiszen ezek a minták na-

gyobbak, mint a nanorészecskék és a fentebb említett „Kis szög nagy méret, nagy szög kis méret” szabály következtében kisebb szögtartományt kellett elérnünk, ami a röntgensugár útjának meghosszabbításával vált lehetővé (9. ábra).



9. ábra: A berendezés átépítése

A kollagén szerkezete – a multilamellás vezikulához hasonlóan – periodikus, ami már a szórásí képén is szépen látszott magas intenzitású gyűrűk formájában (10. ábra).



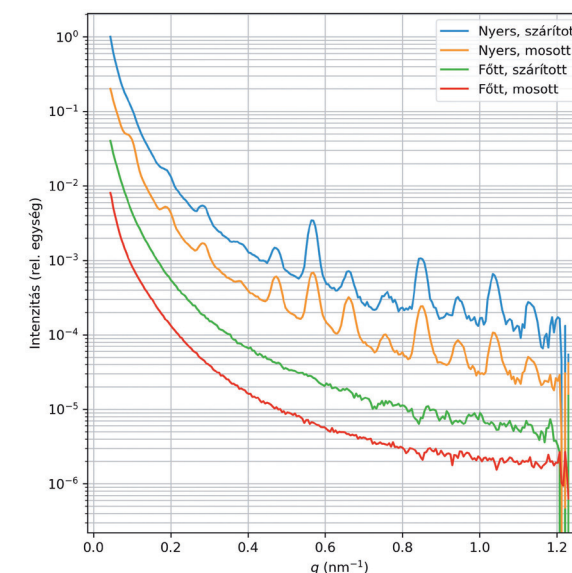
10. ábra: A berendezés átépítése

A kollagénminták szórásí gőrbéjén az előző méréshez hasonló csúcsokat figyelhetünk meg (11. ábra), melyek szintén egyenlő távolságra voltak egymástól. Ezt számítással is alátámasztottuk. A Bragg egyenlet segítségével kiszámítottuk a kollagénben a rostok távolságát, ami 66,25 nm lett. A szórásí gőrbék vizsgálatából arra a következtetésre jutottunk, hogy a főzés rontja a kollagén szerkezetét, hiszen a főtt minták gőrbéjén nem látszódnak a csúcsok. Azonban az etanolos mosás – vélhetően a zsírtalanító hatásának köszönhetően – kiemeli a csúcsokat (a sárga gőrbén a kis  $q$  értékeknél több csúcsot figyelhetünk meg, mint a kék gőrbén).

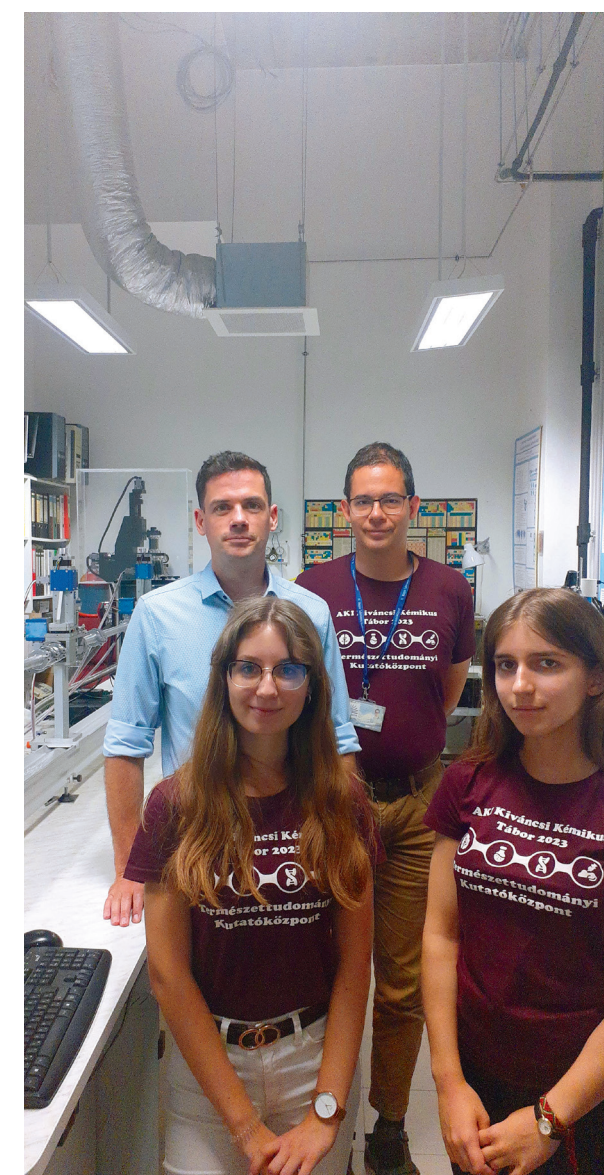
### Összegzés

A hét során megismerkedtünk a kisszögű röntgenszórással, és méréseket végeztünk a CREDO berendezéssel. Ez a módszer rengeteg mindenre használható, de mi most csak egy párat próbáltunk ki. Olyan kísérleteket végeztünk, amik egyszerre hasznosak is lehetnek, de azért izgalmasak is.

Szeretnénk megköszönni a témavezetőinknek, Wacha Andrásnak és Varga Zoltánnak a sok türelmet és segítséget, illetve a táborvezetőknek, Nagyné Bereczki Laurának, Keszler Anna Máriaának és Bajcsi Áronnak a tábor szervezését és azt, hogy egy felejthetetlen hetet tölthetünk a táborban.



11. ábra: Csirke inak szórásí gőrbéje





# Rat-ical art: alkossunk remekműveket idegsejtekből és antitestekből

**Machlik Mira**

Pécsi Janus Pannonius Gimnázium

**Szalai Nikolett**

Zalaegerszegi Kölcsey Ferenc Gimnázium

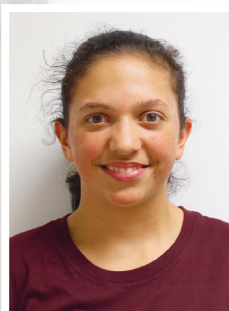
## Témavezetők:

**Bod Réka** PhD hallgató

**Tóth Estilla** PhD hallgató

## Kutatócsoport:

Integratív Idegtudományi Kutatócsoport, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet



## Az immunfestés

A kutatótábor keretein belül mi az immunfestés alkalmazásával ismerkedtünk meg, mert ez a módszer a legmegfelelőbb arra, hogy az általunk vizsgált agyminta sejtjeit pontosan megjelölhessük.

A módszer az immunrendszer működésén alapszik, ugyanis a membrán felületén olyan fehérjék vannak jelen, melyekről az immunrendszer sejtjei megállapíthatják, hogy az adott komponens a szervezethez tartozik, vagy idegen, és ez esetben szükséges-e eltávolítani. A felismerés ebben a típusú immunválaszban antitestek segítségével történik. Az antitest az immunrendszer által termelt fehérje, melynek feladatai közé tartozik, hogy az antigénként azonosított idegen anyagokat felismerje, majd közvetlenül vagy közvetett úton elpusztítsa. Az értelmezés olyan anyagokkal valósul meg, amelyek egy adott antigénre kémiai kapcsolódni tudnak.

## A munkánk folyamata

Az első lépés az egész patkányagy formaldehidbe áztatása volt, amellyel fixáltuk, és



1. ábra: lefixált patkányagya

tartósítottuk a mintákat. Ezután lemetszet-tük az agyakat egy speciális vibratóm géppel, ami rezgő pengét használ a szövetek átvágá-



2. ábra: vibratómmal való szeletelés

sához. A rezgés periódusa, a sebesség és a penge szöge mind szabályozható. Ezután az általunk készített foszfátoldatba helyeztük át



3. ábra: foszfátoldat cserélése

a metszeteket. Az oldat szintén azt segítette elő, hogy a minták sejtjei a lehető legjobb állapotban maradjanak, ugyanis a kémhatása és a sűrűsége közel azonos az agyban lévő sejtek közötti folyadékkal. A foszfátoldatot naponta többször cseréltük a mintákon, amikor pedig éppen nem ezzel foglalkoztunk, a metszeteket tartalmazó üvegeket egy rázógépre helyeztük.

Az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatba a második nap helyeztük bele a mintákat. Az anti-NeuN nevű antitest a neuronok, tehát idegsejt sejtmagját, a GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) pedig a gliák, vagy támasztósejt sejt falát jelölte meg. Egy anti-egér (tehát egy másik szervezet az egér sejtjei ellen legyártott immunanyaga) nevű antitestet használtunk másodlagos antitestként, majd egy ABC nevű harmadlagos anti-



4. ábra: patkányagyszövetek festése

testként. Az előhívás egy DAB nevű festékkel történt, ami barna színnel mutatja a megfelelő antitesttel megjelölt részeket.

A mintákat ezt követően egy szintén általunk előállított zselatinos oldatba tettük át, ahonnan ecsetek segítségével a tárgylemezre helyeztük őket, majd megfelelően lefedtük őket.



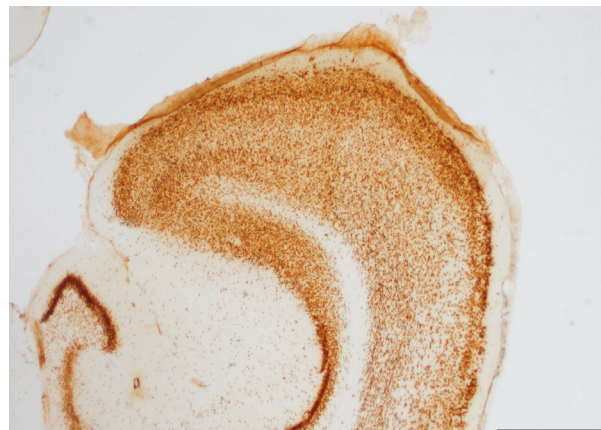
5. ábra: patkányagyszövetek ragasztása

Miután megszáradtak a minták, egy kamerával ellátott mikroszkóp alatt megvizsgáltuk és lefotóztuk az agymetszeteket.



6. ábra: a minták tárgylemezre helyezése



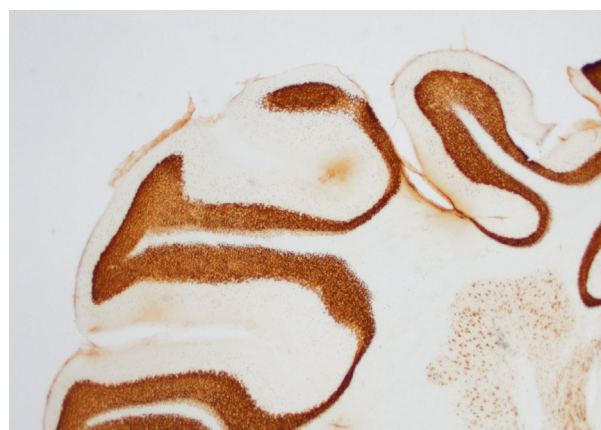


7. ábra: hippocampusz NeuN-es festéssel

Ezen a képen a hippocampusz látható, ami a tájékozódásban, a tanulásban játszik nagy szerepet. Ide kerül először az az információ, ami később a hosszútávú memóriában lesz. A hippocampusz a nagyagy egy része, az emberben a halántéklebény csúcsában, a hatrétegű agykéreg alatt található, a gerincesekben az ósagyköpenyt képezi. Emlősökben az agykéreg felszínének 30-40%-át is kiteszi.

A képen jól látható a „csikó hal” alakja és a megfestett sejtek. Ez egy NeuN-es (neuronalis nukleáris antigén) idegsejtes festés.

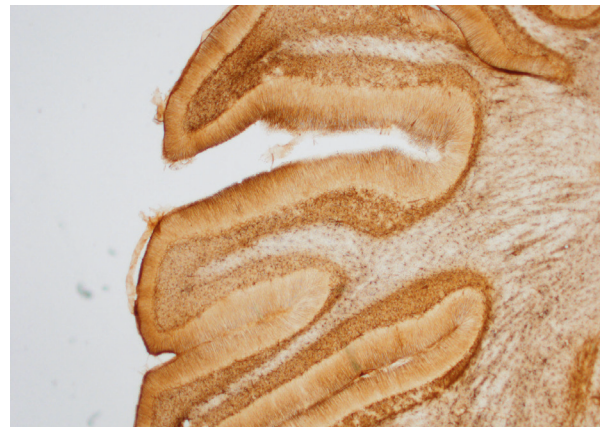
A fotón megfigyelhetjük a kisagy látványos redőzetét, mely NeuN festéssel van jelölve. A kisagy fontos szerepet játszik a mozgás koordinációjában, függetlenül attól, hogy tudatában vagyunk-e róla. Az akaratlagos izmok egyenletes összehúzódását biztosítja és összehangolja működésüket, ideértve az ellentétesen működő izomcsoportokat is. A



8. ábra: kisagy NeuN-es festéssel

kisagy kapcsolatban áll a központi idegrendszer más részeivel, és felelős a testtartás és az akaratlagos mozgás szabályozásáért.

Itt a kisagy agykérgét láthatjuk GFAP-s festéssel. Összehasonlítva az előzőkkel szembevetően a kevésbé erőteljes határokat és gliasejteket figyelhetünk meg.



9. ábra: kisagy agykérge GFAP festéssel

### Köszönet nyilvánítás

Ezen az emlékezetes héten rengeteget tanultunk, és gazdag tapasztalatokat szereztünk. Megismerkedhettünk a műszerek fontosabb működésével, és betekintést nyerhettünk a laboratóriumi munkálatokba. Hálás köszönetünket szeretnénk kifejezni témavezetőinknek, a türelmükért és nyitottságuk miatt, nélkülük nem sikerült volna ezt a nagy feladatot teljesíteni.



## Ráktérapiás gyógyszer-célpont és DNS-módosító enzimfehérjék nyomon követése gyógyszerkezelt vastagbélrák sejtvonalon

**Kopacz Melánia**  
Csiky Gergely Főgimnázium, Arad

**Petrovánszki Lilla**  
Kisvárdai Bessenyei György Gimnázium és Kollégium

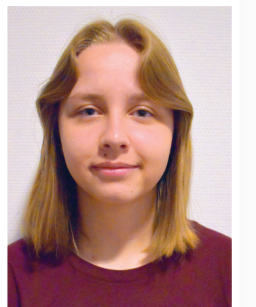
### Témavezetők:

**Dr. Békési Angéla** tudományos munkatárs

**Holub Eszter** PhD hallgató

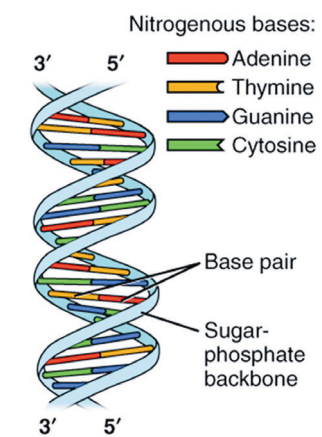
### Kutatócsoport:

Genom Metabolizmus kutatócsoport, Enzimológiai Intézet



### A kutatáshoz szükséges előismeretek

A DNS (Dezoxiribonukleinsav) - a genetikai információt tárolja magában, ez az örökítőanyag. Lehetővé teszi az információ stabil, a DNS-megkettőzéssel az utódokba való átadását - illetve az információ megszólaltatását (génkifejeződést). A nukleotidok három komponensből épülnek fel: bázis (A,T,G,C) + cukor (dezoxiribóz) + foszforsav. A DNS károsodás egy olyan folyamat, amely során a sejtekben található dezoxiribonukleinsav (DNS) molekulák sérülnek vagy megváltoznak. A DNS az örökítőanyagunk, és fontos szerepet játszik az öröklődésben és a sejtek megfelelő működésében. Károsító tényezők lehetnek: UV-sugárzás, kémiai anyagok, sugárzás, oxidatív anyagok. Károsodás típusai: Bázismódosítások, szálhasadás, keresztkötések. Ezek következménye lehet DNS-javítás, programozott sejtihalál vagy valamilyen mutáció - rákképződés. A ráktérapiás megoldások egy része éppen nagy mennyiségű DNS ká-



1. ábra: Dezoxiribonukleinsav szerkezete

rosodás okozásával igyekeznek a rákos sejtekben a programozott sejtihalál kiváltani. Azonban, ha a DNS-javító, illetve a sejtihalál útvonalaik fehérjéi károsodtak, a terápia nem mindig tud hatékony lenni, ilyenkor beszélünk gyógyszerrezisztenciáról. Illetve, ha a DNS károsodás további mutációt is okoz, akkor az a tumor továbbfejlődésének is kedvezhet, ami elkerülendő.

### A miniprojekt háttere

Kutatásunk során labor körülmény között, megismerkedtünk a Timidilát Szintázal (TS) amely egy gyógyszer-célpont fehérje, illetve a HCT116 vastagbélrák sejtvonallal. Két ráktérapiában használatos gyógyszert vizsgáltunk: RTX (raltitrexed), 5FdUR (5-fluoro-2'-dezoxiuridin). Eme két gyógyszer egyaránt a TS enzimet gátolja, használatuk a sejtek osztódási képességében bekövetkeznek változások: a sejtciklus feltartóztatódik, a DNS megkettőződése gátolt. Érdekes azonban, hogy a két szer hatásában specifikus különbségek is mutatkoznak:

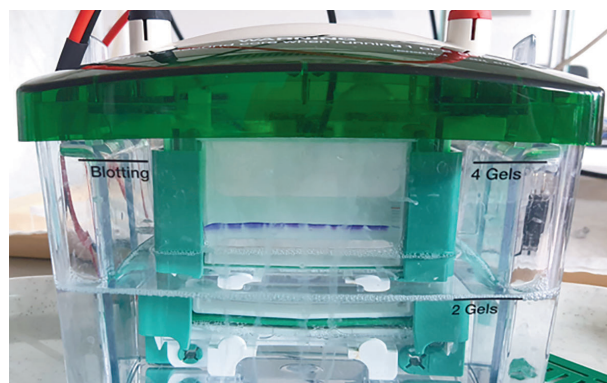
RTX	5FdUR
Dózis függő hatás	Nagy dózis → gyengébb hatás
Nincs további mutációs teher	Megnövekedett mutációs gyakoriság
	A mutációs mintázatok → APO-BEC enzimek: DNS módosítók



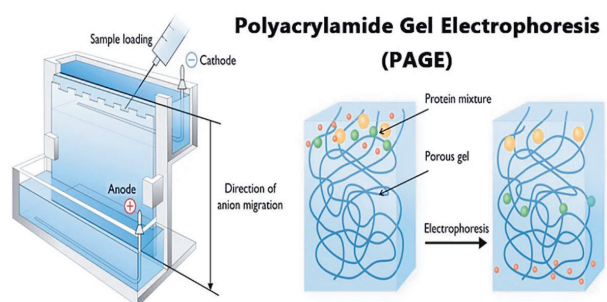
Kutatásunk célja volt, hogy a TS és az APO-BEC3C fehérjéket kimutassuk kezeletlen és RTX, ill. 5FdUR kezelt sejtekben. Ehhez SDS-poliakrilamid gélelektroforézist és Western blot módszert használtunk.

### SDS-poliakrilamid gélelektroforézis:

A gélelektroforézist a fehérjék vagy DNS fragmentek elválasztására használják. A fehérjék elválasztásához poliakrilamid gél használunk. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis egy olyan módszer, ahol a fehérjék denaturálódnak a felületükre adszorbeálódó negatív töltésű SDS következtében. Az adszorbeálódott SDS miatt a töltés/tömeg arány állandóvá válik, így a fehérjék elválasztása a molekulatömegük alapján történik. Mivel ennél a módszernél a fehérjék elektroforetikus mobilitása logaritmikusan arányos a tömegével, ha ismert molekulatömegű fehérjék is rendelkezésünkre állnak, a módszer különböző fehérjék látszólagos molekulatömegének meghatározására alkalmas. A gélben elválasztott polipeptidláncok láthatóvá tehető különböző festési eljárásokkal.



2. ábra: A gélelektroforézis készülék működés közben



3. ábra SDS-poliakrilamid gélelektroforézis menete.

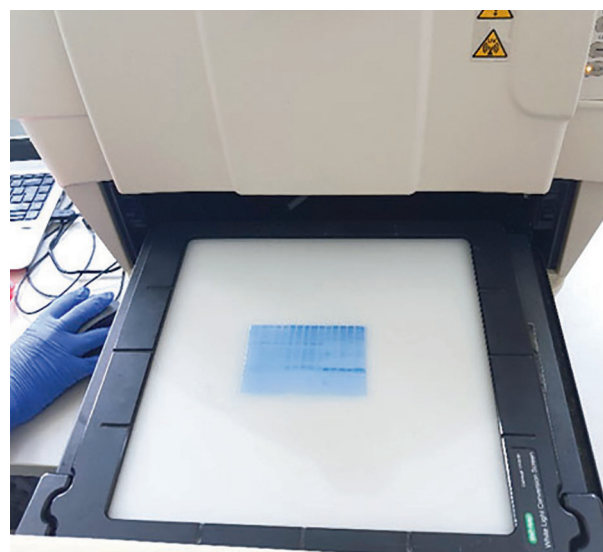
### Western blot módszer:

Miután végbe megy a gélelektroforézis, a fehérjéket egy membránra visszük át szintén feszültségkülönbség hatására az erre a célra kialakított ún. blottoló cellában. A membrán hidrofób, a fehérjék a felszínen nem specifikusan megkötődnek. A membrán felszínére blotolt fehérjéket azután specifikus festéssel tudjuk kimutatni. Ennek első lépése a blokkolás, ez azért fontos mert, ha nem blokkoljuk akkor a specifikus antitest a membránhoz nemspecifikusan is kötődne. Blokkolás során a membránt tejporos oldatban forgattuk. Ezután az adott fehérjét (TS vagy APOBEC3C) specifikusan felismerő nyúl antitestet tettük a membránra, ami a membránon inkubálódott. A membránt folyamatosan pufferben tartottuk, hogy az oldat neutrális pH-ját fenttartsuk.



4. ábra: Fehérjék amiket a membránra vittünk. (balra)

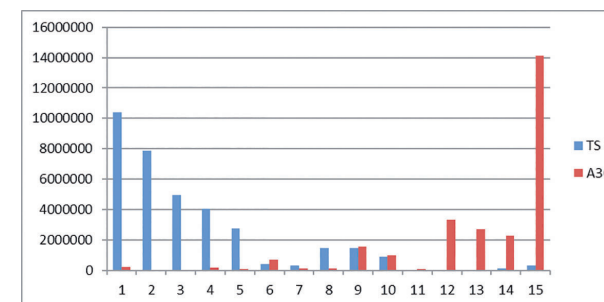
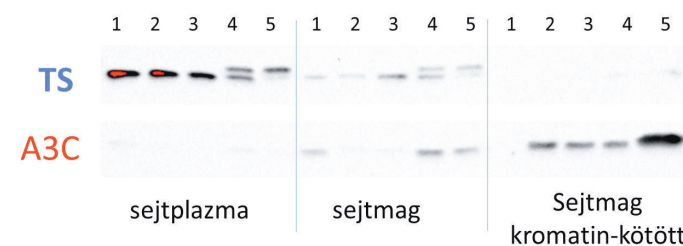
5. ábra: Mikroszkóp alatt, egy flaskában a rákos sejtek. (jobbra)



6. ábra: Az SDS gél a gélbeolvasó készülékben

### Eredmények:

A minták kezeletlen, illetve RTX vagy 5FdUR szerekkel alacsony (100 nM), illetve magas (20 µM) koncentrációban kezelt HCT116 sejtekből származtak. A sejteket előzőleg a csoportban feltárták és frakcionálták: a sejtplazma tartalmát elkülönítették a sejtmagtól, utóbbit tovább bontották egy a sejtmagokból sós oldattal kioldható, illetve a sejtmagi maradék frakciókra. Ezeket a mintákat először azonos mennyiségben vittük gélre, majd a fehérjetartalmat Coomassie kék festékkel festettük. A kékülés mértékét minden mintában összehasonlítottuk, ami alapján megállapítottuk, mennyi mintát kell felvinnünk ahhoz, hogy a teljes fehérjemennyiség kiegyenlített legyen majd a bloton. Ezután újra futtattuk a mintákat két példányban, amit a gélből membránra is blotoltunk. A membránokat anti-TS, illetve anti-A3C antitesttel fejlesztettük, majd előhívtuk.



7. ábra: Az A3C-re és a TS-re végzett Western blot eredménye. A felső panelen az előhívott membrán, az alsón annak densitometriás értékeléssel kapott eredménye látható. A mintasorrend a következő volt a 3 jelölt sejtfractionsban: 1) kezeletlen sejtek, 2) 100 nM RTX, 3) 20 µM RTX, 4) 100 nM 5FdUR, illetve 5) 20 µM 5FdUR kezelt sejtek. A kiértékelés oszlopdiagramján a mintasorrend követi a membrán mintasorrendjét.

A beolvasott képeket denzitometriásan elemztük. Azt tapasztaltuk, hogy a sejtplazmában a TS erősen felgyűlt, míg a sejtmag sós oldattal kioldható frakciójában sokkal kevesebb, a magi csapadékban pedig gyakorlatilag egyáltalán nem fordul elő (ld. 7. ábra és a kiértékelést mutató 8. ábra). Az APO-BEC3C-nél pedig pont fordítva volt: Legtöbb a magi csapadékban volt, ráadásul nagy koncentrációjú 5FdUR kezelt mintákban erősen megnövekedett mennyiségben.

Az eredmény a csoport számára is új volt, aminek együtt örültünk. A TS-re vonatkozó információt be tudták építeni egy tervezett kísérlet protokolljába, míg az A3C magi csapadékban való lokalizációja alapján feltételezhető, hogy a kromatinhoz szorosabban kötődő enzimmel van dolgunk. Az A3C mennyisége ráadásul pont a magas koncentrációjú 5FdUR-rel kezelt mintában nő meg, ami magyarázhatja a csoport előzetes eredményeit is.





# Az agy biológiai életkorának becslése MRI felvételek alapján mesterséges intelligencia (MI) segítségével

**Tomka Dorottya**

Békásmezei Veres Péter Gimnázium

**Varga Dorina**

Debreceni Csokonai Vitéz Mihály Gimnázium

## Témavezetők:

**Dr. Hermann Petra** tudományos munkatárs

**Simon Ádám** radiográfus

**Nárai Ádám** tudományos segédmunkatárs

**Dr. Vakli Pál** tudományos munkatárs

## Kutatócsoport:

Agyi Szerkezet és Dinamika Kutatócsoport, Agyi Képzőközpont



A kutatásunk célja az agy öregedési folyamatainak megismerése és a kognitív funkciók, valamint az agy szerkezeti változásainak vizsgálata. A kutatócsoport, ahol dolgoztunk párhuzamosan több kísérletet is végez. A tábor hetében lehetőségünk nyílt ezen kísérletek megismerése mellett a kísérletvezető, illetve a vizsgálati személyek szerepét is kipróbálnunk.

A kognitív öregedés vizsgálatára egyrészt papíralapú kognitív tesztek használnak, többek között a memória, koncentráció, és intelligencia általános mérése céljából, ezek standard neuropszichológiai mérések, melyek nem igényelnek semmilyen speciális eszközt. A neurokognitív öregedés munkamemória-teljesítményre gyakorolt hatásának vizsgálatára egy számítógépes programot dolgoztak ki, mely a vizsgálati személy számára három, gyors egymásutánban felvillanó különböző irányú színes rácsmintázatot vetít a képernyőre melyeket meg kell jegyeznie. Ezt követően a program a három szín valamelyikéből véletlenszerűen megjelenít egy véletlenszerű irányba mutató rácsmintázatot, melyet a vizsgálati személynek be kell állítani

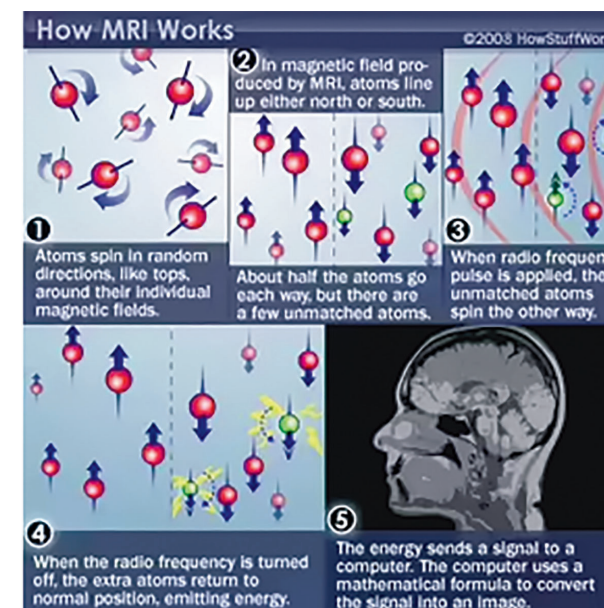
olyan irányúra, mint amelyet korábban az adott színnel látott. Ezt a tesztet fiatal és idős korú csoportok bevonásával végzik.

Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a fiatalok már az első alkalom során is jó eredményeket érnek el, teljesítményük a feladat többszöri elvégzése után jelentősen nem változik, míg az idősebbek a kezdeti pontatlanabb megoldásokat követően jelentős teljesítményjavulásra képesek, és a feladat többszöri elvégzésével eredményeik akár meg is közelíthetik a fiatalokét.

A munkamemória adaptív, jutalmazás által történő modulációjának feltárása céljából funkcionális MRI segítségével vizsgálják az agyi aktivitást, miközben a vizsgálati személyek ugyanezt a munkamemória-feladatot hajtják végre, azzal a különbséggel, hogy az egyes feladatokért több, míg másokért kevesebb pontot lehet szerezni. Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy a fiatalok jobban teljesítenek, ha több pontért játszanak, és kevésbé erőltetik meg magukat, amikor kevesebb a jutalom, míg az idősek hasonlóan jól végzik a feladatot a jutalom mértékétől függetlenül. Elképzelhető magyarázat, hogy a fiatalok

könnyebben tudják változtatni a koncentráció mértékét, mint az idősek, akiknek egyszerűbb mindig ugyanolyan mértékben figyelni.

## De mi is az az MRI és hogyan működik?



1. ábra: Hogyan működik az MRI?

Az MRI az NMR technológiából fejlődött ki, neve az angol Magnetic Resonance Imaging rövidítése. Legnagyobb előnye, hogy egy non invazív technikáról van szó, amelynek máig nem mutatható ki semmilyen káros hatása. Más képalkotó technikákhoz (pl. CT) viszonyítva sokkal jobb lágyszöveti kontrasztra képes, és a strukturális vizsgálat mellett funkcionális információ gyűjtésére is alkalmas. Hátránya, hogy egy pontos diagnosztikai mérés, vagy egy funkcionális felvétel elkészítése viszonylag hosszú időt vesz igénybe, amely idő alatt a betegnek mozdulatlanul kell fekvnie, ami egyes patológiás esetekben igen nehezen megvalósítható. Továbbá igen hangos a gép mérés közben, és a mágnesesség használata legtöbb esetben ellehetetleníti a fémimplantátummal rendelkező betegek vizsgálatát.

Az MRI egy proton képalkotási technika, amely egy szupravezető mágnes segítségével működik. A legtöbb esetben az emberi testben tömegével megtalálható hidrogén atomokat méri, melyek a mágneses erő hatására beállnak a spinjüknek megfelelően - vagy

ellentétesen vagy párhuzamosan a mágneses térrel. Majd egy elektromágneses impulzussal gerjesztjük ezeket a protonokat, amelyek kibillennek az eredeti helyzetükből, aztán visszazugározzák a kapott energiát a hidrogénatom kötéseitől - tehát a szövet összetételétől - függően különböző sebességgel.

A funkcionális MRI esetén közvetetten figyeljük meg az agyi aktivitást. Amikor egy agyterület aktív, több oxigént igényel, emiatt a szervezet több friss, oxigéndús vért fog az adott területre szállítani. Az oxigéndús vérben található hemoglobin mágneses tulajdonságai eltérnek a deoxigenizált - „elhasznált” - hemoglobintól. A deoxigenizált hemoglobin mágneses inhomogenitást okoz, azaz jelenléte a képen jelkiesést, „sötét foltokat” fog okozni. Amikor a megnövekedett oxigénigény miatt több friss vér áramlik be, az oxigenizált és az „elhasznált,” deoxigenizált hemoglobin aránya megváltozik, eltolódik az oxigenizált irányába. Ez azt jelenti, hogy az adott területen kismértékű jelnövekedést fogunk látni, ezáltal lokalizálhatóvá válik az éppen aktív agyterület.

## A fő kutatási téma

Jelen kutatás célja egy olyan mesterséges intelligencia (MI) fejlesztése és betanítása, amely képes egy anatómiai MRI felvétel alapján pontosan meghatározni a vizsgálati személy agyának biológiai életkorát. Az MI az agy minden egyes pontjához egy-egy életkort rendel. Korábbi kutatási eredmények alapján az MI által becsült és a tényleges életkor közötti eltérés összefüggést mutat különféle patológiás állapotokkal.

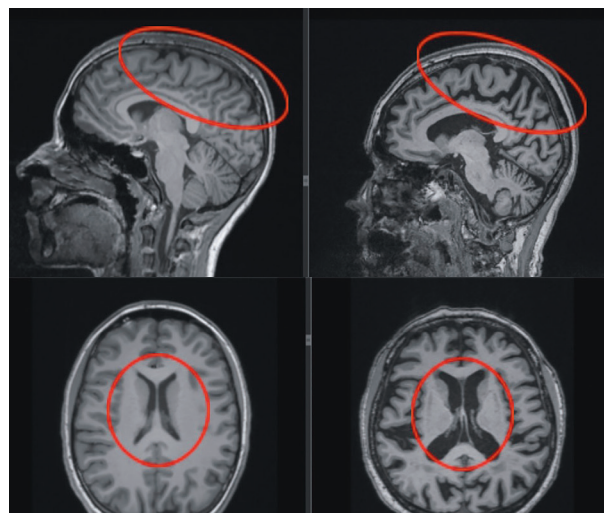
Az MI megfelelő betanításához azonban mindenképpen szükség van nagy mennyiségű adatra, ez esetben anatómiai MR felvételekre különböző korcsoportoktól. Ezeket főleg publikus adatbázisokból szerzik be, de mi például az Agyi Képzőközpont (AKK) által készített felvételeket használtuk.

## Az agy öregedésének jelei

Szemmel látható különbségek vannak egy



fiatal és egy idős vizsgálati személy agyfelvételei között. Az agy öregedése során jelentősen kitágulnak a sulcusok (barázdák) és az agykamrák, emiatt megnő az agyban található liquor (agy-gerincvelői folyadék) mennyisége.



**2. és 3. ábra:** Az agy öregedés jelei – 19 (bal oldali kép) és 81 (jobb oldali kép) éves vizsgálati személy sagittalis (felső kép) és axialis (alsó kép) agyi MR felvételei

## Mesterséges intelligencia

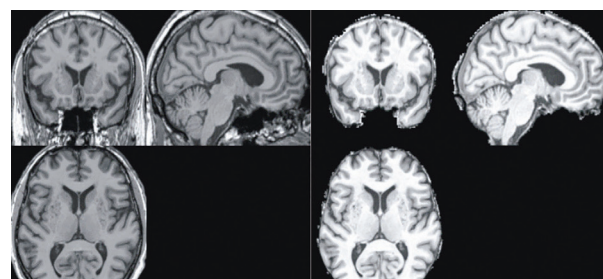
### Bevezetés

A mesterséges intelligencia felismeri azokat a részeit az agynak, amelyek legtöbbször változnak az öregedés során és nagy mennyiségű, megfelelő minőségű kép alapján megtanulja helyesen megállapítani az agy biológiai életkorát.

Először be kell tanítani a neurális hálót, és ehhez MR felvételeket kell betáplálni a neurális hálóba, amelyeket még elő is kell készíteni.

### Képek kiválasztása, előkészítése

A nyers MRI felvételen korrigálni kell a mágneses homogenitás által okozott torzítást, valamint be kell transzformálni a felvételt egy közös koordináta rendszerbe. Így minden bevitt MR felvételen az egyes agyterületek egy határozott koordináta ponton lesznek megtalálhatóak. Emellett el kell még távolítani a felvételtől a koponyacsontokat, mert bár azok alapján is meg lehetne állapítani a vizsgálati

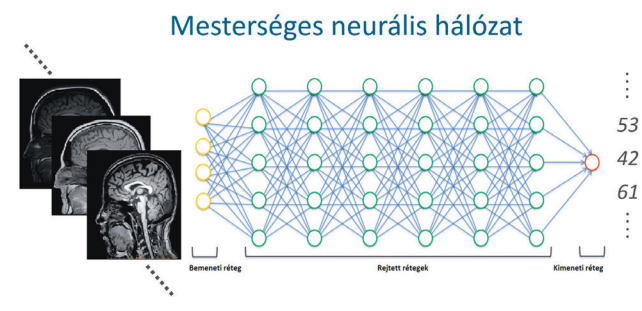


**4. ábra:** Nyers (bal oldali kép) és az MI számára előkészített MR felvétel (jobb oldali kép) coronalis, sagittalis és axialis síkokban

személy életkorát, mi az agy biológiai életkorára vagyunk kíváncsiak, nem pedig a csontokéra.

### A mesterséges intelligencia működése

Először is minden pixel, ill. 3 dimenziós kép esetén voxel kap egy intenzitásértéket. Egy tipikus MRI agyfelvétel több 100 000 voxelből áll, ezeknek az értékei képezik a bemeneti réteget.



**5. ábra:** Egy mesterséges neurális háló felépítése

Egy fejlett mesterséges intelligencia deep learning technológiát használ a tanuláshoz, amit azért hívunk mélynek, mert 1-nél több rejtett rétegből áll. A rejtett rétegek képfelismerés esetén konvolúciós – a képen jellegzetes vonások felismerését segítő – és klasszikus, teljesen összekapcsolt rétegekből állnak.

Ezekben a rétegekben egy adott neuron bemenetként megkapja az előző réteg több neuronjának értékét, ezeknek súlyozott összegéből képezi egy nem-lineáris függvény segítségével a saját kimenetét, amelyet továbbít a következő réteg neuronjainak. A fo-

lyamat többször megismétlődik a rejtett rétegekben, mielőtt elér a kimeneti rétegig – jelen esetben 1 db mesterséges neuron -, amely kiadja a végső értéket, amely jelen esetben a becsült életkor.

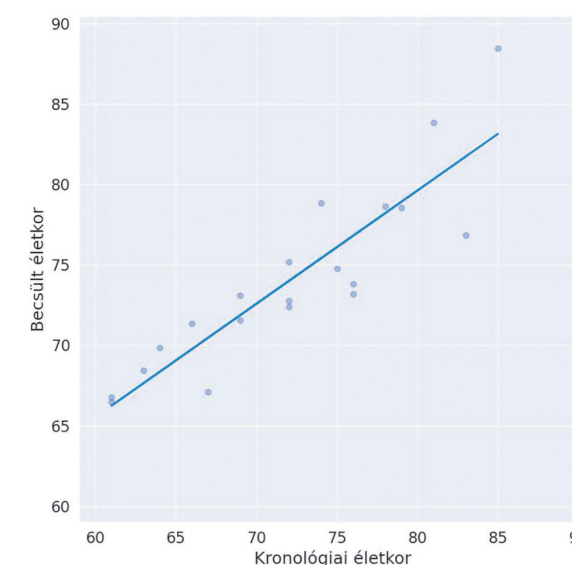
A számítás során kapcsolt súlyok a tanítás elején szinte véletlenszerűen választott értékek, amelyek a tanítás közben felállított hibafüggvények alapján optimalizálhatók, majd a tanítás végén rögzítésre kerülnek.

### A kísérletben alkalmazott MI specifikus tulajdonságai, előnyei

Fontos előnye ennek a programnak, hogy anatómiai MR felvételeket használ, amelyek elkészítése csak 5-6 percet vesz igénybe. Továbbá ez a neurális háló nem csak a teljes agyhoz rendel egy életkort, de az agy minden egyes pontjához rendel egy egyedi értéket és azt vizsgáljuk, hogy ez mennyivel tér el a vizsgálati személy kronológiai életkorától.

### Eddigi eredmények értelmezése

A még tanítás alatt álló neurális háló teszteléséhez 20, 60 év feletti vizsgálati személy agyáról készült strukturális MR felvételt választottunk ki az AKK saját adatbázisából. Ügyeltünk rá, hogy fele-fele arányban legyenek a nők és a férfiak, és nagyjából egyenletesen oszoljanak el az életkorok 60 és 85 év között. Alapvetően egészséges, természetesen öregedő agyakkal dolgoztunk, de találtunk egy nagy valószínűséggel patológiás esetet, kíváncsiságból ezt is bevettük a mérésbe. Az eredmény nagyrészt a korábbi teszteket igazolta. Megfigyelhető volt, hogy a program a fiatalabb agyakat idősebbnek, míg az idősebbeket fiatalabbnak becsülte, mert bizonytalanság esetén az eredmények átlagához közelítette a becsült értéket. Általánosságban elmondható, hogy az MI által becsült életkor 3,5 évvel tért el a vizsgálati személyek kronológiai életkorától, várakozásainkkal ellentétben azonban nem mutatott kiugró értéket a patológiás eset.



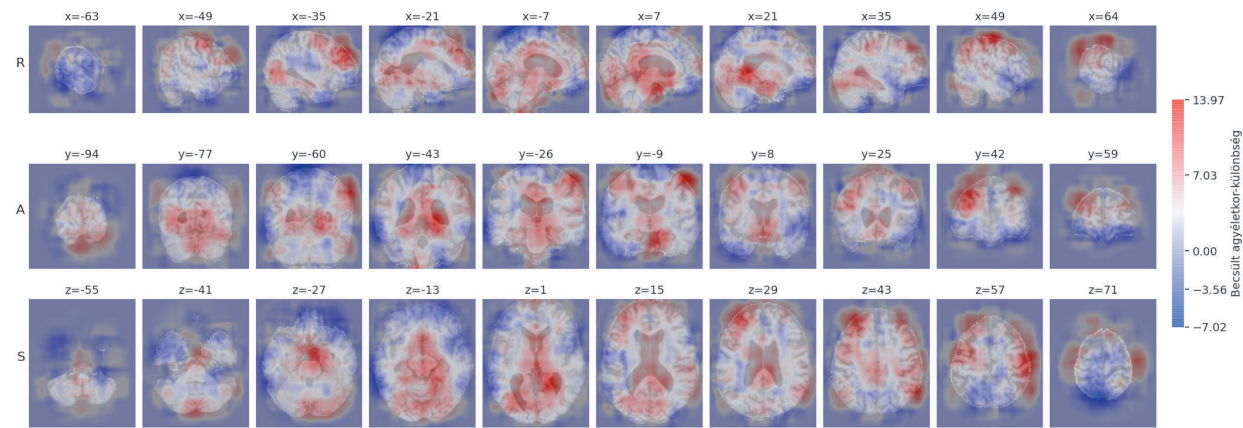
**6. ábra:** A 20 vizsgálati személy kronológiai életkora és az MI által becsült agyi életkor pontdiagramon ábrázolva

Még sok fejlesztést kell végezni ezen a technológián ahhoz, hogy széles körben alkalmazható legyen a diagnosztikában, és akkor sem várhatjuk hamarosan azt, hogy a végső diagnózist egy MI készítse el, ezen felvételek és értékek alapján azt állapíthatjuk majd meg, hogy szükséges-e további vizsgálat, és milyen típusú patológiáról lehet szó (pl. neurodegeneratív betegség vagy ADHD). Ugyanis számos esetben az agy struktúrájában lévő eltérések bár minden patológiás esetben előfordulnak, a strukturális eltérés nem jelent feltétlenül patológiát. Figyelembe kell venni minden esetben a vizsgálati személy tüneteit vagy azok hiányát is.

A feltételezhetően patológiás esetet részletesebben is megvizsgáltuk. A program különböző életkor becsléseket készített az agy más-más részeire, és az így kialakult ábrákon kirajzolódott az átlagostól eltérő, neurodegeneratív betegséget jelző részletek, mint például a túlzottan tág agykamrák, bár egyes részeket fiatalabbnak becsült a kronológiai életkornál számunkra ránézésre látható ok nélkül.



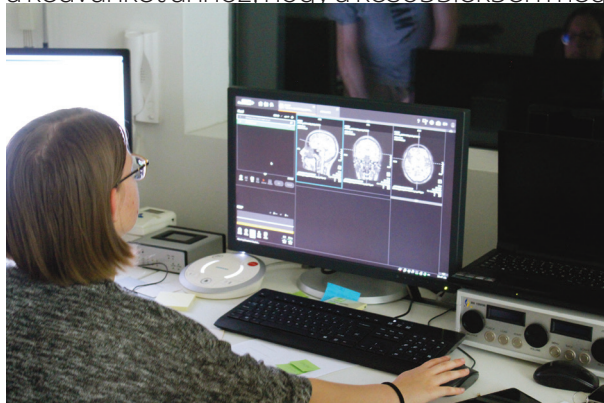
Agyéletkortérkép (becsült - kronológiai életkor)



7. ábra: A patológiásnak vélt esetről készült agyéletkortérkép

## Összefoglalás

A mi egyhetes projektünk talán egy kicsit eltért a legtöbb táboros kutatástól. Humán résztvevőkkel dolgozhattunk, és lehetőségünk nyílt a társaink agyáról képet készítenie egy kicsit őket is bevonni a munkába. Számos izgalmas kutatást és kísérletet ismerhettünk meg az idegtudomány, pszichológia és informatika rendkívül érdekes határterületéről, és csodálatos volt látni ahogy a különböző szakértők együttműködéséből bontakoznak ki az eredmények. Nagyon hálásak vagyunk, hogy részt vehettünk a táborban, és a táborvezetők mellett külön köszönettel tartozunk a témavezetőinknek, akik rengeteg türelemmel és nyitottsággal fordultak felénk. Mindkettőnk számára hatalmas élmény volt részt venni a kutatásban, és ez a kis betekintés meghozta a kedvünket ahhoz, hogy a későbbiekben még



## Szerves molekulák vizsgálata NMR spektroszkópiával

**Jánosik Jázmin**

Révai Miklós Gimnázium és Kollégium, Győr

**Viczko Csaba Péter**

ELTE Apáczai Csere János Gyakorló Gimnázium, Budapest

### Témavezetők:

**Dr. Turczel Gábor** tudományos munkatárs

**Teski Tamara** PhD hallgató

**Balterer Bence** PhD hallgató

### Kutatócsoport:

NMR Kutatólaboratórium, Szerkezetkutató Központ

Az NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópiát gyakran használják molekulaszerkezetek meghatározására, hiszen az egyik leghatékonyabb szerkezetvizsgálati módszer. A TTK által szervezett 2023-as AKI Kíváncsi Kémikus Kutatótáborban ezt az eljárást ismerhettük meg, különböző mintákat készítettünk elő, illetve egyszerűbb szerves molekulák spektrumát elemeztük.

A spektroszkópiás eljárások során különböző frekvenciájú elektromágneses sugárzások segítségével rögzítenek spektrumokat, amelyek alapján az adott minta tulajdonságaira lehet következtetni. NMR spektroszkópia esetében rádióhullámokat alkalmaznak. Az NMR rövidítés mágneses rezonanciát jelent. A szerves kémiával foglalkozók kis molekulák szerkezetmeghatározására használják, rutinszerű alkalmazás is előfordul az iparban, például az



1. ábra: A készülék belőről

élelmiszerbiztonság területén. Manapság egyre elterjedtebben fehérjék térszerkezetének meghatározására is alkalmazzák az NMR-t.

A készülékben egy szupravezető mágnes hoz létre erős mágneses teret, amelynek homogenizálására több kisebb mágnes is rendelkezésre áll. A szupravezető mágnes működéséhez azonban nagyon alacsony, az abszolút minimumhoz közeli hőmérséklet szükséges, ennek fenntartásához a készülékbe folyékony héliumot (-269 °C) és nitrogént (kb. -200 °C) szükséges tölteni, majd a normál működés érdekében rendszeres időközönként pótolni kell. A folyékony hélium és nitrogén réte-

gei között vákuumkamrák védik a spektrométert a hővesztéstől. A táborban megnézhattuk a folyékony nitrogén újratöltésének folyamatát, hiszen ezt kb. hetente ejtik meg. A hélium pótlása ritkábban esedékes, szakemberek végzik.



Mint minden vizsgálati módszernek, az NMR spektroszkópiának is vannak előnyei és hátrányai.

#### Előnyök:

- Részletes szerkezeti információt szolgáltat a vizsgált molekuláról.
- A mintákat oldatban vizsgálhatjuk, amely a makromolekulák analitikáját segíti, így például a fehérjék a természetes előfordulási közegükhöz hasonló formában vizsgálhatók.
- A minta a mérés során nem roncsolódik, így akár újabb reakciók során is felhasználható.

#### Hátrányok:

- A berendezés beszerzése és fenntartása is költséges,
- Nagyobb a mintaigénye, mint más szerkezetvizsgálati analitikai módszereknek (milligrammos tétel).
- Az atommagok nem mindegyike mérhető, ami nehezítheti az összetettebb molekulák spektrumának értelmezését.
- A minta készítéshez deuterált oldószerre van szükség, hiszen alapesetben abból is származna jel a spektrumon.
- A hűtéshez használt hélium nem fenntartható forrásból származik, mivel az elérhető földi készlet véges.

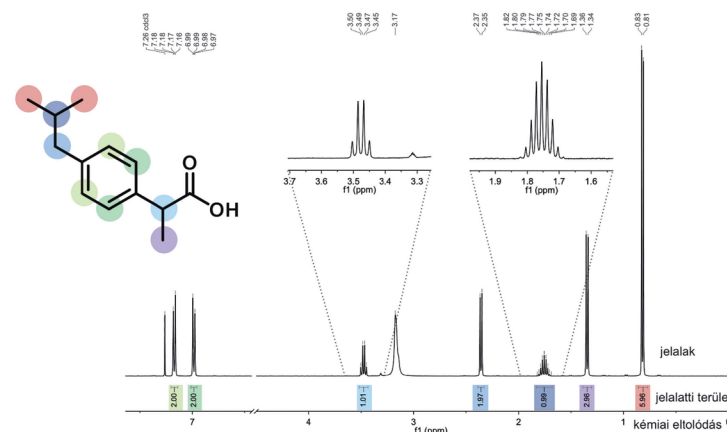
A sok hátrány ellenére az NMR spektroszkópia azért nyerhetett ekkora teret, mert olyan részletes szerkezeti információkra következtethetünk a spektrum alapján, mely jelenleg más analitikai módszerrel nem vagy csak nehezen elérhető.



2. ábra: Minta behelyezése a készülékbe

A mért spektrumokat három fő szempont szerint elemeztük, mint a kémiai eltolódás, jel alatti terület nagysága és a jelalak.

Az atommagok kémiai eltolódását a kémiai környezetük határozza meg. Például minél közelebb található egy hidrogénatom egy elektrondús molekularészlethez (például karboxilcsoport, aromás gyűrű), annál nagyobb a kémiai eltolódása. A skála 0 pontja a tetrametilszilán jelének helye, ez az egyezményesen alkalmazott referencia, a számozás jobbról balra növekszik történeti okokból. A 3. ábrán az ibuprofén általunk felvett spektruma látható.

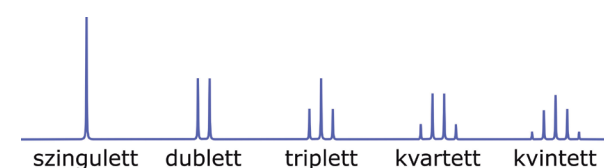


3. ábra: Az ibuprofén  $^1\text{H}$ -NMR spektruma

A spektrumon megfigyelhető, hogy a zöld színekkel jelölt szénatomokhoz tartozó hidrogének kémiai eltolódása jóval nagyobb, mint például a piros színnel jelölt szénatomokhoz tartozó hidrogéneké. Ennek oka az, hogy a zöld színű szénatomok aromás gyűrűn vannak, ott sokkal nagyobb az elektronsűrűség mint a piros színű szénatomokon, amelyek egy alifás lánc végén találhatóak.

A rutin  $^1\text{H}$ -mérések speciálisak, mivel a spektrumban a jelek alatti terület nagysága meghatározza a mágnesesen ekvivalens, azonos környezetben lévő hidrogén atomok számát. Például a lila színnel jelölt szénatomhoz tartozó jel alatt levő terület háromszor nagyobb, mint a világoskék jelhez tartozó terület, emiatt feltehetően a lila színű szénhez három, a világoskék színűhöz egy hidrogén kapcsolódik.

A harmadik szempont a jelek alakja volt: egy jel az  $^1\text{H}$  spektrumban általában akkor hasad fel, ha 3 kötés távolságra található mágnesesen nem ekvivalens  $^1\text{H}$  atommag (más NMR aktív atommagok is képesek lehetnek hasításra, de itt ezekkel nem foglalkozunk). Azaz egy jel csak akkor nem hasad több részre, ha nincs a jelet adó hidrogént hordozó szénatommal szomszédos szénatomokon más hidrogén. Az  $^1\text{H}$  atommagok esetében a felhasadások a következőképpen alakulnak: ha a csatoló (a jelfelhasadást okozó) hidrogének kémiaiilag hasonló környezetben vannak, a jel  $n$  darab szomszédos hidrogénmag hatására  $n+1$  részre hasad. Továbbá az egyes jelrészek intenzitása a Pascal-háromszög szerint alakul (4. ábra). Az ibuprofénből felvett spektrumon minden metilcsoport (lila és piros) kétfelé hasadt, ugyanis egy-egy szomszédos hidrogénatom van mindkét metilcsoport mellett. A világoskék színű jel négyfelé hasadt, ugyanis a jelet adó hidrogén mellett három hidrogénatom volt található, a részek intenzitásának aránya: 1:3:3:1.



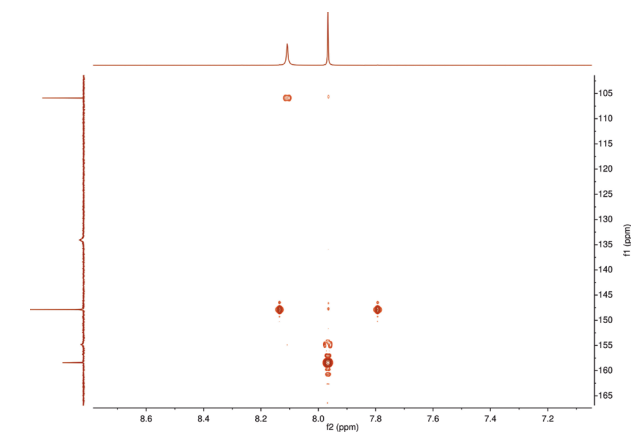
4. ábra: Jelalakok

A hét folyamán nem egy hosszú, összefüggő projekten dolgoztunk, hanem több kisebb, érdekes témát vizsgáltunk. Több területhez kapcsolódóan is végeztünk vizsgálatokat, először gyógyszerhatóanyagok szerkezetét határoztuk meg, majd élelmiszerek (tea, Ouzo) és kozmetikumok (illóolajok) szerves összetevőit vizsgáltuk. Végül egy C-vitaminhoz kapcsolódó népi hiedelmet próbáltunk igazolni.

Először gyógyszerkészítmények (Aspirin, Milurit, ibuprofén) vizsgálatával foglalkoztunk. Az Aspirin tablettából a hordozóanya-

got eltávolítva megállapítottuk, hogy az nagy százalékban valóban acetyl-szalicilsavat tartalmazott. Ennek szerkezetét az összegképlet segítségével egyetlen  $^1\text{H}$ -spektrumból is meg lehetett határozni.

A Milurit tableta hatóanyaga, az allopurinol azonban kevés hidrogént tartalmaz, így ennek szerkezetének megfejtéséhez  $^{13}\text{C}$ -mérést is el kellett végezni, illetve a szomszédos  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  atommagok kapcsolódását feltáró, ún. 2 dimenziós mérést is célszerű csinálni. Amennyiben a mérésekből közvetlenül nem sikerül kiolvasni a szerkezetet, egy kiváló adatbázis is rendelkezésre áll (<https://sdbs.db.aist.go.jp>), amelyen nemcsak NMR, hanem például IR és MS adatok is megtalálhatók jó esetben.

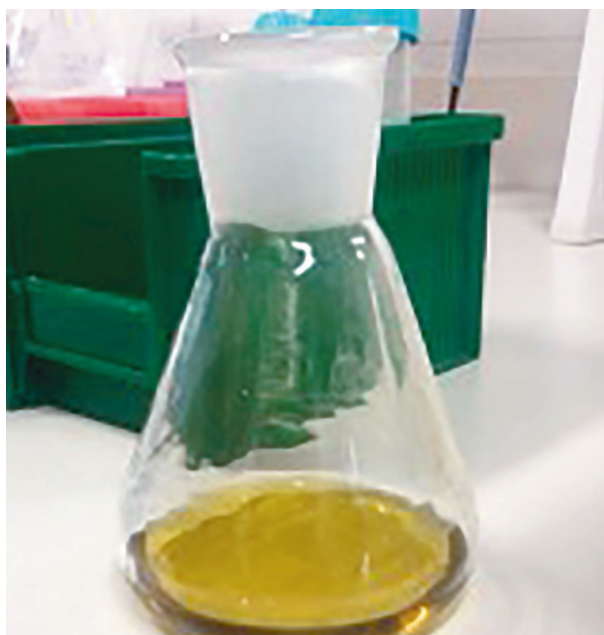
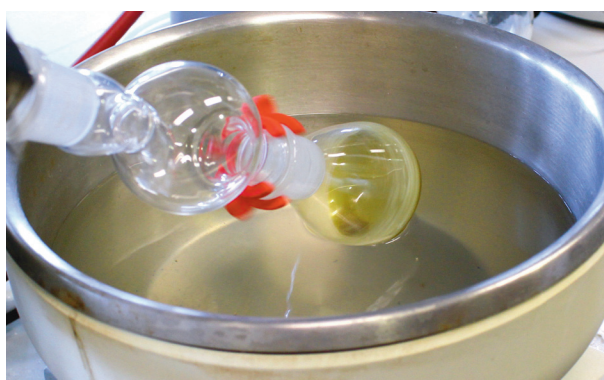
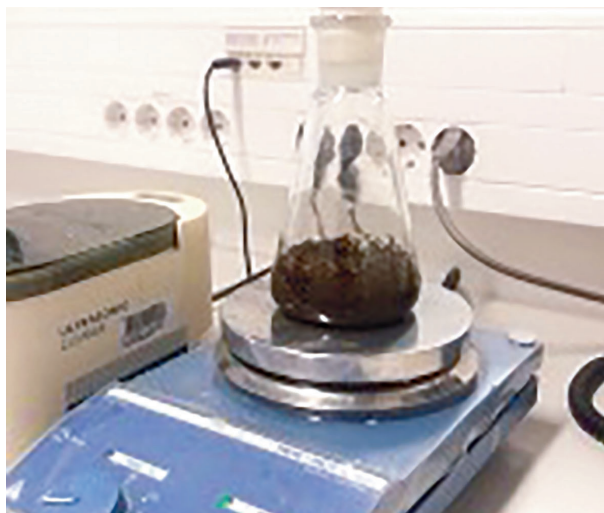


5. ábra: Egy 2 dimenziós  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  korrelációs mérés (HSQC) spektruma

A következő mérésben a zöld tea hatóanyagát vizsgáltuk. A zöld tea más teafajtákhoz képest kevésbé feldolgozott, így több antioxidánst tartalmaz, amelyeknek számos jótékony hatását köszönheti, de ezen kívül ismert az élénkítő mivoltáról is. A hatóanyag meghatározásához 11,5 g teafüvet mértünk ki Erlenmeyer-lombikba, azután 20 ml NaOH-oldattal lúgos közeget hoztunk létre, amelyben extrakciót végeztünk diklórmetánnal. Dekantálás után nátrium-szulfáton megszáritottuk a kapott oldatot, melyet bepárolva világoszöld színű, szilárd por maradt a lombikban. Ebből készítettünk mintát egy NMR csőbe, majd a spektrumot az online adatbázis segítségével

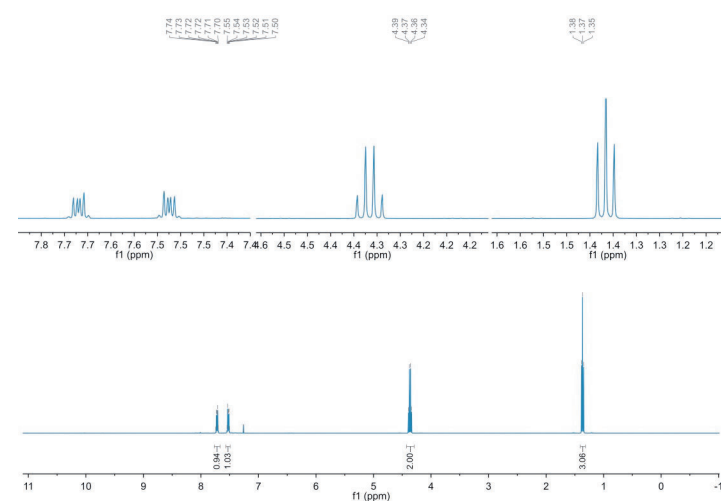


vel kiértékeltek. Az eredmény pedig választ adott arra, hogy miért élénkítő hatású a zöld tea, ugyanis a mintánk egy koffein oldat volt. (A zöld színt egyéb, kis mennyiségű szennyezők okozták.)



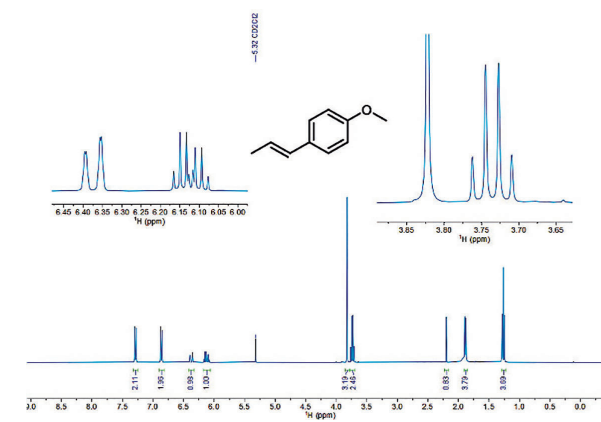
6. ábra

A következő mérés során 4 különböző, kis-boltban kapható illóolajat vizsgáltunk meg, mivel a címkéjükön feltüntetett összetétel megegyezett, bár többféle illattal rendelkeztek. Az egyikből mintát készítettünk, hogy megvizsgálhassuk. Meglepő eredményünk született: nem a címkére írt p-menta-1,8-dién vagy geranil-acetát molekulát azonosítottuk, hanem azt állapítottuk meg, hogy a minta egy harmadik összetevőt, dietil-ftalátot tartalmazott túlnyomó részben. Ezt oldószerként alkalmazzák, míg a két feltüntetett összetevő csupán benne oldott illatanyag. Tehát arra a konklúzióra jutottunk, hogy az összetevők listája helytelenül került az illóolajra, ami így akár nem várt allergiás reakciót is okozhat.



7. ábra: A dietil-ftalát spektruma

Egy másik mérésben az Ouzo aromaanyagát próbáltuk meghatározni. Ez egy görög eredetű biró, többek között ánizzsal ízesített szeszital. A minta előkészítéséhez az ital 35 cm<sup>3</sup>-es mennyiségét 10 cm<sup>3</sup> diklórmetánnal elegyítettük, majd 1 perces extrakció után, amit Vortexen végeztünk, elválasztottuk a szerves fázist, ami a diklórmetán esetében rendhagyó, ugyanis alul helyezkedett el, mivel a víznél nagyobb sűrűségű oldószerrel volt dolgunk. A víz maradékát nátrium-szulfáton történő szárítással távolítottuk el, majd a diklórmetánt és a vele elegyedett etanolt rotációs vákuumbepárlón történő bepárlással távolítottuk el. A szilárd anyagot 0,75 cm<sup>3</sup> deuterált kloroformban oldottuk fel. A kapott spektrumot elemezve megkaptuk, hogy a keresett aromaanyag az anetol, amely édesítőszerként is alkalmazható, mivel a kristálycukornál tizenháromszor édesebb. Ez az aromaanyag okozza azt a jelenséget, ami az Ouzo behűtésekor figyelhető meg. Ha 20 °C alá helyezzük az italt, abban fehér pelyhekben kiváló szilárd anyag figyelhető meg, ami nem más, mint az anetol.



8. ábra: Az anetol <sup>1</sup>H-NMR spektruma

Végül pedig megvizsgáltunk egy közszájon forgó bölcsességet, miszerint a C-vitamin-tartalmú zöldségeket/gyümölcsöket nem célszerű sokáig főzni, a C-vitamin ugyanis lebomlik és nem fejt ki jótékony hatásait. A hiedelem igazolására 150 mg aszkorbinsavat mértünk be mikrohullámú reaktor csövébe, majd 2 cm<sup>3</sup> D<sub>2</sub>O-ban oldottuk. A

mikrohullámú reaktorban 150 °C-on 30 percig kevertettük a mintát, majd a belőle felvett spektrumot összehasonlítottuk egy frissen készített oldatével, majd kissé meglepődve azt tapasztaltuk, hogy a C-vitaminnak nagyon kis mennyisége, mindössze 2-3% bomlott el. Persze ettől még a bölcsesség nem tekinthető megcáfoltnak, a valódi főzés ugyanis nem tiszta vízben (vagy nehézvízben) történik, így számos másik anyag is jelen lehet, amivel a C-vitamin elreagálhat.



9. ábra: A C-vitamin tartalmú minta behelyezése a mikrohullámú reaktorba

## Összefoglalás:

A héten megismerkedhettünk az NMR-spektroszkópia alapjával, a készülékek működésének alapvető elgondolásai-val. Megtanulhattuk, hogyan kell egy mintát előkészíteni és azt behelyezni a műszerbe, valamint hogyan lehet a mérést elindítani és kiértékelni. Belemélyedtünk a spektrumok értelmezésébe, azok logikai rejtvényekhez hasonló megfejtésébe. És persze a körülöttünk található, alapvető termékekből próbáltuk kinyerni a szerves alkotót és megfejteni annak szerkezetét. Ebben az izgalmas vizsgálódásban nagy segítségünkre voltak témavezetőink, Teski Tamara, Balterer Bence és Turczel Gábor, akiknek utólag is szeretnénk megköszönni a támogatást.



# Az ABC multidrogtranszporterek hatása a gyógyszerkezelések hatékonyságában

**Batka András**

Pannonhalmi Bencés Gimnázium és Szakkollégium

**Behofsits Maja**

Soproni Szent Orsolya Római Katolikus Gimnázium

**Témavezetők:**

**Dr. Telbisz Ágnes** tudományos főmunkatárs

**Bodnár Anikó** biológus

**Kutatócsoport:**

Génreguláció Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet



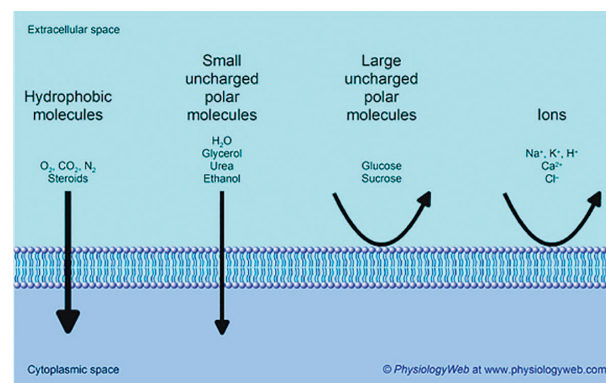
## Átlépés a membránon - a membránfehérjék szerepe

A sejteket a külvilágtól egy szemipermeabilis biológiai membrán határolja el. Ez az elhatárolás segít abban, hogy a sejt saját belső terét a neki megfelelő állapotúra szabja. Mivel egy féligáteresztő membránról beszélünk, ezért nem minden molekula képes rajta átjutni – hasznosak és károsak egyaránt.

Mielőtt jobban belemennénk, tekintsük át a biológiai membránok alapvető szerkezetét. A biológiai membránok alapvető univerzális alkotórészei a kettős réteget alkotó foszfolipid molekulák és a koleszterin. Ezek a foszfolipid molekulák amfipatikusak, tehát van mind hidrofíli, mind hidrofób részük is. A hidrofíli foszfátcsoport néz az intra- és extracelluláris tér felé is, a 2 szénhidrogénlánc pedig egymás felé fordulva áll. Ezen a kettős rétegen alapvetően csak kisebb molekulák, valamint hidrofób anyagok jutnak át (1. ábra). A körülbelül glükózméretű és annál nagyobb molekulák, valamint az ionok számára ez a kettős réteg átjárhatatlan. Ellenben közismert az a tény, hogy például egy sejt egészséges működéséhez nélkülözhetetlenek a cukor molekulák.

Akkor felmerül a kérdés, hogy mégis ezek a molekulák hogyan jutnak át a membránon.

Könnyen feloldható ez a kérdés, hiszen a membránok még tartalmaznak sokféle funkciót betöltő fehérjéket a foszfolipid molekulákon kívül. Jelen esetben mi most a membrántranszport folyamatokra kihegyezve tanulmányozzuk a sejtmembránját.



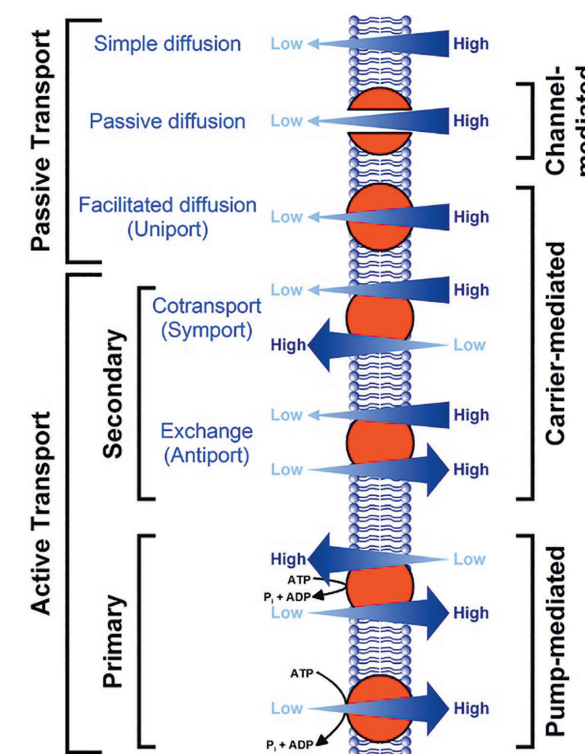
1. ábra: A szemipermeabilis membrán

A különböző anyagok membránon történő átjutását úgynevezett membrántranszportfehérjék segítik. Két nagy csoportot különböztetünk meg alapvetően a transzportfo-

lyamat energiaigényét tekintve: a passzív és az aktív transzportot (2. ábra). A passzív transzporthoz a sejtnek nem szükséges energiát befektetnie, a transzport energiaigénye általában a koncentrációkülönbségből adódó energiából fedeződik. Legegyszerűbb esete a már tárgyalt egyszerű diffúzió, amikor az adott részecske magától képes átjutni a membránon, bármiféle segítség nélkül. A facilitált diffúzió esetén az anyagunk egy csatornán vagy hordozón keresztül jut be a sejtbe szintén koncentrációkülönbség alapján energia befektetés nélkül. Az aktív transzport esetén a szállításhoz szükséges energia származásának megfelelően megkülönböztetünk elsődleges, illetve másodlagos aktív transzportot. Elsődleges esetén a transzporthoz szükséges energia ATP bontásából fedeződik. Ez esetben lehetőség nyílik egy, vagy akár több anyag koncentrációgradienssel szembeniállítására a membrán két oldala között. Másodlagos aktív transzportról akkor beszélünk, amikor az energia egy másik molekula koncentrációgradienssel megegyező irányba történő transzportjából fedeződik. Ezt a jelenséget kotranszportnak nevezzük. Ezen belül is megkülönböztethetünk a két anyag egymáshoz viszonyított irányára szerint alapvetően két típust: A szimportot és az antiportot. Szimport esetén a két részecske azonos irányban, míg antiport esetén ellenkező irányba mozog. (2. Ábra)

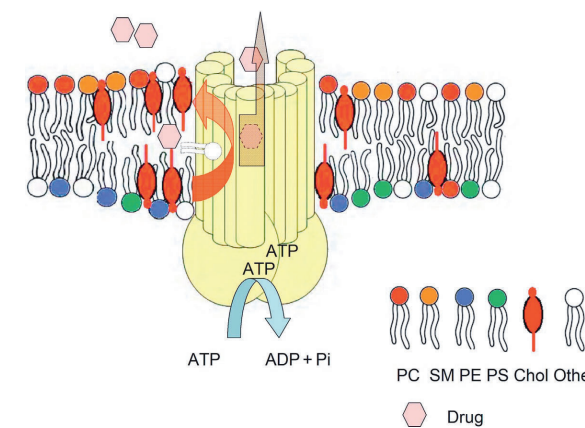
## A membrán kapuőrei - az ABC multidrog transzporterek

Az ABC multidrogtranszporter családba olyan membrántranszportfehérjék tartoznak bele, amelyek különböző, jellemzően hidrofób molekulákat kötnek meg még a membránban, az erre specifikus transzmembrán kötőhelyeiken, és ATP bontás hatására bekövetkező térszerkezet változással az extracelluláris térbe lökik azt (3. ábra). Nevüket a 2 db ATP Binding Casette szekvenciájukról kapták, amelyek a citoplazmába lógva gömbölyű téralkatot vesznek fel, és nem meglepő módon az ATP bontás végzik. Tehát a kilö-



2. ábra: A membránfehérjék transzporter működése

kés folyamata két részre tagolható: a fehérje transzmembrán részén a hidrofób szubsztrát molekula megkötődik, a fehérje belsejébe kerül. Második lépésként pedig a fehérje az intracelluláris tér felé néző ATP kötőhelyein ATP-t bont el, és az ebből származó energia felhasználásával, újabb térszerkezetváltozás eredményeképpen a szubsztrát molekulát kilöki az extracelluláris térbe.



3. ábra: Az ABC transzporterek működése

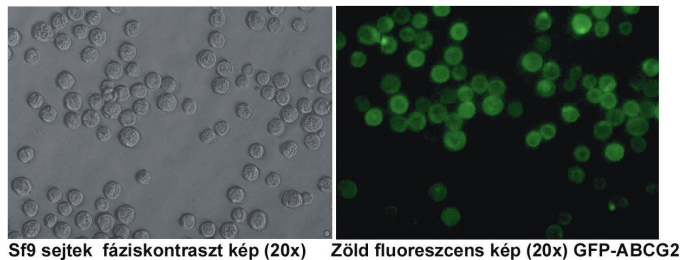


Az ABCG2 egy multidrog rezisztenciát okozó fehérje, azon belül egy féltranszporter mivel van benne egy transzmembrán domén és egy nukleotid kötő domén. Két „féltranszporter” összeállásával alakul ki a működőképes teljes transzporter. Az ABCG2 nagyon sokféle drogot tud kipumpálni a sejtéből, ezt a gyógyszeriparnak kötelező jellemezni. Az ABCG2 a második legfontosabb multidrogtranszporter rögtön az ABCB1 után. Az ABCG2 a határfelületeken található meg, mint az agy-vér gát, az emlő, a máj-epe, a méhlepény, a vese, a bélhám, az ivarszervek és a tumor. A multidrog rezisztenciát a tumorkezeléssel kapcsolatban fedezték fel. Ha az ABCG2 kismértékben van jelen a tumorsejtben akkor a kemoterápia be tud jutni a rákos sejtbe és könnyen elpusztítja azt, viszont a kemoterápiás szer a kölcsönhatása révén fokozhatja az ABCG2 jelenlétét. Emiatt egy következő kemoterápia esetén az adott kemoterápiás gyógyszer és ezzel együtt más ABC transzporter szubsztrát gyógyszerek nem jutnak be a rákossejtbe és így nem tudják elpusztítani a sejtet. Ezt nevezzük multidrog rezisztenciának.

A kutatótábori munka során az ABCG2 fehérje kimutatására és funkciójára vonatkozó méréseket ismerhettünk meg.

#### Az ABCG2 fehérje nyomkövetése és azonosítása a sejtekben, membránokban

A GFP-vel jelzett ABCG2-t Sf9 rovarsejtben (4. ábra) fejeztük ki. Bakulovírus fertőzéssel vittük be. A GFP egy kisméretű zölden fluoreszkáló fehérje ami hozzákapcsolódik az általunk kiválasztott fehérjéhez és emiatt a megfertőződött sejtekben a fehérje láthatóvá válik a fluoreszcens fényben (4. ábra jobb oldal). Az ABCG2 génjét beleültettük plazmidba, majd pedig a bakulovírusba ami rekombinánsná vált. A rekombináns azt jelenti, hogy a vírust már átalakítottuk. A modell sejtekben minél nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje keletkezik annál jobban mérhető eredményt kaphatunk. A szín intenzitása függ a fertőzés mértékétől is.



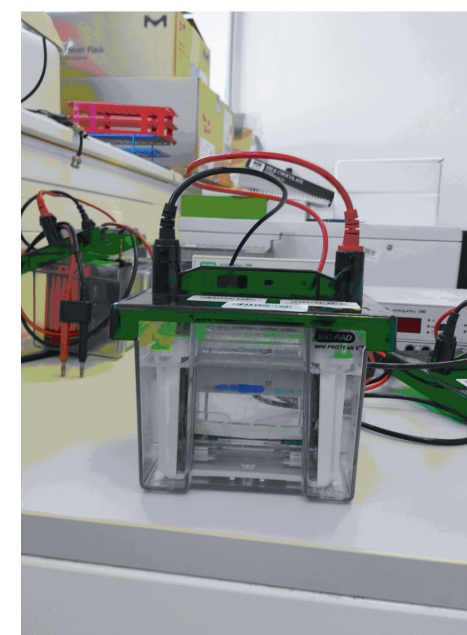
Sf9 sejtek fáziskontraszt kép (20x) Zöld fluoreszcens kép (20x) GFP-ABCG2

4. ábra: GFP-ABCG2 az Sf9 sejtekben

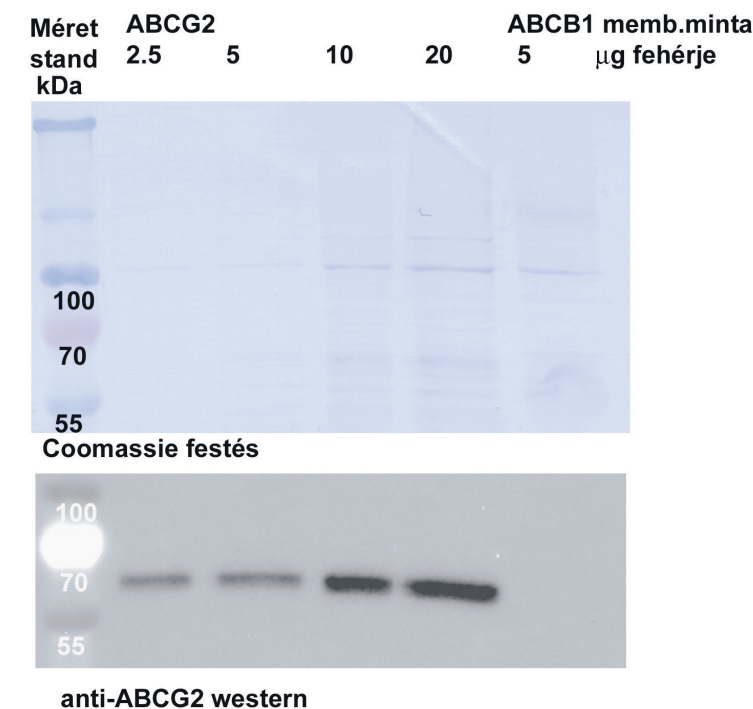
Az ELFO-t azaz az elektroforézist nukleinsavak és fehérjék elválasztására használjuk. A fehérjéket először denaturáljuk majd egy akrilamid gél lapon futtatva, elektromos mezőben, a többféle fehérjét tartalmazó mintát méret szerint szétválasztjuk. A negatívan töltött fehérjék a méretükhöz viszonyított sebességgel haladnak a pozitív pólus felé. A gél két részből áll, felül van a fésűgél ami egy kicsit hígabb, ebben vannak a mintafelviteli zsebek, alul töményebb a gél, ez a lapgél ahol a szétválasztás megy. Mi 7,5%-os géllal dolgoztunk. A többkomponensű gélt két rögzített üveglap között megöntjük először a lapgél, majd dermedés után a fésűgél és behelyezzük a mintatartó helyeket kialakító fésűt és hagyjuk dermedni. A megöntött lapokat belerakjuk az ELFO kamrába amit pufferrel töltünk meg. Ezután felvisszük a mintát a zsebekbe. A minta felvitele után elkezdjük a futtatást. A fésűgélben 25mA-ral, a lapgélben 120V-tal, általában másfél óráig tart a futtatás. A mintafelvitelnél használt puffer brómfenolkéket is tartalmazott ami mutatta a fehérjefront haladását, ezáltal tudtuk meddig kell végeznünk az elektroforézist. Az elektroforézis után a fehérje csíkokat meg lehet festeni például Coomassie festéssel. A géllapról a fehérjéket azonos elhelyezkedéssel átfuttatjuk egy géltre fektetett PVDF membránra egy másik készülékben (ez a blotolás), majd a vizsgálni kívánt fehérjéket a hozzájuk kötődő antitesttel megjelölhetjük. A western blot a fehérjék vizsgálatára lett kifejlesztve. A western blot eljárásnál a célzott fehérje festéshez specifikus antitestet (elsődleges antitest) és egy ehhez kapcsolódó

jelölt másodlagos antitestet is szükséges használnunk. Mi anti-ABCG2 antitestet (egér IgG2b, BXP-21) és egy tormaperoxidáz-hoz kötött anti-egér IgG antitestet használtunk. A tormaperoxidáz egy megfelelő szubsztrátból lumineszcens jelet készít azon a helyen ahol az antitest a PVDF membránhoz kötődött, ezt röntgen filmen vagy lumineszcens képkalkító berendezésben detektálhatjuk (4. ábra).

nyiségben legyen jelen ez a fehérje. Emellett fontos az is, hogy a fehérje ATP kötőhelyei a membránvezikulából kifelé nézzenek, hiszen így mérhető az ATP fogyasztás. A fentieket úgy érjük el, hogy Sf9 rovarsejteket megfertőzünk bakulovírusal, amelybe előzetesen az ABCG2-t kódoló humán DNS-t már előzetesen „beletettük”. A begyűjtött sejteket ezután homogenizáljuk, majd frakcionáljuk centrifugálással, így előállítva a méréshez



5. ábra: ABCG2 Western kimutatás



#### Az ABCG2 működése - hogyan mérjük meg a védőpajzs hatékonyságát?

A fehérje működésének vizsgálatára pedig egy ATPáz mérést végeztünk az ABCG2 két szubsztrátjával, a chrysinnel és a quercetin-nel. Mind a kettő antioxidánsként árusított flavonoid tartalmú gyógyhatású készítmények egyik alkotó anyaga. Arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon ezek kölcsönhatásba lépnek-e az ABCG2 membrántranszporterünkkel. Erre alkalmas az ABCG2 ATPáz aktivitásának mérése ezen anyagok jelenlétében, ezáltal lehet következtetni hatékonyságukra. A méréshez ABCG2 fehérjét tartalmazó membránvezikulát használunk. Először el kell érniük, hogy a mintamembránunkban nagy mennyiségben legyen jelen ez a fehérje. Emellett fontos az is, hogy a fehérje ATP kötőhelyei a membránvezikulából kifelé nézzenek, hiszen így mérhető az ATP fogyasztás. A fentieket úgy érjük el, hogy Sf9 rovarsejteket megfertőzünk bakulovírusal, amelybe előzetesen az ABCG2-t kódoló humán DNS-t már előzetesen „beletettük”. A begyűjtött sejteket ezután homogenizáljuk, majd frakcionáljuk centrifugálással, így előállítva a méréshez

már megfelelő membránvezikulákat. Azonban ügyelnünk kell arra is, hogy a sejt belső teréhez hasonló környezetet teremtünk annak érdekében, hogy a fehérjék normálisan működjenek. Illetve azt sem szabad elfelejtenünk, hogy habár az ABCG2 nagy mennyiségben van jelen a membránvezikuláinkban, nem az egyedüli fehérje. Ezért a többi ATPáz-t blokkolnunk kell, hogy ne zavarják a mérés pontosságát. A fentieknek megfelelően a pufferoldatunk tartalmaz EGTA-t, Na-azidot, Ouabaint, mint gátlószereket és KCl-ot, valamint DTT-t a megfelelő környezet megteremtéséhez. Természetesen a pH is 7 körüli, és az ozmotikus viszonyok is a sejtben uralkodókat imitálják. Harmadik





6. ábra: ABCG2 funkció mérés (ATPáz) (Pi - foszfátion koncentráció, inh=inhibitor)

lépésként, a kész pufferoldatunkhoz hozzáadhatjuk a membránvezikulákat megfelelő, azonos mennyiségben, majd hozzáadhatjuk a szubsztrát molekulát is. A vizsgálni kívánt anyagokat DMSO-ban (dimetil-szulfoxid) oldottuk, amely az alkoholhoz hasonlóan amfoter sajátságú vegyület, és ebből nagyon kis térfogatban adtuk hozzá a reakcióhoz ezeket. A mintákhoz (3mM) Mg-ATP-t adunk, és ezután 20 percen keresztül 37°C-on inkubáljuk. Ezután leállítjuk a reakciót, és kimutatjuk a számolásunk alapját képező ATP-ről lehasadt foszfátot. Másodikként egy olyan reakcióba visszük bele a mintát, ahol egy színes komplex képződik a foszfát ionból, amelynek az optikai denzitását meg tudjuk már mérni. A mérést 15 perc után 660 nm-es hullámhosszon ejtjük meg spektrofotométerrel. Azonban a mérés leírásából még hiányzik egynéhány minta, amelyek a számoláshoz nélkülözhetetlenek. Számolni kell egy alapvető háttérrel is, ami azt jelenti hogy a puffernek sem egészen nulla az OD értéke, és ezt az értéket minden mérési eredményünkből le kell vonnunk a pontos számolások folytatásához. Egy olyan mintát is készítünk, amely az ATP önbomlását méri azáltal, hogy csak ATP-t tartalmaz, membránt nem. A harmadik mérést pontosító mintánk pedig minden alkotórészt tartalmaz, sőt még vanadátot is adunk hozzá. A vanadát az ABCG2 gátlószere, így

ez a minta alkalmas arra, hogy megmérjük, hogy mennyi ATP bomlott el más fehérjék működése által (habár ezt különböző gátlószerekkel megpróbáltuk megakadályozni, mégis fellép egy alacsony érték, amivel érdemes számolni). Most már csak a számolás menetével vagyunk adós. Ehhez azonban még meg kell mérnünk egy sor standard mintát. Ismert mennyiségű foszfátot (Pi) tartalmazó minták ezek, amelyeket szintén beleviszünk a kimutatási reakcióba, és megmérjük az OD értéküket. Ezen értékek alapján felállítunk egy referencia egyenest, és így már a mérendő minták OD értékeit könnyedén áttudjuk számolni Pi koncentráció értékekre. Végezetül az aktivitás egysége nmol Pi/min/mg protein, tehát szükséges adat még az összes protein mennyisége is, ami mérésünkben 5 μg/minta, és az idő pedig 20 perc, amit már



említettünk. Mérésünk eredményeiből pedig láthatóak, hogy igen, mind a két antioxidánsunk már igen kis koncentrációban jelentős aktivitás változást eredményez. Az eredményekből pedig nyugodtan levonhatjuk azt a következtetést, hogy ezek az anyagok nem igazán hatékony antioxidánsok, hiszen ismerve az ABC multidrogtranszporterek funkcióját, még csak be sem jutnak a sejtbe, hogy kifejtsék ott hatásukat. De ez persze mennyiség kérdése is.





# Új, potenciálisan bioaktív molekulák előállítása és jellemzése

**Darázs Anna**

Révai Miklós Gimnázium és Kollégium, Győr

**Káldy Fruzsina**

ELTE Bolyai János Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium, Szombathely

## Témavezetők:

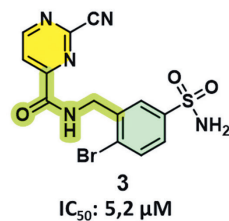
**Kollár Levente** PhD hallgató

**Dr. Kovács Péter** tudományos főmunkatárs

## Kutatócsoport:

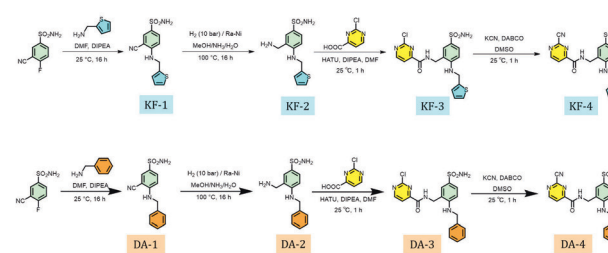
Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Szerves Kémiai Intézet

A pár évvel ezelőtt kitört Covid19-járvány az élet minden területére drasztikus hatást gyakorolt, természetesen a gyógyszerkutatás sem volt ez alól kivétel. A gyógyszerkutatók érdeklődése többek között olyan hatóanyagok fejlesztésére irányult, melyek a vírus működését a betegség lefolyásának szempontjából kedvezően befolyásolják. Több biológiai célpontot is validáltak, ezek közül az egyik az úgynevezett M<sup>pro</sup> (Main Protease), a vírus főproteáz-enzime volt. Az említett enzim kulcsfontosságú szerepet játszik a vírus replikációjában, emellett alacsony homológiát mutat emberi endogén proteázokkal, így ideális célpontnak bizonyult alacsony toxicitásával, nagymértékben specifikus proteáz inhibitorok kutatásához. A Gyógyszerkémiai Kutatócsoport együttműködő partnerei röntgendiffrakciós fragmens-szűrés segítségével azonosították a pirimidin-2-karbonitrilt (**1**) és 4-brómbenzoszulfonamidot (**2**), mint az M<sup>pro</sup>-val kölcsönhatásba lépő, a kötőzsebben egymáshoz viszonylag közeli helyeken kötődő molekulákat (1. ábra). Több molekulát is terveztek és előállítottak, ahol a két fragmenst egy pár atom hosszúságú távtartó (linker) segítségével kapcsolták össze. Az 1. ábrán látható (**3**) molekula bioaktivitása volt számottevő.



**1. ábra:** Azonosított fragmensek, valamint a linkerrel összekötött legaktívabb származék

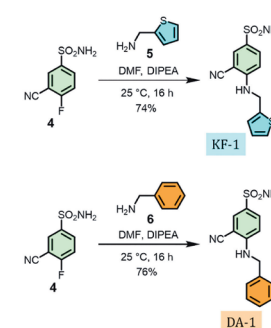
Számításos kémiai vizsgálatok alapján azt feltételezték, hogy az említett aktivitást tovább lehetne javítani azáltal, ha a bróm szubsztituenst egy öt-, vagy hattagú gyűrűre cserélik, ami egy-két atom hosszúságú távtartón keresztül kapcsolódik a molekulához. Így születtek meg a **KF-4** és **DA-4** jelzésű molekulák, melynek a szintézisén dolgoztunk a kutatótábor folyamán. Első lépésként témavezetőinkkel kidolgoztunk egy-egy négy lépéses szintézistervet (2. ábra). A kutatótábor során reális célul a harmadik lépéséig való eljutást tűztük ki. Mindketten ugyanolyan típusú reakciókat végeztünk.



**2. ábra:** A kidolgozott szintézisterv

## Aromás Nukleofil szubsztitúció

A hét során első feladatunk egy-egy aromás nukleofil szubsztitúció elvégzése volt (3. ábra).

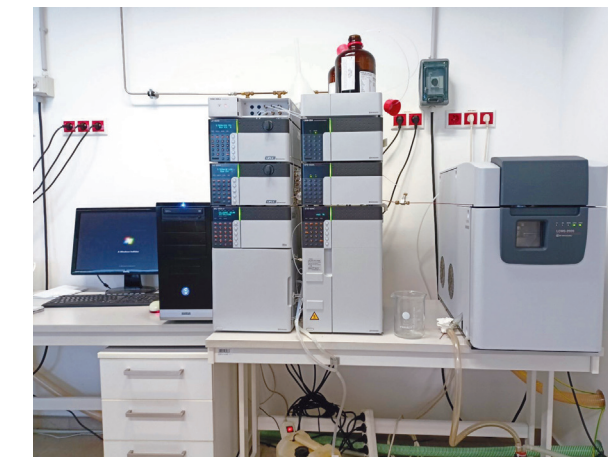


**3. ábra:** Aromás nukleofil szubsztitúciós reakciók

Első lépésben analitikai mérleggel kimértük a kiindulási anyagot, a 3-ciano-4-fluor-benzoszulfonamidot (**4**), amelyet feloldottunk dimetilformamidban (DMF). Az oldathoz automata pipettával diizopropil-etil-amint (DIPEA) adtunk, amely a reakcióban bázisként vett részt, feladata a szubsztitúció során keletkező hidrogén-fluoridot megkötése volt. Végül a reakcióelegyhez hozzáadtunk a megfelelő primer amint: a **KF-1** előállításához 2-aminometil-tiofént (**5**), a **DA-1** szintézise során pedig benzil-amint (**6**) használtunk. A reakciók 16 órán át zajlottak szobahőmérsékleten, az állandó keverést mágneses keverővel biztosítottuk.

Kíváncsiságból a reakció kezdete után egy órával mintát vettünk a két elegyből, és tömegspektrométerrel kapcsolt nagy hatékonyságú folyadékkromatográfás készülék (HPLC-MS, 4. ábra) segítségével analizáltuk a reakcióelegyek összetételét. A folyadékkromatográfia (HPLC) során a minta komponensei a mozgó fázisban (acetonitril és víz változó összetételű elegye) áthaladnak egy C18-módosított szilikagélt tartalmazó oszlopon (álló fázis), így polaritás szerint elkülönülnek. Az egyes anyagok elúcióját UV-detektor segítségével azonosítjuk, további információt az adott komponensekről a tömegspektrométer (MS) segítségével nyerünk,

ahol megtörténik az molekulák ionizációja és fragmentációja. A kapott spektrumok és kromatogramok elemzésével átfogó információhalmazt kaphatunk keverékünkéről.



**4. ábra:** HPLC-MS

Az UV-kromatogram és az MS spektrumban megjelenő tömegek arra engedtek következtetni, hogy 1 óra elteltével már mindkét elegyben jelen volt a kiindulási anyag mellett a megfelelő termék. 16 óra eltelté után újra megvizsgáltuk a reakcióelegyet HPLC-MS segítségével, és arra következtettünk, hogy a reakciók végbementek, a **DA-1** reakciónál a konverzió teljes volt, míg a **KF-1** reakciónál jelen volt minimális mennyiségben a kiindulási anyag is.

A termékek tisztításának első lépéseként folyadék-folyadék extrakciót végeztünk. A reakcióelegyeket etil-acetáttal hígítottuk, választótölcsérbe töltöttük, majd desztillált vízzel átmostuk a szerves fázist, hogy a vízoldható szennyeződések eltávolítsuk. Két különböző Erlenmeyer-lombikba gyűjtöttük a két fázist, majd a vizes fázist újra átmostuk etil-acetáttal, hogy a termékvesztéseket minimalizáljuk. Végül az egyesített szerves fázist vízmentes MgSO<sub>4</sub>-tal szárítottuk. Szűrőpapírral bélelt tölcserén kiszűrtük a MgSO<sub>4</sub>-ot, majd a szűrletet rotációs vákuumbepárló segítségével bepároltuk (5. ábra). Ez a készülék lehetővé teszi a magasabb forráspontú anyagok nagymértékű melegítés nélküli desztillációját enyhe körülmények között.

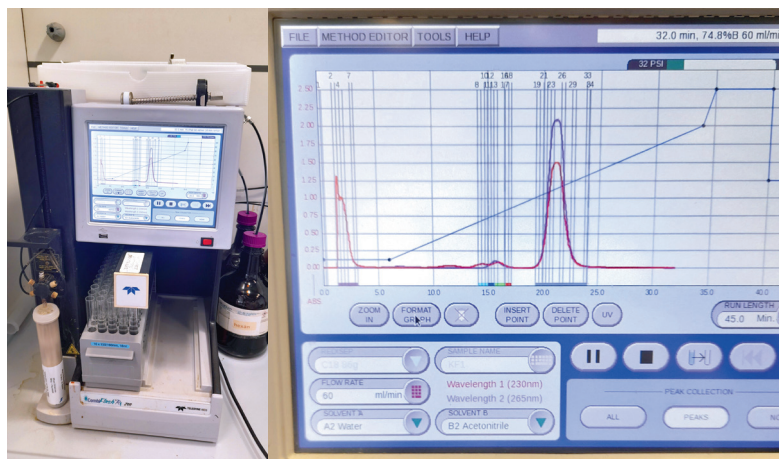




5. ábra: Rotációs vákuumbepárló

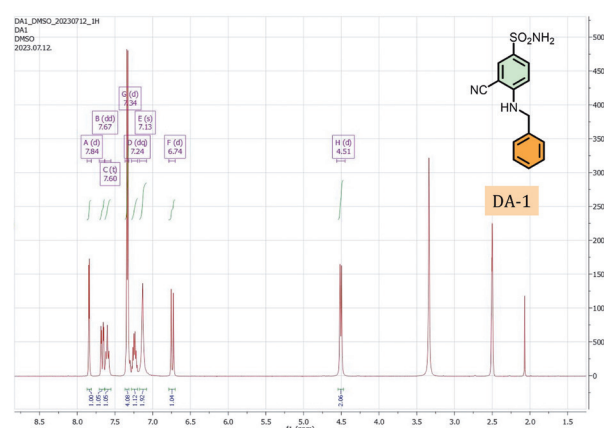
Rövid időn belül a lombikok falára fehér, szilárd anyag vált ki. A tisztítás következő lépéseként fordított fázisú flash oszlopkromatográfia (6. és 7. ábra) segítségével választottuk szét a keletkezett termékeket a megmaradt szennyezőktől. A készülék működése sok hasonlóságot mutat a korábban bemutatott HPLC-vel, azonban használatának nem analitikai, hanem preparatív célja van. A gömbloblikok falára kivált anyagokat feloldottuk kis mennyiségű DMF-ban, majd egy fecskendővel a kromatográfias oszlopba injektáltuk. Eluensekként desztillált vizet és acetonnitrilt alkalmaztunk, mindegyikhez 0,1%-os HCOOH-módsítót tettünk, ezzel is segítve az anyagok elválását egymástól. Az álló fázis C18-módsított szilikagéllal töltött oszlop volt.

A sikeresen elválasztott termékeket tartalmazó frakciókat egyesítettük egy-egy gömbloblikban, majd rotációs vákuumbepárló segítségével lepároltuk az oldószereket. A gömbloblikok falán kivált fehér szilárd anyagok már a tiszta termékek voltak. A **DA-1** reakció 76%-os termeléssel, míg a **KF-1** reakció 74%-os preparatív termeléssel ment végbe. Ahhoz, hogy meggyőződjünk a termék tisztaságáról, <sup>1</sup>H-NMR spektroszkópiát is végeztünk. A mért spektrumok (8. és 9. ábra) is igazolták, hogy az utolsó bepárlás végén kapott termékeink valóban a várt **KF-1** és **DA-1** vegyületek voltak, melyeket megfelelő tisztasággal izoláltunk.

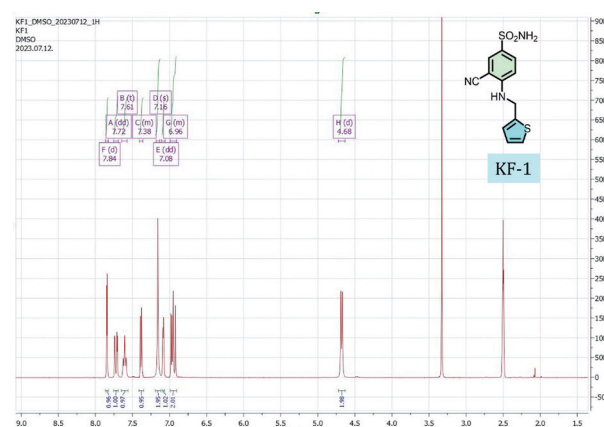


6. ábra: Flash kromatográf működésben (balra)

7. ábra: A **KF-1** reakció flash kromatogramja (jobbra)



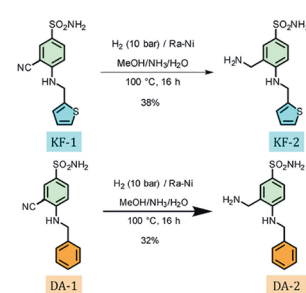
8. ábra: A **DA-1** vegyület <sup>1</sup>H-NMR spektruma



9. ábra: A **KF-1** vegyület <sup>1</sup>H-NMR spektruma

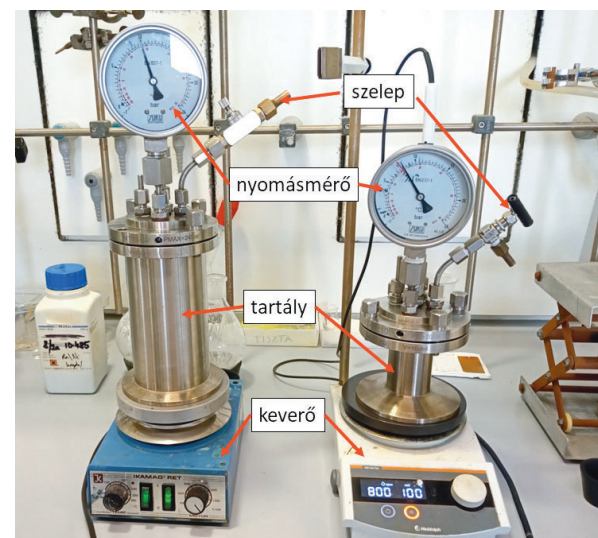
## Katalitikus hidrogénezés

A szintézis második lépésében egy-egy katalitikus hidrogénezést végeztünk el (10. ábra). A **KF-1**, illetve a **DA-1** molekulákat Raney-nikkel katalizátor jelenlétében nagy nyomású H<sub>2</sub>-vel reagáltattuk, így végeztük a nitrilcsoport redukcióját. A reakciók autoklávban zajlottak, ami egy acélból készült, nyomástartó készülék (11. ábra).



10. ábra: Katalitikus hidrogénezési reakciók

Az előző lépésben kapott termékeinket (**KF-1** és **DA-1**) ammóniával telített metanol és víz elegyében feloldottuk, majd az oldathoz Raney-nikkel katalizátort adtunk. A keverékekhez mágneses keverőmagot tettünk. Az autokláv



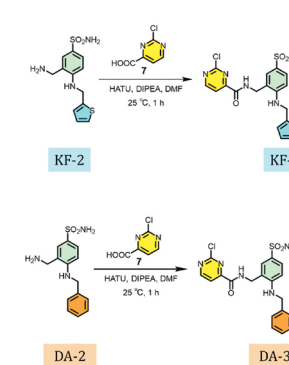
11. ábra: Autoklávok

tetejét csavarokkal gondosan rögzítettük, majd a felső szelepen át argonos atmoszférát követően a készüléket megtöltöttük hidrogéngázzal. A feltöltéskor az autoklávokban uralkodó nyomás 9 bar volt. A reakciók nagy fordulatszámú, folyamatos keverés mellett, 100 °C-on 16 órán keresztül zajlottak. Másnap jeges fürdő segítségével lehűtöttük az autoklávokat szobahőmérsékletűre. Megállapítható volt mindkét reakciónál az előző naphoz viszonyítva a nyomás

csökkenése, ami a reakció lejátszódására utalt. A reakciók sikerességét HPLC-MS méréssel is igazoltuk, viszont a kromatogramok szerint a termékünk mellett más melléktermékek is keletkeztek, ami a reakciómechanizmus alapján nem teljesen váratlan. A reakcióelegyek feldolgozása során első lépésben eltávolítottuk a katalizátort. Egy üvegszűrőbe kb. 2 cm-es celit-réteget kanalaztunk, amit metanollal tömörítettük. A reakcióelegyeinket ezen a rétegen keresztül átszűrtük, a szívópalackba jutó szűrletet gömbloblikba töltöttük, majd rotációs vákuumbepárlóval megszáritottuk. A lombik falára tapadó anyagot kis mennyiségű DMF-ban feloldottuk, majd flash kromatográfia segítségével komponenseire bontottuk. Eluensekként vizet és acetonnitrilt használtunk. A megfelelő kémcsöveket egyesítve megkaptuk a tiszta vegyületeket tartalmazó oldatokat, bepárlással nyertük a szilárd termékeket. A **DA-2** reakció 32%-os termeléssel, míg a **KF-2** reakció 38%-os preparatív termeléssel ment végbe.

## N-acilezés

Utolsó feladatunk a héten két *N*-acilezés elvégzése volt. A reakciók során a kapott aminosokat (**KF-2** és **DA-2**) 2-klór-pirimidin-4-karbonsavval (**7**) acileztük, így kaptuk a **KF-3** és **DA-3** számú amidokat (12. ábra).



12. ábra: *N*-acilezési reakciók

A reakció első lépéseként a 2-klór-pirimidin-4-karbonsavval (**7**), a HATU-t és a DIPEA-t feloldottuk DMF-ban, majd mágneses keverőre helyeztük 10 percre. Erre a lépésre azért volt szükség, mert a HATU aktív észter képzett a karbonsavval, és az aktív észter reagált a kiindulási anyagainkkal. A DIPEA ebben a reakcióban is bázisként volt jelen, az aktív észter képződését segítette elő. Ezzel párhuzamosan feloldottuk az előző szintézis során kapott aminosokat (**KF-2** és **DA-2**) DMF oldószerben, majd



a 10 perc leteltével hozzácepegtettük őket az immár aktív észtert tartalmazó oldatokhoz. A reakcióelegyet mágneses keverőn egy éjszakán át kevertettük szobahőmérsékleten. 16 óra elteltével mintát vettünk az elegyekből, és HPLC-MS segítségével analizáltuk őket. Azt tapasztaltuk, hogy a termékek megjelentek, ugyanakkor még jelentős mennyiségben jelen voltak a kiindulási anyagok is. A konverzió teljessé tételének érdekében további HATU-t és DIPEA-t kellett volna hozzáadnunk a reakcióelegyekhez, ám mi ezt idő hiányában már nem végeztük el. A projekt folytatásaként a termékek tisztítása lenne a következő lépés.

### Jövőbeli továbblépési lehetőségek

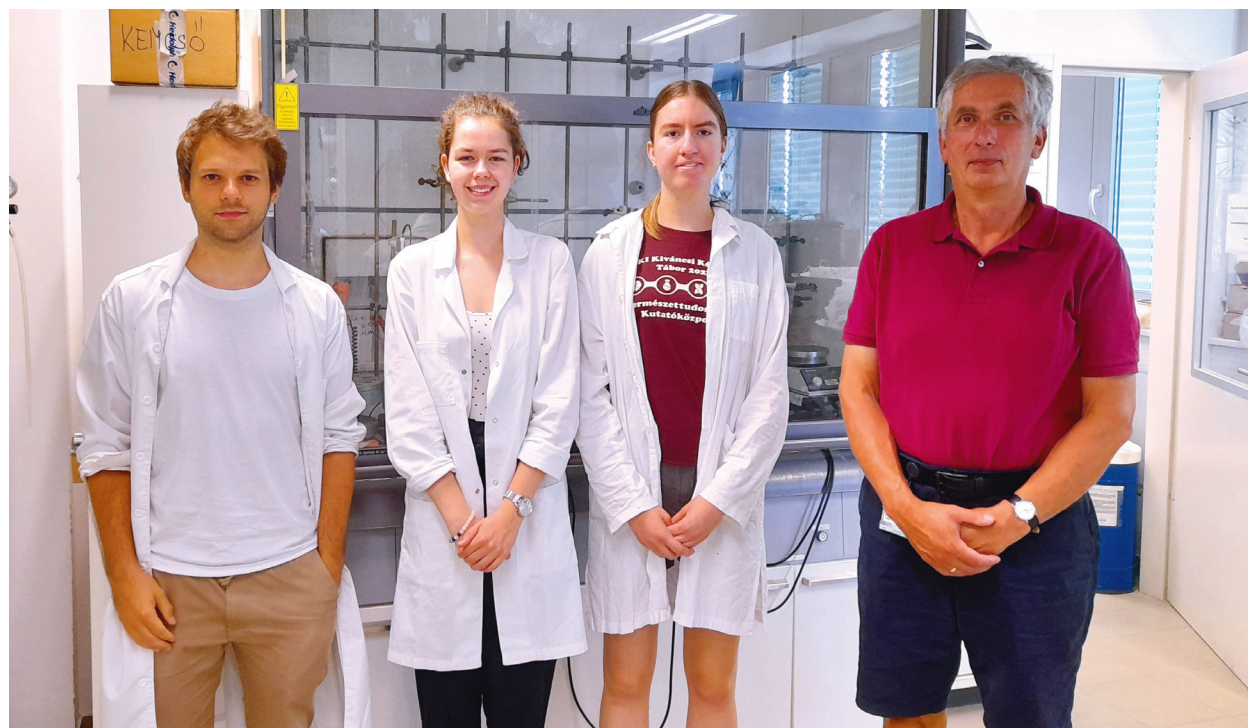
Az *N*-acilezés során kapott termékek (**KF-3** és **DA-3**) közeli származékai a célmolekulának, rendelkezhetnek biológiai aktivitással, így a jövőben a bioaktivitásuk vizsgálatára lehetőség szerint sor kerül. A negyedik, befejező szintézis lépés elvégzése maradt még hátra, mely szintén egy aromás nukleofil szubsztitúció kálium-cianid reagenssel végrehajtva. Az előálló **KF-4** és **DA-4** molekulák biológiai aktivitásának vizsgálata választ adna a kérdésre, mely szerint valóban javuló aktivitáshoz jutunk-e az eddigi legpotensebb molekulához (**3**,  $IC_{50} = 5,2 \mu M$ ) képest.



### Összefoglalás

A tábor során fejenként három reakciót végeztük el: aromás nukleofil szubsztitúciót, katalitikus hidrogénezést és *N*-acilezést, így eljutottunk a tervezett **KF-3**, illetve **DA-3** molekuláig. A munkánk során megismerkedtünk a preparatív szerves kémia eszközeivel, például a rotációs vákuumbepárlóval, az autoklávvá és a fordított fázisú flash oszlopkromatográffal. Továbbá különféle analitikai műszerek használatában is tapasztalatot szereztünk: a HPLC-MS-ében és az NMR-ében.

Ezúton is szeretnénk megköszönni témavezetőinknek, Dr. Kovács Péternek, és különösen Kollár Leventének a végtelen türelmet és segítőkészséget, amivel bevezettek minket a kutatói lét és a preparatív szerves kémia világába. Illetve szeretnénk megköszönni a tábor szervezőinek áldozatos munkáját, amivel lehetővé tették ezt a felejthetetlen hetet számunkra.



## Ugráló gének a sejtbiológiai kutatásokban

**Szilágyi Zsuzsanna Tímea**

Bolyai Farkas Elméleti Líceum, Marosvásárhely

**Gelencsér Artúr**

Budapest V. kerületi Eötvös József Gimnázium

### Témavezetők:

**Némethy Kornélia** laboratóriumi asszisztens

**Dr. Orbán Tamás** kutatócsoport vezető

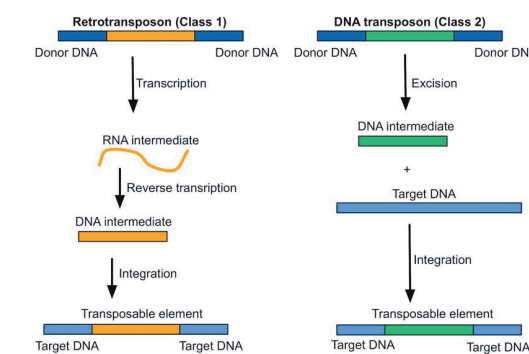
### Kutatócsoport:

Génreguláció Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet

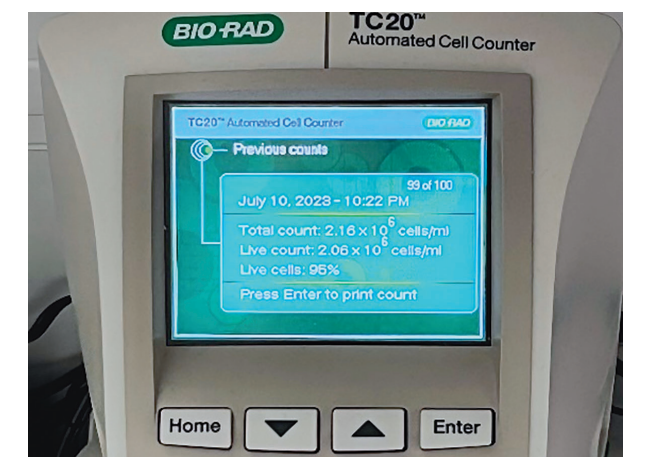


A transzpozonok, másnéven mobilis genetikai elemek vagy "ugráló gének" olyan DNS-szakaszok, melyek képesek megváltoztatni helyüket a genomon belül. Kétféle típusuk létezik: RNS-transzpozonok (másnéven retrotranszpozonok) és DNS-transzpozonok. Az RNS-transzpozonok esetében először transzkripcióval egy RNS-intermediert, majd reverz-transzkripcióval az eredeti szakasz másolata keletkezik, mely beépül a genom egy másik pontjára ("copy-and-paste" mechanizmus). A DNS-transzpozonok ellenben kivágódnak eredeti helyükről (excízió), s ezután épülnek be ("cut-and-paste" mechanizmus).

Kutatómunkánk során egy "Sleeping Beauty" névre hallgató DNS-transzpozonnal dolgoztunk. (Azért kapta ezt a nevet, mert egy olyan DNS-szakasz "reaktiválásával" hozták létre, ami az adott faj (egy lazacféle) evolúciója során mutációknak köszönhetően transzpozíciót tekintve inaktív lett.) Célunk az volt, hogy letezzeljük a transzpozon működését, avagy hogy leellenőrizzük, megtörténik-e az adott DNS-szakasz kivágódása (excízió). Ehhez HEK-293 (humán embrionális vesesejt) sejteket használtunk, melyeket először megszámláltunk egy automata sejtszámláló segítségével. Az eredmény  $2,16 \times 10^6$  db/ml lett. Ezt követően lyukanként 400 000 darab sejtet raktunk ki egy hatlyukú lemezre, majd 24 óráig 37 Celsius fokon inkubáltuk őket.



**1. ábra:** A transzpozonok két típusának működési mechanizmusa. Forrás: <https://www.onlinebiologynotes.com/transposable-elements-in-eukaryotes/>



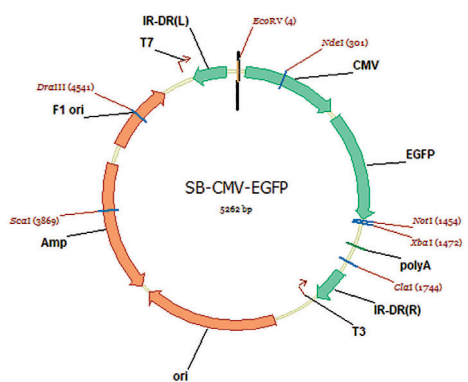
**2. ábra:** A sejtszámlálás eredménye



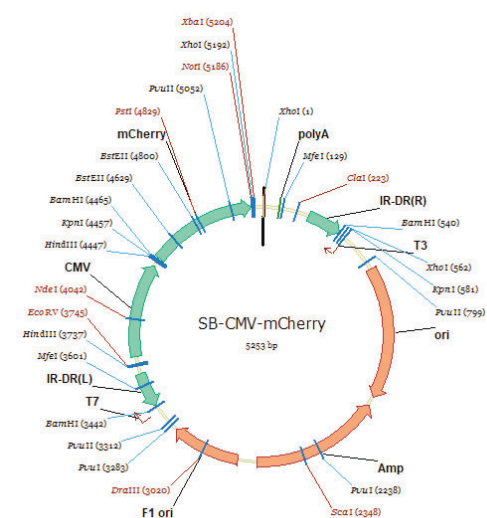


3. ábra: A sejtek lemezre helyezése

Ahhoz, hogy a Sleeping Beauty működését (excízióját) tesztelni tudjuk, a célsejtekbe kellett juttatnunk a transzpozont. Erre a célra két különböző plazmidot (cirkuláris DNS-t) használtunk (SB-CMV-EGFP és SB-CMV-mCherry), az egyik egy GFP (green fluorescent protein) nevű zöld, a másik egy mCherry nevű vörösen fluoreszkáló fehérjét kódol.



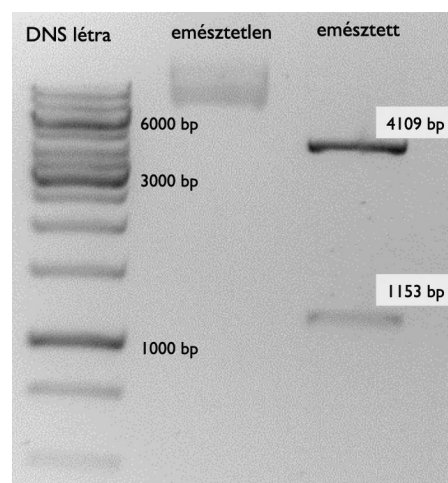
4. és 5. ábra: A két általunk használt plazmid térképe



A plazmidok megfelelő működését is ellenőriznünk kellett ahhoz, hogy reálisan tudjuk később az excízió (transzpozon kivágódása) végbemenetelét értékelni. Ezt speciális enzimekkel, úgynevezett restriktív endonukleázokkal hajtottuk végre, melyek a plazmidokat bizonyos pontokon hasítják. Mindkét plazmidot Nde1 és Not1 endonukleázokkal "emésztettük". A plazmidtérképekről leolvasható, hogy az emésztést követően az SB-CMV-EGFP plazmidnak  $1454 - 301 = 1153$  és  $5262 - 1153 = 4109$  bázispár hosszúságú szakaszokra, az SB-CMV-mCherrynek pedig  $5186 - 4042 = 1144$  és  $5253 - 1144 = 4109$  bázispár hosszúságú szakaszokra kell hasadnia. Ezt ellenőrizendő, a megfelelő vegyületek hozzáadása után emésztetlen kontrollal együtt 1%-os agaróz gélen futtattuk a plazmidmintákat, s az eredmény alapján megállapíthattuk, hogy a plazmidok működnek, tehát alkalmasak a transzpozonok, illetve a riporter gének bejuttatására a célsejtekbe.

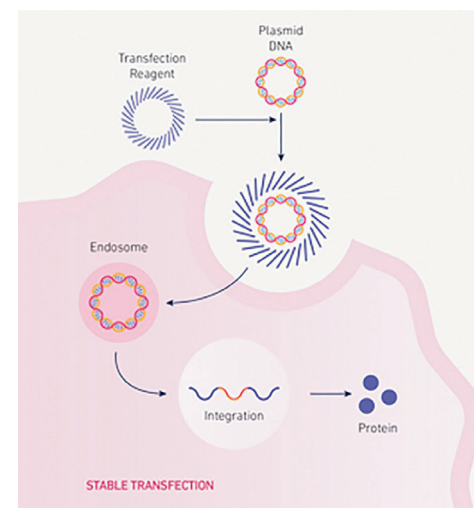


6. ábra: A minták géltre helyezése



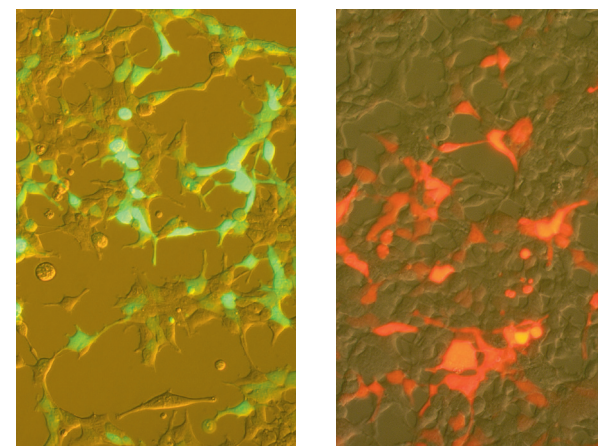
7. ábra: Az emésztett SB-CMV-EGFP futtatása után kapott gélkép. A DNS-létra alapján látható, hogy a várt eredményt kaptuk.

Ezt követte a transzfecció, avagy a két plazmid (s ezáltal a transzpozonok és riporter gének) sejtekbe juttatása. A transzfeccióhoz FuGENE®6 transzfecció reagenst használtunk. A plazmidok és a reagens a lemezen lévő sejtekhez adását követően a sejteket 48 óráig inkubáltuk.

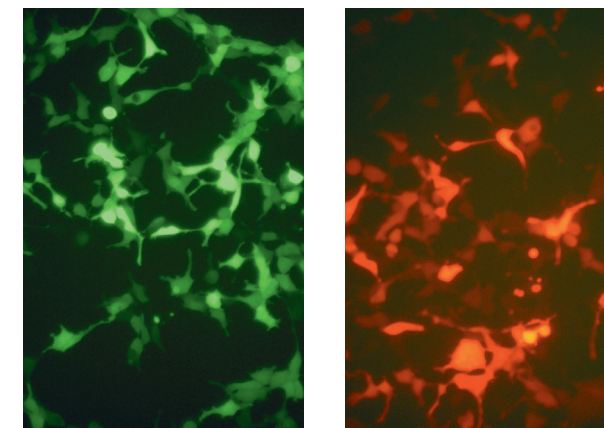


8. ábra: A transzfecció folyamata. Forrás: <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/an-introduction-to-transfection-transfection-protocol-and-applications-371627>

A transzfecciót, avagy a plazmidok sikeres integrációját (a célsejtek genomjába való beépülés) mikroszkóppal ellenőriztük, ugyanis megfelelő beépülést követően a fluoreszcens fehérjéknek immáron ki kellett fejeződniük (expresszió) a sejtekben a fehérjeszintézis során. A mikroszkópos képek alapján sikeres volt a transzfecció, a GFP (zöld) és az mCherry (piros) fehérjék jelenléte kiválóan látható a mikroszkóp megfelelő beállításai mellett.

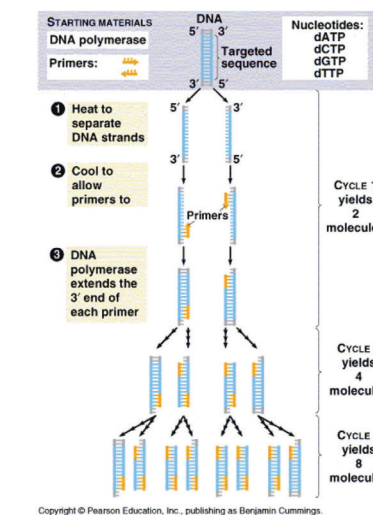


9. és 10. ábra: A transzfecciót sejtek mikroszkópos képe a megfelelő megvilágításokkal. Zölden a GFP, vörösen az mCherry fluoreszcenciája látható.



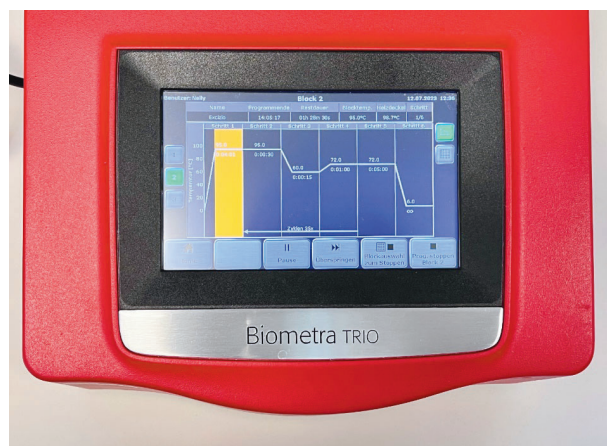
11. és 12. ábra: Áteső fény nélkül az eredmény még látványosabb.

Végül a transzpozonok excízióját ellenőriztük PCR (polymerase chain reaction - polimeráz láncreakció) mechanizmussal. A PCR egy adott DNS-fragmentumot sokszorosít DNS-polimeráz és úgynevezett primerek (egyszálú DNS oligomerek) felhasználásával, illetve hőmérsékletváltoztatással. A folyamat első részében  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra kell melegíteni a mintát, hogy a DNS kettős hélice szétcsavarodjon (denaturáció). Ezután  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra van szükség ahhoz, hogy a primerek (a DNS-polimeráz kötődését lehetővé tevő rövid, a sokszorosítandó DNS-szakasz 3' végére illeszkedő DNS-fragmentumok) rá tudjanak kötődni a kívánt DNS-szakaszra. Ezt követően  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a DNS-polimeráz létrehozza a szimpla DNS-szálak komplementer szálait, ezúttal már két dupla hélixet eredményezve, melyeken a folyamat újra elvégezhető - és így tovább, amíg megfelelő mennyiségben meg nem kapjuk a kívánt DNS-szakaszt (esetünkben a transzpozonok végei közötti részt).



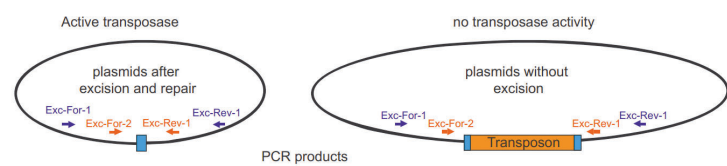
13. ábra: A polimeráz láncreakció (PCR) működési mechanizmusa.



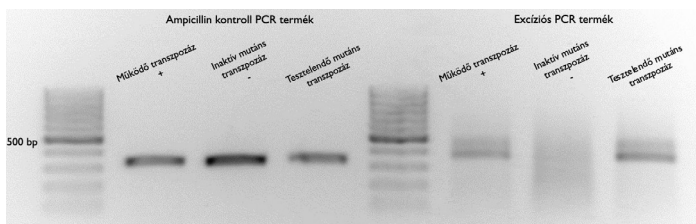


**14. és 15. ábra:** A PCR készülék a behelyezett mintákkal. A kijelzőjén látható a folyamat hőmérséklet-diagramja.

A PCR után kapott mintákat 1%-os agaróz gélen futtattuk egy olyan transzpozázzal együtt, amiről (korábbi eredmények alapján) bizonyosan tudtuk, hogy működik (pozitív kontroll), illetve egy olyanal, amiről tudtuk, hogy inaktív (negatív kontroll). Ahhoz, hogy meggyőződjünk róla, hogy a negatív kontroll nem véletlenül azért lett-e negatív, mert a mintában nem volt (elegendő) plazmid, hanem mert az általuk kódolt transzpozáz (excíziót végrehajtó enzim) mutáns, ampicillin kontroll PCR-t is futtattunk a gélen (hiszen az összes plazmid kódolt ampicillin-rezisztens fehérjét). Az mindhárom minta (a pozitív és negatív kontroll, illetve a vizsgálandó) esetében is pozitív lett, így meggyőződhattünk arról, hogy a negatív kontroll (mutáns) plazmidja mérvadó összehasonlítási alap, mivel tartalmazott plazmidot - excízióra képtelen transzpozázzal.



**16. ábra:** Az aktív, illetve inaktív mutáns transzpozázt kódoló plazmidok összehasonlítása (Raskó et al., 2022).



**17. ábra:** A PCR eredmények futtatás utáni gélképe ampicillin-kontrollal együtt.

Konklúzióként elmondhatjuk, hogy 1) a transzfecció sikerült, ki tudtuk mutatni a fluoreszcens fehérjéket kódoló úgynevezett riporter gének expresszióját a célsejtekben, illetve, hogy 2) a plazmidon található Sleeping Beauty transzpozon megfelelően működik, az excízió végbement.

Szeretnénk megköszönni témavezetőinknek a rengeteg segítséget és útmutatást, illetve a tábor szervezőinek ezt a különleges lehetőséget.

