

# **Szerkezetmeghatározási módszerek alkalmazása cianobakteriális toxinok és szintetizált biológiailag aktív vegyületek körében**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fejesné Tóth Eszter**

Témavezető: Dr. Borbély György  
egyetemi tanár



Készült:  
A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Doktori Iskolájának keretében  
A Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékén

Debrecen, 2007

# 1. BEVEZETÉS

A természetben előforduló biológiailag aktív anyagok azonosítása és koncentrációjuk minél pontosabb meghatározása a környezeti analitika egyik fontos feladata. A szerkezeti meghatározásra számos lehetőség nyílik, mint például az NMR-spektroszkópia és a tömegspektrometria. A tömegspektrometria előnye, hogy nagyon kis mintamennyiség (pg/ml) is elegendő az analízishez, ezért egyre elterjedtebben alkalmazzák a felszíni vizekben jelenlévő toxikus anyagok vizsgálatánál. Ilyen típusú alkalmazásra kiváló példát szolgáltatnak a toxikus vízvirágzások.

A vízvirágzás a planktonszervezetek felszíni vizekben való tömeges elszaporodását jelenti. Ilyenkor a vizek felszínén zavarosodás és intenzív elszíneződés figyelhető meg. Toxikus vízvirágzásról abban az esetben beszélünk, ha az ilyenkor nagyszámban elszaporodó planktonikus szervezetek egyértelműen toxikusnak minősülő anyagcseretermékeket termelnek. A Földön számos helyen megfigyeltek toxikus vízvirágzást. A XX. század ötvenes éveitől a vízvirágzás jelensége igen ritka volt, jelenleg jellemző az eutrofizálódó, azaz nitrát- és foszfátterhelt vizekre. A toxikus vízvirágzást mind prokarióta, mind eukarióta szervezetek okozhatják. A prokarióták csoportjához tartoznak a cianobaktériumok, közöttük toxikus anyagcsereterméket (cianotoxint) termelő és nem termelő szervezetek is előfordulhatnak. A toxikus cianobaktériumok elszaporodása akkor különösen veszélyes, ha a vízvirágzás ivóvízkészletet érintő víztereken történik, mivel a cianotoxinokat a szokásos víztisztítási eljárás nem tudja eltávolítani. Ráadásul az alkalmazott eljárások a cianobaktériumok lízisét is előidézhetik, így módon megnövelve az ivóvizekben a cianotoxinok koncentrációját. Az állati és humán mérgezéseket általában a cianobakteriális sejteket vagy toxikus metabolitokat tartalmazó ivóvíz, vagy táplálék elfogyasztása okozza.

A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitokat két szempont szerint csoportosíthatjuk: kémiai szerkezetük és hatásmechanizmusuk szerint. Kémiai szerkezet alapján a cianotoxinok a következő csoportokba sorolhatók: (1) ciklikus peptidok (mikrocisztin, nodularin), (2) alkaloidok (anatoxin-a, anatoxin-a(s), aplisiatoxin, cilindropermopszin, lingbiatoxin) és (3) lipopoliszacharidok. A cianobakteriális toxinokat hatásmechanizmusuk alapján négy csoportba lehet sorolni: (1) neurotoxinok (anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin, neosaxitoxin), (2) hepatotoxinok (mikrocisztinek és a nodularin), (3) citotoxinok (cilindropermopszin) valamint (4) bőrirritáló és gasztrointesztinális toxinok (lipopoliszacharidok).

A cianotoxinok kimutatására számos módszer ismeretes, ilyenek például az egérteszt, az enzimaktivitási tesztek, az *in vitro* növényteszt (BGST) és a kémiai módszerek. A kémiai módszerek közül a legelterjedtebb módszer a HPLC, melyet UV, diódasoros (PDA), MS illetve MS/MS detektorral lehet kombinálni. A jelenleg leghatékonyabb detektálási módszer az olyan HPLC-rendszer, mely detektorként tömegspektrométert használ, mivel a nagy érzékenysége mellett szerkezeti információt is szolgáltat. A kapilláris elektroforézis a leghatékonyabb elválasztástechnikai módszerek közé tartozik. A cianotoxinok kimutatására alkalmazhatunk még vékonyrétegekromatográfiás módszereket is.

Az általunk vizsgált *Cylindrospermopsis raciborskii* szervezetet először Jáva szigetén izolálták 1912-ben, és tipikusan trópusi cianobaktériumként írták le. Mára azonban mind a trópusi, mind a mediterrán égvövi területeken elterjedt a faj, amit már Európa édesvizeiben is kimutattak. A különböző területeken izolált cianobaktériumok összehasonlítására *rpoC1*, STRR, *nifH*, *cpcBA*-IGS, 16S rRNS, ITS, M13, ERCI és IST1 szekvenciákat használtak. Megállapították, hogy a faj azonosítására az *rpoC1*, 16S rRNS és ITS szekvenciák alkalmasak. Az izolátumok vizsgálata során megfigyelték egyenes és feltekeredett cianobaktérium fonalakat is. A faj növekedéséhez a 20-35 °C hőmérséklet tartomány az optimális.

A cilindrospermopszinon kívül a szervezet más cianotoxinokat is termelhet, ezek lehetnek a cilindrospermopszin származékai (7-epi-cilindrospermopszin, 7-dezoxi-cilindrospermopszin) vagy neurotoxinok (pl. saxitoxin, gonyautoxin). A két cilindrospermopszin származék közül a 7-epi-származék ugyanolyan toxikus mint a cilindrospermopszin, míg a 7-dezoxi-származék nem mérgező. Számos tanulmány utal azonban arra, hogy a *C. raciborskii* szervezet az előbb ismertetetteken kívül más, eddig még nem azonosított toxikus metabolitot is termelhet.

Jelenlegi ismereteink szerint a cilindrospermopszin nevű cianotoxint a *Cylindrospermopsis raciborskii*, az *Aphanizomenon ovalisporum*, az *Aphanizomenon flos-aquae*, a *Raphidiopsis curvata*, a *Lyngbya wollei* és az *Umezakai natans* fajok termelik. A cianotoxinok szintéziséért feltehetően a PKS (poliketid szintáz) valamint az NRPS (nem riboszomális peptid szintáz) fehérjék génszekvenciái felelősek.

A cilindrospermopszin egy 415 Da molekulatömegű, kéntartalmú tricikloguanidino-uracil származék. Szerkezetét NMR és MS technikákkal igazolták. A cilindrospermopszin kimutatására leginkább HPLC-PDA, HPLC-MS, HPLC-MS/MS és CE rendszereket használnak. A cilindrospermopszinról elmondható, hogy jellegzetes, alkaloid típusú cianotoxin tulajdonsága ellenére hepatotoxikus sajátosságokkal bír, ellentétben a már említett

neurotoxikus alkaloid típusú cianotoxinokkal szemben. Egértesztkben 2,1 mg/kg volt az LD<sub>50</sub> értéke 24 óra expozíció után. *In vitro* kísérletek igazolták, hogy gátolja a glutation- illetve fehérjeszintézist, valamint nem kompetitív módon az uridin-monofoszfát szintáz komplexet.

Az általunk vizsgált *C. raciborskii* törzs (BGSD 266) munkatársaink eddigi kutatásai alapján nem termeli a fajra jellemző cianotoxinok közül a cilindropermopszint, bár a növény- és egértesztek alapján toxikusnak bizonyult.

Az másik tanulmányozott cianobaktérium törzs a *Microcystis aeruginosa* volt, mely a vízvirágzásokban leggyakrabban előforduló cianobaktérium, egysejtű, sokezres kolóniát alkotó szervezet. Gram-negatív sejtfalának külső rétege közös kocsonyaburokban tartja össze a sejteket. A szervezet által termelt cianotoxinok a mikrocisztinek, melyek ciklikus heptapeptidek. Az általános aminosavszekvencia a következő: D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha. Az aminosavak között egyaránt vannak D- és L-aminosavak, az X és Z helyeken a cserélhető L-aminosavak találhatók, ez adja ezen cianotoxin-csoport nagymértékű változatosságát. A mikrocisztinek kémiaiilag stabil, hőhatásnak ellenálló molekulák, lebontásukhoz megfelelő enzimrendszer szükséges. A mikrocisztinek közül több specifikusan gátolja a PP1A és PP2A típusú proteínfoszfatáz enzimeket.

A felszíni vizekből izolált cianotoxinok szerkezetvizsgálatán kívül más, biológiaiilag aktív anyagok vizsgálatával is foglalkozni kívántunk, ilyenek például a flavanoidok csoportjába tartozó pterokarpánok. A természet színpompáját nyújtó színezőanyagok csoportjába tartozó flavanoidokra az 1890-es években megkezdett, úttörő jellegű kutatások hívták fel a figyelmet. Flavanoid összefoglaló névvel elsősorban a C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> szénvázat (difetil-propán vázat) tartalmazó anyagokat illetjük, de e vegyületcsoportba soroljuk a C<sub>15</sub>+C alapvázal rendelkező homoizoflavanoidokat és rotenoidokat is. A pterokarpánok a természetben előforduló izoflavanoidok egyik farmakológiaiilag is értékes csoportját alkotják. Számos képviselőjük figyelemre méltó fungicid hatásuk révén a növényi fitoalexinek családjába is sorolható. A pterokarpánok fizikai és kémiai tulajdonságai már részletesen vizsgáltak, de tömegspektrometriai viselkedésükről csak kevés adat lelhető fel az irodalomban. Ezen biológiaiilag aktív anyagok vizsgálatához elengedhetetlen az alapváz részletes tömegspektrometriai vizsgálata, melyet deuterált származékokon kívántunk megoldani.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. Az 1995-ben a Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzs (BGSD 266) laboratóriumi körülmények között történő nevelésének megoldása, a tömegtermelés optimalizálása toxintisztítás céljából.
2. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin, növényi növekedéshibridator izolálása.
3. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin szerkezetének meghatározása.
4. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin hatásának vizsgálata mustár csíranövényeken, gélelektroforézises technikák segítségével.
5. A törzs tápanyagéheztetésének tanulmányozása.
6. A kis-balatoni vízvirágyzásból 2001-ben izolált *Microcystis aeruginosa* törzs (T3) cianotoxinjainak szerkezeti meghatározása.
7. Egy már ismert biológiai aktív vegyületcsoport, a pterokarpánok deuterált alapvázának szintézise tömegspektrometriai vizsgálat céljából.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. A munka során vizsgált cianobaktérium-törzsek izolálása és nevelése**

Kutatómunkánk során a Balatonból 1995-ben izolált *C. raciborskii* és a Kis-Balatonból 2001-ben izolált *M. aeruginosa* törzset vizsgáltuk. Ezen planktonikus szervezeteket a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékének munkatársai azonosították fénymikroszkóp segítségével.

A *C. raciborskii* törzs laboratóriumi neveléshez híg agart (0,1 %) és tápoldatot tartalmazó petricsészét, valamint Erlenmeyer-lombikban (100 ml-es) rázatott tenyészeteket, illetve cumisüvegben (250 ml-es) és Erlenmeyer-lombikban (1 és 5 literes) buborékoltatott tenyészeteket használtunk. A törzs fenntartásához BG-NO<sub>3</sub> illetve Allen tápoldatokat használtunk.

#### **3.2. A *C. raciborskii* tenyészetek növekedésének jellemzése**

A növekedési görbéket 250 ml-es buborékoltatott cumisüvegben A<sub>800</sub>, klorofill-a és fehérjetartalom mérésekkel, illetve száraztömeg méréssel határoztuk meg. A növekedési görbékkel párhuzamosan meghatároztuk a tenyészetek toxicitását is.

#### **3.3. A toxicitás meghatározása fehérmustár növénytesztel (BGST)**

Laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy a mustár csíranövények alkalmasak a cianotoxinok kimutatására; a módszert *Blue-Green Sinapis Test*-nek (BGST) nevezték el. A teszthez *Sinapis alba* L. mustármagokat használtunk. A növekedésgátlást a toxinnal vagy nyers cianobakteriális kivonattal kezelt mustárnövények tengelyszerveinek hosszadataival jellemeztük.

#### **3.4. A toxikus anyagcseretermékek izolálása a cianobaktériumokból**

A cianobakteriális sejtek feltárása fagyasztással-olvasztással történt. A feltárt sejtuszupenziót 4-szeres térfogatú 75%-os metanollal egy éjszakán át extraháltuk, majd az így kapott szuszpenziót centrifugáltuk, a felülúszót pedig bepároltuk. A toxikus anyagcseretermékek tisztítása három, különböző típusú töltetet tartalmazó oszlop

használatával történt: DEAE-52 Whatman ioncserélő, Toyopearl HW-40 molekulaszűrő és szilikagél. Minden kromatográfiás lépés után a kapott frakciókat UV-VIS spektrofotométerrel fotometráltuk 210 és 260 nm-en. A végső tisztításhoz HPLC-t használtunk. A frakciók toxicitását mustár csíranövény teszttel vizsgáltuk. A toxintartalmat vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel is nyomon követtük. A BGST alapján legtoxikusabb komponens képezte a kémiai szerkezetanalízis tárgyát.

### **3.5. Az ismeretlen vegyület NMR-analízise**

Az  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), COSY (Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) és TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) mérések Bruker DRX-500 műszeren készültek 500 ( $^1\text{H}$ ) illetve 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz-en,  $\text{D}_2\text{O}$  illetve  $\text{d}_6$ -DMSO oldószereket használva.

### **3.6. Az ismeretlen vegyület tömegspektrometriás vizsgálata**

A ciantotoxin szerkezetének meghatározásához szükséges tömegspektrometriai mérések az MTA Kémiai Kutatóközpont tömegspektrometriai laboratóriumában készültek ESI-Q-TOF (Waters Q-TOF Premier) illetve ESI-Q<sub>3</sub> (Applied Biosystems API 2000) típusú, valamint a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén működő Brucker Biflex MALDI-TOF készüléken. A pontos tömegméréseket az ESI-Q-TOF készüléken végeztük. A mikrocisztinek azonosítása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén működő FAB készüléken történt.

### **3.7. Az ismeretlen vegyület IR spektrumának felvétele**

Az IR spektrumokat a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékének IR készülékén (Perkin Elmer 16 PC FT-IR) vettük fel, KBr-tablettában.

### **3.8. A mustár csíranövények előzetes vizsgálata a cianobakteriális nyers kivonattal történő kezelés után**

Az előkísérletekhez a kísérleti rendszerünket a következők szerint állítottuk össze: a stacioner fázisban lévő *C. raciborskii* cianobaktérium-tenyészetet centrifugáltuk, majd liofilizáltuk. Az így kapott száraz anyagból törzsoldatot készítettünk. A mustármagokat a nyers kivonatot megfelelő koncentrációban tartalmazó 1%-os agarra helyeztük. A 2. 3. és 4. napos növényeket kvarchomokkal eldörzsöltük és növényi nyers kivonatot készítettünk belőlük. A kivonatkészítés előtt lemértük a növények hosszadatait és nedvestömegüket. A cianobakteriális nyers kivonatot csíranövényekre gyakorolt hatását denaturáló (SDS) és natív (ssDN-áz és proteáz) gélelektroforézises technikákkal vizsgáltuk.

### **3.9. A mustár csíranövények előzetes vizsgálata a tiszta cianotoxinal történő kezelés után**

A mustárnövények tisztított toxinnal történő kezelése során vizsgáltuk a cianotoxinhatás koncentrációfüggését. Az előkísérletek tapasztalatai alapján 200, 400, 600, 800 és 1600 µg/ml-es koncentrációkat használtunk és az ültetéstől számított 3. napon vettünk mintát, hosszadataikat és nedvestömegüket lemértük, majd növényi kivonatot készítettünk belőlük. A tiszta cianotoxin csíranövényekre gyakorolt hatását SDS, és natív (ssDN-áz és proteáz) gélelektroforézises technikákkal vizsgáltuk.

### **3.10. A kén- illetve foszforéheztetett *C. raciborskii* törzs növekedésének, toxintermelésének és fehérjemintázatának vizsgálata**

A BG-NO<sub>3</sub> tápoldatban nevelt *C. raciborskii* tenyészetet centrifugálás után kén- illetve foszformentes tápoldatba oltottuk. Előbbi K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> helyett azonos kálium-ekvivalens KCl-ot, utóbbi MgSO<sub>4</sub> helyett MgCl<sub>2</sub>-ot, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> helyett FeCl<sub>3</sub>-ot tartalmazott. A ZnSO<sub>4</sub>-ot Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, a CuSO<sub>4</sub>-ot CuCl<sub>2</sub> helyettesítette a kénmentes mikroelem-oldatban. A növekedésgörbékhez mintát vettünk, meghatároztuk a tenyészetek klorofill-a, fehérje- és szárazanyag-tartalmát, A<sub>800</sub> értékét és toxicitását. A tenyészet fehérjemintázatát denaturáló (SDS) gélelektroforézissel vizsgáltuk.



### 3.11. Cianotoxinok izolálása *M. aeruginosa* vízvirágzásból (Kis-Balaton)

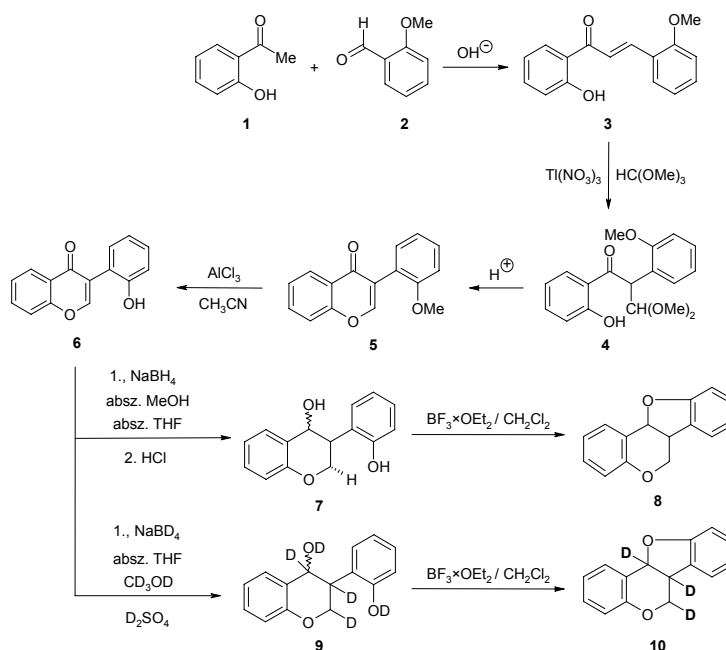
Az összegyűjtött biomasszát feltártuk, metanollal extraháltuk és DEAE-cellulóz oszlopon tisztítottuk. Az egyes frakciókat fotometráltuk és toxicitásukat mustárnövénytesztrel vizsgáltuk. A toxikus frakciókat egyesítettük és Toyopearl (HW-40) molekulaszűrővel töltött oszlopon tisztítottuk tovább. A tisztítás utolsó lépéseként HPLC-s elválasztást alkalmaztunk. A megtisztított toxinokat tömegspektrumuk alapján azonosítottuk.

### 3.12. A pterokarpán és deuterált származékainak előállítása

A pterokarpán (**11a**) szintézisét a könnyen hozzáférhető szalicilaldehid-metiléterből (**1**) és 2-hidroxi-acetofenonból (**2**) kiindulva hat lépéses szintézissel valósítottuk meg. Első lépésben az **1** és **2** vegyületek lúgos kondenzációjával a **3** 2'-hidroxi-kalkont állítottuk elő, melynek tallium(III)-nitrátos oxidatív átrendeződési reakciója a **4**  $\beta$ -keto-aldehid-dimetilacetál származékhoz vezetett. E vegyületből savas kezeléssel jutottunk a Suginome és Iwadare (cit.) által már leírt 2'-metoxi-izoflavonhoz (**5**). A szintézis következő lépésében a metil védőcsoportot alumínium-kloriddal vízmentes acetonitrilben hasítottuk le, a reakció a **6** 2'-hidroxi-izoflavont eredményezte (**1. ábra**).

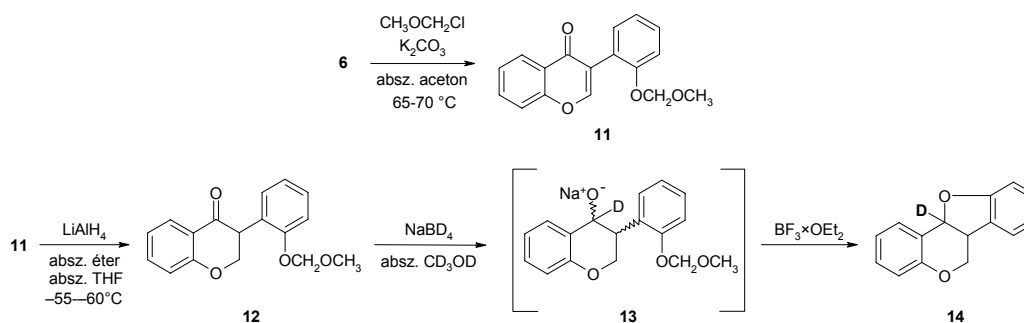
**6** nátrium-borohidrides redukciója a **7** alkohol *cisz-transz* keverékéhez vezetett, melyek gyűrűzárását vízmentes diklórmétánban bórtrifluorid-éteráttal valósítottuk meg, így kaptuk meg a **8** pterokarpánt (**1. ábra**).

A 6,6a,11a-trideutero-pterokarpán (**10**) előállítását a **6**-os izoflavonból kiindulva oldottuk meg. A redukciót deuterio-borohidriddel vízmentes tetrahydrofurán és deuterometanol (CD<sub>3</sub>OD) oldószerek elegyében végezve a **9** *cisz-transz* tetradeutero-izoflaván-4-ol származék keletkezett, melynek bórtrifluorid-éterátos gyűrűzárása a kívánt **10** trideutero-pterokarpánt szolgáltatja (**1. ábra**).



1. ábra

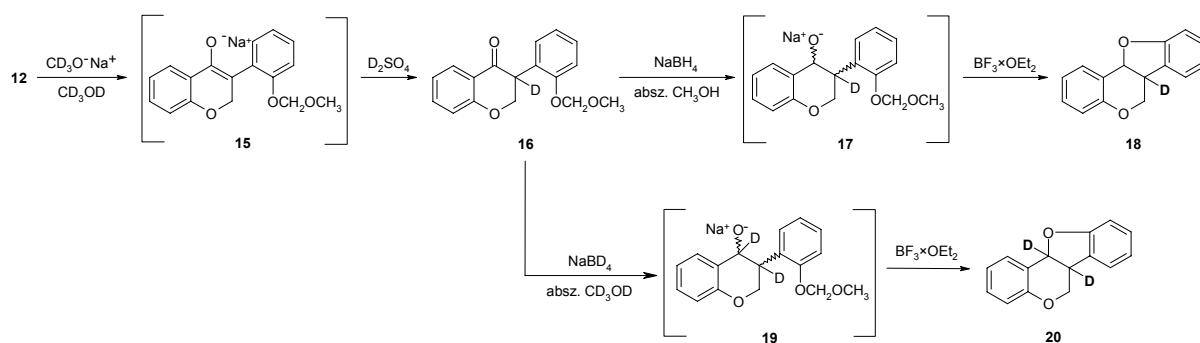
A részlegesen deuterált pterokarpánok szintézisét szintén **6**-ból kiindulva oldottuk meg. A hidroxil-csoport átmeneti védelmére metoximetil-csoportot alkalmaztunk. Az ily módon védett **11** izoflavont lítium-alumínium-hidriddel, alacsony hőmérsékleten a **12** izoflavanonná redukáltuk. **12**-t deuterio-borohidriddel deuterio-metanolban redukálva kaptuk a **13** 4-deuterio-alkoholát *cisz-transz* keverékét, melyet bórtrifluorid-éteráttal kezelve jutottunk a **14** 11a-deuterio-pterokarpánhoz (2. ábra).



2. ábra

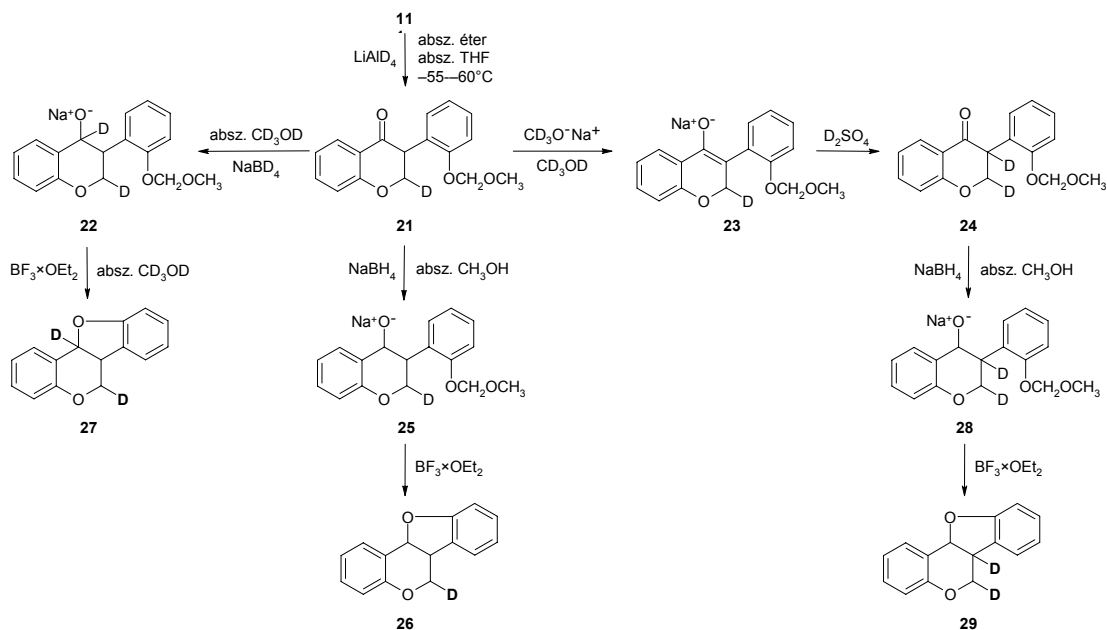
A 6a-deuterio-pterokarpán (**18**) szintézisét a **12**-es 2'-metoximetil-izoflavanonból kiindulva oldottuk meg. A **12** izoflavanon 3-as hidrogénjét deuterio-metanolból készített nátrium-alkohollal, a **15**-ös enolformán át cseréltük ki deutériumra. Az így kapott **16** szokásos módon történő ( $\text{NaBH}_4$ , majd  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) átalakításával jutottunk a **18**-as

célvegyülethez. **16**-ot felhasználva, annak deuterio-borohidrides redukciója, majd  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -os gyűrűzárása szolgáltatta a 6a,11a-dideutero-pterokarpánt (**20**) (3. ábra).



3. ábra

A 6-deutero-pterokarpán (**25**), 6,6a-dideutero-pterokarpán (**26**) és 6,11a-dideutero-pterokarpán (**28**) előállítása **11**-ből történt, mely vegyület kromonygyűrűjének redukcióját deuterio-LAH-hal hajtottuk végre, majd a dihidro-benzo[b]furán szerkezeti rész kialakítását a már előzőleg ismertetett módon végeztem el. Ezen reakciók összefoglalását tartalmazza a 4. ábra.



4. ábra

A vegyületek azonosítása NMR- és tömegspektrumuk alapján történt.

## 4. Eredmények és értékelésük

### 4.1. A *C. raciborskii* cianobaktérium laboratóriumi körülmények közötti nevelése

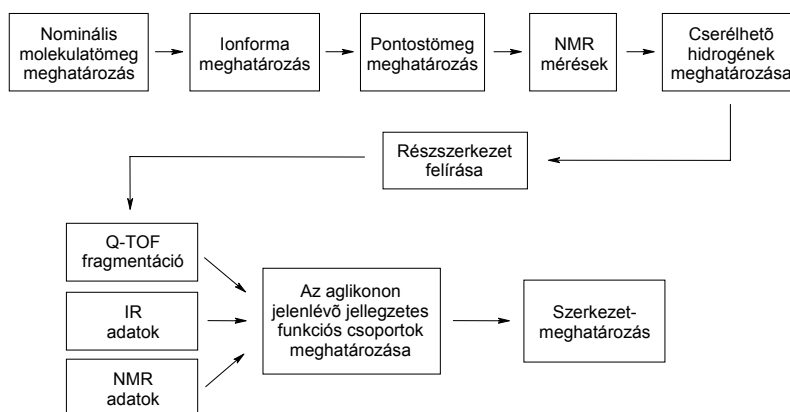
A szervezet növekedését kötött nitrogént tartalmazó táptalajon (Allen+NaNO<sub>3</sub>) és nitrogénköti körülmények között (BG-NaNO<sub>3</sub> nélkül) követtük nyomon. Az A<sub>800</sub>, fehérje és klorofill-a adatok alapján elmondható, hogy a lag fázis 3-4 napig tart, majd 2 hét elteltével a tenyészet átlép a stacioner fázisba. Az előkísérletek azt bizonyították, hogy ha a tenyészetet A<sub>800</sub>=0,2 érték alá oltjuk, úgy olyan kevés sejt van a tenyészetben, hogy nem valósul meg a sejtek önárnyékolása, így nagyon nagy fénysokk éri a tenyészetet, a növekedés nem vagy csak igen lassan indul meg. A nitrátmentes táptalaj – mivel csak a nitrogénkötésre képes szervezetek fejlődését teszi lehetővé – ideális a törzsfenntartásra illetve a izoláláshoz szükséges inokulum elkészítésére. A biomassza előállítására az kötött nitrogént tartalmazó Allen tápoldat alkalmasabb, mivel gyorsabban és nagyobb tömegben szaporodnak benne a cianobaktérium sejtek.

### 4.2. A cianotoxin(ok) izolációja

Munkánk célja a toxikus, növényi növekedést gátló anyag(ok) izolálása volt a *C. raciborskii* szervezetből, amihez kromatográfiás eljárásokat alkalmaztunk. A tisztítás során 40 g biomasszából indultunk ki, melyet az „Anyagok és módszerek” részben leírt módon előkészítettünk. Az így kapott toxikus maradékot DEAE anioncserélő oszlopon tisztítottuk. Az oszlopról eluálódó, növényinhibitor tulajdonságú frakciókat Toyopearl molekulaszűrő oszlopon tisztítottuk tovább. A toxikusnak ítélt frakciók végső tisztítása szemipreparatív HPLC-vel történt. A nyers cianobakteriális kivonat hatékonyabb tisztítását a szerves kémiai szintézis termékek tisztításánál használatos szilikagéles oszlop bevezetésével értük el. Az szilikagéles oszlopon történő tisztításnál a kis polaritású szennyező- és színanyagok a kromatogramm elején jelennek meg, míg a végén elkülönülve található a vizsgálni kívánt cianotoxin komponens. Ez a tisztítási módszer kis mennyiségeknél olyan hatékonynak bizonyult, hogy a toxikus frakciók közvetlenül HPLC rendszerrel tisztíthatóak voltak. Nagyobb mennyiség esetén azonban szükségessé vált a HPLC lépés előtt a toxikus frakciók molekulaszűrős (Toyopearl) tisztítása is. A tisztítási lépéseket vékonyrétegekromatográfiás módszerrel követtük nyomon, de ez nem jelentette a frakciók fotometrálásának és a mustár csíra növénytesztnek, mint toxicitást jelző próbának az elhagyását.

### 4.3. A tisztított, ismeretlen metabolit szerkezetazonosítása

A megtisztított toxikus anyag szerkezetének felderítéséhez a következő módszereket használtuk: NMR-, IR-, UV-spektroszkópia, tömegspektrometria és molekulamodellezés. Az egyes módszerekkel párhuzamosan dolgozva, az **5. ábra** szerinti séma alapján jutottunk el az izolált toxikus metabolit szerkezetéhez.



5. ábra

#### 4.3.1. A nominális molekulatömeg meghatározása

A tisztítás során kapott mintát a MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai laboratóriumban ESI-Q<sub>3</sub> készülékkel megmértük és  $m/z$  436 Da-nál kaptunk jelet. Az addukt típusának eldöntése céljából a minta egy kis részéhez kálium-, illetve lítiumvegyületeket adtunk. Ennek hatására az előző spektrumhoz képest 420 Da-nál ( $M+Li^+$ ) és 452 ( $M+K^+$ ) Da-nál jelentek meg további csúcsok, melyek bizonyítják, hogy a molekulatömeg 413 Da.

#### 4.3.1. A pontos molekulatömeg meghatározása

A pontos tömegméréseket egy ESI-Q-TOF készüléken végeztük pozitív módban, kalibrálással. Az izolált toxikus anyagcseretermék esetén mind a nátrium- mind a protonált adduktnak egymástól függetlenül meghatároztuk a pontos tömegét. Ezek alapján az elemi összetétel a következő:

|                      | Összegképlet           | Mért érték (Da) | Elméleti érték (Da) |
|----------------------|------------------------|-----------------|---------------------|
| Molekulaion + $H^+$  | $C_{16}H_{24}O_8N_5$   | 414,1617        | 414,1625            |
| Molekulaion + $Na^+$ | $C_{16}H_{23}O_8N_5Na$ | 436,1448        | 436,1444            |

Az izolált toxikus metabolit összegképlete tehát a következő:  $C_{16}H_{23}O_8N_5$ .

### 4.3.3. Az alkalmazott NMR módszerek

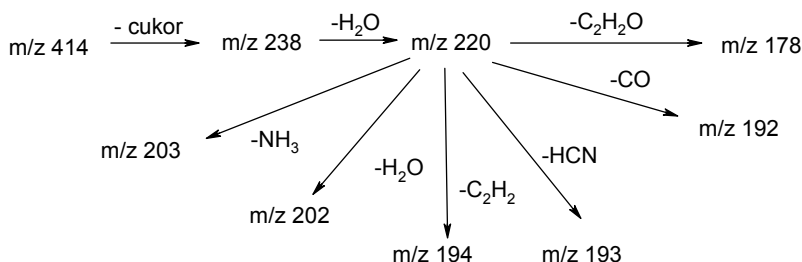
A tömegspektrometriai mérésekkel párhuzamosan NMR méréseket is folytattunk, ezen két mérés technika adta a szerkezetkutatás alapkövét. A csatolási hálót COSY, TOCSY ( $^nJ_{HH}$ ,  $n=2-5$ ) és HSQC ( $^nJ_{CH}$ ,  $n=1$ ) és HMBC ( $^nJ_{CH}$ ,  $n=2-5$ ) kétdimenziós NMR technikákkal térképeztük fel. Elvileg ezek az információk elegendőek lehetnek az ismeretlen molekula konstitúciójának megállapítására. Azonban – amint a vizsgálatok előrehaladtával kiderült – a viszonylag kisszámú hidrogén miatt az egymáshoz közeli (0.16-0.5 nm) protonok térközségének 2D NOESY módszerrel történő megállapítása is elengedhetetlen volt a szerkezeti javaslatához. Az NMR spektrumok felvételét mind nehézvízben ( $D_2O$ ), mind  $d_6$ -DMSO-ban is elvégeztük. A molekulában lévő cserélhető hidrogének ( $-NH-$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ) jelei ugyanis csak a  $d_6$ -DMSO-ban készült felvételekben jelennek meg, mivel  $D_2O$ -ban ezen hidrogének deutériumra cserélődnek.

Az NMR adatok alapján a következő megállapításokat tettük: a molekulában 15 db nem cserélhető hidrogénatom van, a szénatomok közül 10 primer vagy terciér, 6 szekunder vagy kvaterner rendűségű. A HSQC adatok alapján elmondható, hogy 11 szénatomhoz kapcsolódik hidrogén. A HMBC, TOCSY és NOESY spektrumok értékelései valamint a  $^1H$ -NMR csatolási adatok alapján elmondhatjuk, hogy az izolált növényi inhibítor tartalmaz egy 3-*O*-metil-galaktóz molekularészletet. Ez a galaktóz-rész glikozidos hidroxil-csoportján keresztül egy izopropil-csoporthoz kapcsolódik, amely kapcsolatot teremt a molekula eddig még ismeretlen részével. Ezen ismeretlen rész tisztázásához felhasználtuk a hidrogén-deutérium csere, a nagy tömegpontosságú MS/MS fragmentáció, az IR- és az NMR-spektroszkópia adatait. Ezek alapján elmondható, hogy a molekula aglikonrészében öt szénatom található, melyek közül négyhez nem kapcsolódik hidrogén, az ötödiken azonban egy proton található. Ez utóbbi szénatomhoz kapcsolódó hidrogén jele szingulett, tehát vagy heteroatomhoz, vagy olyan szénatomhoz kapcsolódik, melyen nem található hidrogén. Az aglikonban található továbbá öt nitrogénatom és három cserélhető proton. Az összegképletből kiszámolva a molekularészletben lévő kettőskötések és gyűrűk együttes száma 6-nak adódott. A molekularészlet egy hidroxil-csoporton keresztül kapcsolódik vissza a cukoregységhez.

### 4.3.4. Tömegspektrometriai adatok

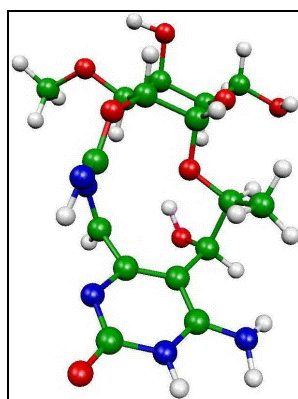
A nagy tömegpontosságú MS adatok alapján elmondható, hogy a protonált molekulaion a cukorrészt semleges molekulaként veszíti el ( $m/z$  238). Az így létrejövő

protonált agikonból vízvesztéssel jön létre az  $m/z$  220-as ion. Ennek az ionnak az MS/MS spektrumában a **6. ábrán** látható jellegzetes ionokat találtuk.



**6. ábra**

Az MS/MS és IR adatok alapján megállapítottuk, hogy a molekula aglikon része hidroxil-, amino- és karbonil-csoportokat (amid formában) tartalmaz. Ezen adatok alapján a **7. ábrán** bemutatott szerkezetet tudtuk felírni.



**7. ábra**

A vegyület kémiai neve:

4-amino-5,10-dihidroxi-9-(hidroximetil)-13-imino-11-metoxi-6-metil-5,6,7a,9,10,11,11a,13-oktahidropirano[2,3-*j*]pirimido[4,5-*e*][1,9,3]dioxazacikloundecin-2(3*H*)-on.

A vegyületnek a *cilindrospermopsziciklin* triviális nevet adtuk.

#### 4.4. Az izolált metabolit biológiai hatásainak előzetes analízise

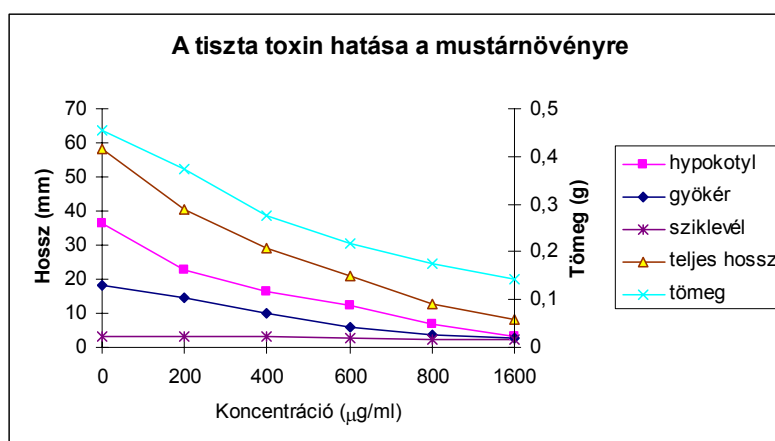
##### 4.4.1. A *C. raciborskii* cianobaktérium nyerskivonatának hatása a mustár csíranövényre

Az izolált toxikus cianobakteriális anyagcseretermék hatásának vizsgálatához mustár csíranövényeket használtunk. Minden tisztított cianotoxinnal végzett kísérlet előtt az

„Anyagok és módszerek” fejezetben már leírt módon előkísérleteket végeztünk a *C. raciborskii* szerkezet nyerskivonatával. Mivel axenikus mustár rendszerben dolgoztunk, a gátlóhatást csak a tápanyagba (agarba) adott nyerskivonat, vagy tiszta toxin okozhatja. A kísérletekhez etiolált növényeket használtunk. Az előcsíráztatott mustármagokat a különböző koncentrációban nyerskivonatot tartalmazó agarra helyeztük és 2, 3 és 4 nap elteltével mintát vettünk. A növényi növekedés gátlás meghatározására, mind a nedvestömeg mind a hosszadatok alkalmaztuk. Az eredmények alapján elmondható, hogy a nyerskivonat egyaránt gátolta a mustárnövény gyökerének és hypokotyljának növekedését a növényeken nem tapasztaltunk morfológiai elváltozásokat. A nyers cianobakteriális kivonat  $IC_{50}$  értéke 800-1600  $\mu\text{g/ml}$  közé esett. A toxicitás mértéke a hosszadatokban jobban megnyilvánul, mint a tömegadatokban. A három vizsgált időpont közül a három napos adatok a leginformatívabbak, így célszerűnek látszik a tiszta toxinos kezelés hatását az ültetéstől számított harmadik napon vizsgálni.

#### 4.4.2. A tisztított cianotoxin hatása a mustárnövényekre

Mivel a nyerskivonattal történt kezelések bebizonyították, hogy a cianotoxin vizsgálatához háromnapos növényeket a legalkalmasabbak ezért a tisztított cianotoxinon hatását 3 napos mustárnövényeknél tanulmányoztuk. A hosszadatok alapján az 50 %-os növekedésgátlás a hypokotyl és a gyökér esetén is 400-600  $\mu\text{g/ml}$ , míg a nedvestömeg esetén 600  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációértéknek adódott. Nem tapasztaltunk az alacsonyabb koncentrációknál növekedésserkentést, illetve magasabb koncentrációknál nekrotikus folt megjelenését. A legnagyobb alkalmazott cianotoxin koncentrációk esetén is elkezdődik a mustárnövény fejlődése, nagyon kevés csíranövény maradt magbázárt állapotban. Nagy cianotoxin koncentrációknál a gyökérnyak megvastagodása figyelhető meg.



8. ábra



#### **4.4.3. A fehérjemintázat változása a *C. raciborskii* nyers kivonatával, valamint a tisztított cianotoxinnal kezelt növényekben**

Mivel a cianotoxin kezelés hatására tapasztalt növekedésgátlás stresszfolyamatokat feltételez, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk izolált toxikus anyagcseretermékkel történő kezelés a mustárnövényekben indukálja-e a fehérjék szintjének változását. A cianobakteriális nyers kivonattal történő kezelés hatására a mustár csíranövényekből gélelektroforézis segítségével két újonnan megjelenő fehérje sáv volt kimutatható (18,9 és 19,5 kDa). A tiszta toxinos kezelés hatására is megjelentek ezek a sávok, de ezenkívül további két sáv (20,1 kDa és 21,7 kDa) megjelenését is tapasztaltuk. Számos sáv intenzitása csökkent a kezelés hatására.

#### **4.4.4. A proteázok gélelektroforézise**

A *natív* proteázaktivitás mérésére 4 % zselatint tartalmazó SDS-poliakrilamid gélt használtunk. Az általunk használt proteázaktivitás-gél a cisztein proteázok kimutatására a legalkalmasabb. A kísérletekhez etiolált körülmények között nevelt 3 napos mustár csíranövényeket használtunk. A proteáz géleket két különböző pH-értéken (savas és lúgos) inkubáltuk. A tiszta toxinos vizsgálat előtt nyers cianobakteriális kivonattal előkísérleteket végeztünk. A kontrollnövényekből 6 proteáz izoenzimet sikerült azonosítani (36,3, 38,6, 59,4, 66,9, 77,0 és 88,0 kDa). Megállapítottuk, hogy a nyerskivonatos kezelés hatására a savas tartományban működő 36,3 és 38,6 kDa-os izoenzimek csökkenése figyelhető. A tiszta toxinos kezelés hatására azonban valamennyi izoenzim aktivitása csökken.

#### **4.4.5. Az izolált cianotoxinnak mustárnövény-nukleázok aktivitására kifejtett hatása**

Tekintettel arra az irodalomban már jól ismert tényre, hogy a növényekben az egyszálú DNS-t bontó enzimek aktivitásának növekedése figyelhető meg stresszkörülmények között, evizsgálni kívántunk, hogy az általunk izolált toxikus metabolit hogyan változtatja meg a mustár csíranövény nukleázainak aktivitását. Vizsgálatainkhoz cianobakteriális nyers kivonatot használtunk, a kontroll növényekből 6 izoenzimet sikerült kimutatni (90, 80, 60, 40, 33 és 25 kDa látszólagos molekulatömegű). Már ekkor megfigyeltük a nukleáz aktivitás csökkenő tendenciáját. Ugyanezt a csökkenő tendenciát tapasztaltuk a tiszta toxinos kezelés hatására is.

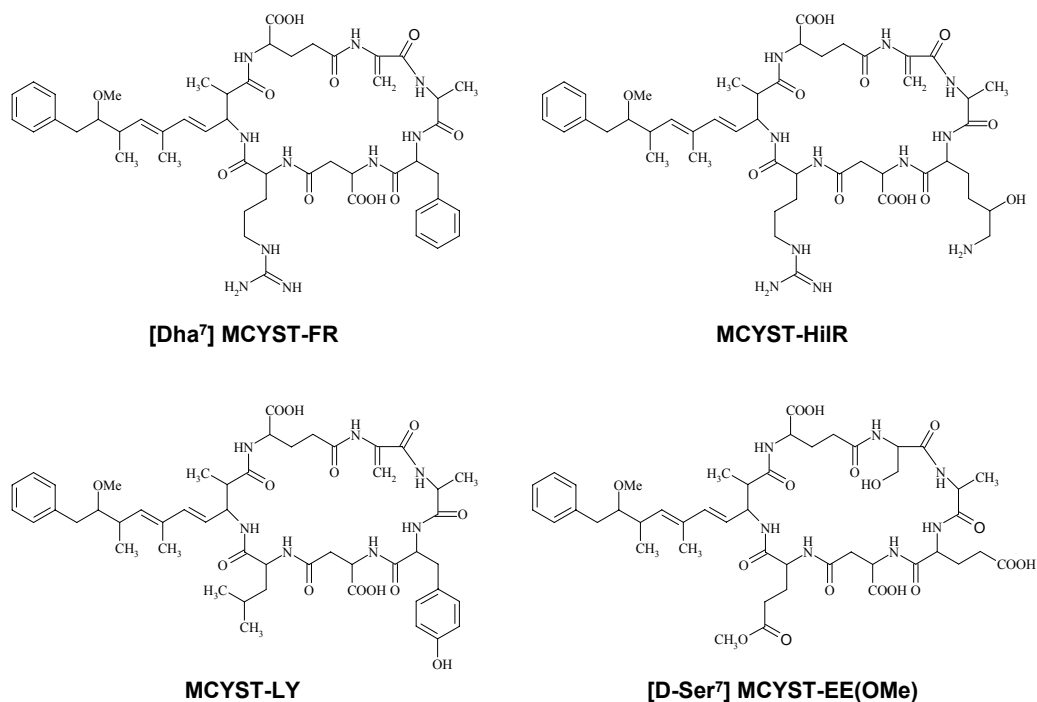
#### **4.5. A foszfor- és kénéheztetés hatása a *C. raciborskii* cianobaktérium növekedésére és toxintermelésére**

Mivel az általunk vizsgált *C. raciborskii* sejtek nem termelik a cilindrospermopszint, kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a szervezet miként reagál tápelemmegvonásra. A kísérletekhez kén-, illetve foszformentes tápoldatokat használtunk. A tenyészetek növekedését a növekedés görbék segítségével, míg toxicitásukat mustárteszttel követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a foszfor-, illetve kénlimitáció hatására a tenyészetek fejlődése nem indul meg, a tapasztalt minimális növekedés a raktározott tápanyagoknak köszönhető. A vékonyrétegkromatográfiás képekből kiderül, hogy jelentősen csökken a termelt toxin mennyisége is. A gélelektroforézises vizsgálatok rámutattak arra, hogy a tápanyagéheztetés új fehérjék megjelenését indukálja.

#### **4.6. A Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztintartalmának meghatározása**

A 2001-es évben a Kis-Balatonban vízvirágzás volt megfigyelhető, amelyből származó planktonmintát szűréssel és/vagy centrifugálással koncentráltuk. Az így nyert üledékből számos mikrocisztin típusú vegyületet izoláltunk. A tisztítás lépései a következők voltak, metanolos extrakció, DEAE cellulózos tisztítás, amelyet egy C-18 Sep-Pack Plus tölteteken való tisztítás követet. A toxikus frakciókat ezután Toyoperl oszoplon tisztítottuk tovább. A tisztítás utolsó lépésében DAD-HPLC-t alkalmaztunk, amely segítségével könnyen felismerhetőek voltak a mikrocisztint tartalmazó frakciók jellegzetes spektrumuk alapján. Az izolált mikrocisztinek szerkezetét MS spektrumuk alapján határoztuk meg. A toxicitási vizsgálatokhoz mustárcsiranövény tesztet használtunk, a mikrocisztintartalmú frakciók elkülönítését az is segítette, hogy a vizsgált koncentrációk esetén is megjelentek a növényeken a mikrocisztinek hatására jellemző nekrotikus foltok.

Az izolált *M. aeruginosa* szervezetből a **9. ábrán** látható mikrocisztineket tudtuk kimutatni.

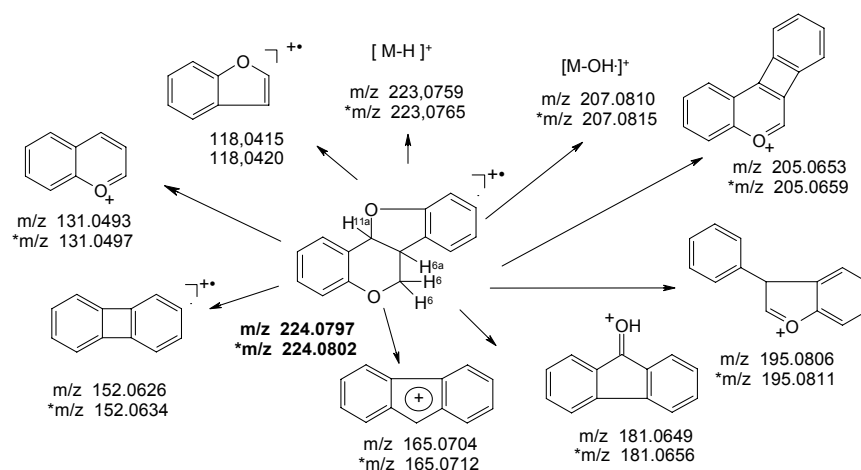


9. ábra

#### 4.7. A pterokarpánok szintézise és tömegspektrometriás vizsgálata

Az „Anyagok és módszerek” részben leírt módon előállítottuk a pterokarpán származékokat, szerkezetüket és deuteráltságukat MNR spektroszkópiai módszerrel igazoltuk.

A preokarpán-váz jellegzetes fragmensionjait, valamint az egyes ionokra kapott nagyfelbontású eredményeket a **10. ábrán** tüntettük fel (csillaggal jelöltük a számított, csillag nélkül a mért értékeket).



10. ábra

A tömegspektrumok alapján megállapítható volt, hogy a pterokarpán nagy intenzitású molekulaiont eredményez, amely minden deuterált származék esetén a spektrum báziscsúcsát adta. A második legnagyobb intenzitású fragmens a  $[M-H^+]$  ion, ami többféleképpen is keletkezhet. Létrejöhet a 6-os hidrogén vagy a 11a helyzetű hidrogén vesztesével, az intenzitásértékekből kitűnik, hogy a 6-os helyzetű hidrogén vesztese a kedvezményezett. Az  $m/z$  207-es fragmens a molekulaionból átalakult enol-formából keletkezik hidroxilgyök vesztesével, míg az  $m/z$  205-ös fragmens víz eliminációt követő hidrogéngyök veszteséssel jön létre. A molekulaionból formaldehidgyök ( $COH^*$ ) vesztes után jön létre az  $m/z$  195-ös ion. Az  $m/z$  181-es ion a molekulaionból etilénoxid vesztesét követő hidrogén gyök veszteséssel jön létre. Az átrendeződött molekulaionból aldehidgyök vesztesét követő átrendeződés után ismételt aldehid molekula veszteséssel jön létre a  $m/z$  165-ös ion. A  $m/z$  152-es ion a molekulaion átrendeződését követően, acetaldehyd vesztesét követő szénmonoxid veszteséssel jön létre. A molekulaionban lévő benzofurán-, illetve kromanongyűrű kötéseinek szimultán hasadásával jön létre  $m/z$  131-es pirillium szerkezet, illetve az  $m/z$  118-as benzofurán gyökkation.

## 5. Összefoglalás

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy sikerült megvalósítani a Balatonból származó *Cylindrospermopsis raciborskii* (BGSD 266) cianobaktérium nevelését laboratóriumi körökben.

A tenyészetből kromatográfiás eljárásokkal sikerült egy új növényi inhibítort izolálni, az általunk bevezetett szilikagélis tisztítás és vékonyrétegekromatográfiás nyomkövetés lényegesen megnövelte az izolálás határfokát. Az izolált új vegyületnek a *cylindrospermopsziciklin* triviális nevet adtuk.

Szerkezetvizsgálati módszerekkel (NMR-, IR- spektroszkópia, MS) sikerült javaslatot tenni az izolált növényi inhibitor szerkezetére.

Mustárnövényvel végzett kísérleteink rámutattak arra, hogy az izolált anyagcseretermék gátolja a mustár növekedését,  $IC_{50}$  értéke 600  $\mu\text{g/ml}$ . A fehérjégelektroforézissel végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy a tisztított cianotoxin hatására új fehérjék jelennek meg. A cianotoxin hatására csökken a mustár ssDN-ázának és savas proteázának aktivitását.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzs tápanyagéheztetése (foszfor- illetve kénmegvonás) a tenyészet növekedésének csökkenését idézi elő. A tápanyagmegvonás hatására csökken az általunk izolált cianotoxin mennyisége, amelyet vékonyrétegekromatográfiás módszerrel határoztunk meg.

A Kis-Balatonból 2001-ben izolált *Microcystis aeruginosa* szervezetből sikerült izolálni négy mikrocisztint ([Dha<sup>7</sup>]MCYST-FR, MCYST-HilR, MCYST-LY és [D-Ser<sup>7</sup>]MCYST-EE(OMe)), melyek szerkezetét tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg.

Sikerült előállítani a pterokarpán hét különböző deuterált analógját, melyek az irodalomban eddig még le nem írt vegyületek.

A pterokarpán deuterált származékainak tömegspektrometriai vizsgálatával a természetes anyag fragmentációs útvonalát sikerült feltérképezni, megállapítottuk, hogy a molekula jellegzetes fragmensei a következők: molekulaion,  $[\text{M}-\text{H}^+]$  ion,  $[\text{M}-\text{OH}]^{+}$  ion, pirillium-kation és benzofurán-gyökkation.

## 6. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Mass spectrometric studies of the pterocarpan skeleton. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 2367-2370. Impakt faktor: 2,184.

**Tóth E., Dinya Z., Szilágyi L., Antus S.** Synthesis of Deuterium Labelled Pterocarpanes. *Heterocyclic Communication* **2001**, 7, 257-262. Impakt faktor: 0,352.

**Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Grigorszky I., Gáspár A., Tóth Sz., Borbély Gy.** Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 259, 303-310. Impakt faktor: 2.057.

**Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., Bácsi I., Borbély Gy.** Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. *Hidrobiológiai közlöny* **2003**, 84, 166-167.

**Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy.** Az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 17-19.

**M-Hamvas M., Hergert T., Vasas G., Máthé Cs., Tóth E., Vígvári T., Bácsi I., Surányi Gy., Borbély Gy.** A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 74-76.

**Vasas G., Gáspár A., Tóth Sz., Bácsi I., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Surányi Gy., Borbély Gy.** Cianobakteriális toxinok (anatoxin-a, cilindrospermopszin, mikrocisztin-LR) együttes analízise kapillár elektroforézissel. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 44-45.

**Tóth E., Batta Gy., Vasas G., Drahos L., Bácsi I., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth Sz., Borbély G.** Cylindropermopsicyclin, a new cyanotoxin from *Cylindropermopsis raciborskii* BGSD 266 (a Hungarian isolate). *J. Am. Chem. Soc.*, Közlésre előkészítve.

**Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:**

**Vígvári T., M-Hamvas M., Máthé Cs., Vasas G., Tóth E., Surányi Gy., Bácsi I., Borbély Gy.** A fenilalanin-ammónia liáz enzim aktivitásának változása mikrocisztin-LR-el (cianotoxin) kezelt regenerált nád növényekben. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 170-171.

**Máthé Cs., M-Hamvas M., Vígvári T., Surányi Gy., Vasas G., Bácsi I., Tóth E., Borbély Gy.** Mikrocisztin-LR-el kezelt, kalluszból regenerált „mini” nádnövények szövettani vizsgálata. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 77-78.

**Előadások és posztterek:**

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. Kossuth Lajos Tudományegyetem Természettudományi Karának Házi Tudományos Diákköri Konferenciája, Debrecen, 1998.04.23-24.

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. XXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, Veszprém, 1999.04.7-9.

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Pterokarpánok tömegspektrometriai vizsgálata. Vegyész-konferencia (MKE), Eger, 1999.06.22-24.

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Synthesis of Deuterated Pterocarpanes and study of their MS properties. 37<sup>th</sup> IUPAC Congress and 27<sup>th</sup> GDCh General Meeting, Berlin, 1999.08.15-19.

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. Eötvös Konferencia, Budapest, 2000.03.25-26.

**Tóth E., Dinya Z., Jekő J., Antus S.** Mass spectrometric rearrangements and fragmentation pathway of pterocarpan derivatives. 15<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, Barcelona, 2000.08.27-09.01.

**Tóth E., Dinya Z., Antus S.** A pterokarpán váz tömegspektrometriai vizsgálata. 44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Baja, 2001.06.25-27.

**Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Borbély G.** Isolation and characterization of cyanotoxins from cyanobacteria of Kis-Balaton Reservoir origin, Hungary 23<sup>rd</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Product, Firenze, 2002. 07.28-08.02.

**Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., Bácsi I., Borbély Gy.** Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

**Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy.** Az Aphanizomenon ovalisporum cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

**M-Hamvas M., Hergert T., Vasas G., Máthé Cs., Tóth E., Vígvári T., Bácsi I., Surányi Gy., Borbély Gy.** A mikrocisztin-LR és a cilindropermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

**Vasas G., Gáspár A., Tóth Sz., Bácsi I., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Surányi Gy., Borbély Gy.** Cianobakteriális toxinok (anatoxin-a, cilindropermopszin, mikrocisztin-LR) együttes analízise kapillár elektroforézissel. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

**Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Pomogyi P., Borbély Gy.** Kis-Balatoni Microcystis fajok cianotoxin tartalmának tömegspektrometriás analízise. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2002.10.02-04.