

Doktori (Phd) értekezés tézisei

Humán és fitoösztrogének analitikai vizsgálata

Montskó Gergely

Témavezető: Dr. Ohmacht Róbert



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs, 2011

Bevezetés

Szexualsteroidok élettana és egészségügyi vonatkozásaik

A szexualsteroidok esszenciális molekulák az élő szervezetek számára, biológiai hatásaikat rendkívül alacsony koncentrációban fejtik ki, így rendkívül kis mennyiségben fordulnak elő. A keringő szexualsteroidok, de főleg az ösztrogének mennyiségének változásai olyan gyakorinak mondható kórképek hátterében állnak, mint például a mell és prosztatatarák, vagy a csontritkulás. A szexualsteroidok analitikai vizsgálatát nehezíti a már említett kis koncentrációjú előfordulás mellett a nagyfokú szerkezeti hasonlóság is. Célszerű megközelítésnek tűnik a tömegspektrometria (MS) alkalmazása, amely azonban a szteroidok kémiai sajátosságai miatt alacsony érzékenységgel valósítható csak meg. Ez az MS vizsgálatot megelőző származékképzési lépésekkel hidalható át. Munkánkkal egy olyan matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI TOF) MS alapú módszer kifejlesztését kíséreltük meg, mely lehetővé teszi több szexualsteroid (tesztoszteron, ösztron, ösztradiol, ösztriol, progeszteron) nagy érzékenységgű, származékképzés nélküli kimutatását.

A fitoösztrogén transz-rezveratrol előfordulása, biológiai jelentősége és fotoizomerizációs reakciója

A fitoösztrogének természetes körülmények között előforduló biológiai aktivitással rendelkező növényi metabolitok, melyek szerkezeti hasonlóságot mutatnak a 17α -ösztradiollal. Ezen kémiaiilag polifenolként leírható vegyületek a növényeket ért stressz faktorok hatására (UV sugárzás, mikrobiális fertőzés) termelődnek főleg az epidermális szövetekben. Jellemző képviselőjük a rezveratrol (3, 4', 5 trihidroxistilbén), melyet első alkalommal szőlőlevélben (*Vitis vinifera*) mutattak ki. Jelentős mennyiségben található meg vörösborokban is, mely környezet kedvező hatással van a polifenolok tápcsatornából történő felszívódására. Előfordulhat szabadon, vagy glikozidként is, ezt az alakot piceidnek nevezzük. A rezveratrol transz-, és cisz- sztereoizomerek alakjában is létezhet, a cisz-rezveratrol glikozidját cisz-piceidnek hívjuk, a reakció UV sugárzás katalízisével történik. A transz-rezveratrol táplálkozástudományi jelentősége annak biológiai aktivitásából fakad, mivel antioxidáns és szabadgyökfogó tulajdonságain felül képes kötődni az ösztrogénhormonok receptoraihoz is. Ennek köszönhetően a többi polifenolhoz hasonlóan a transz-rezveratrol csökkentheti a reaktív gyökök szövetkárosító hatásait, csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának esélyeit, valamint kompenzálhatja az ösztrogénhiányos állapotok (csontritkulás) következményeit is. Mivel a vörösbor a már említett ok miatt kitűnő

forrása a transz-rezveratrolnak érdekes kérdés lehet a magyar borok transz-rezveratrol tartalma is. Fontos lehet továbbá a rezveratrol cisz-/transz- izomerizációs reakciójának alaposabb megismerése is, mivel a reakció során keletkezett termékek számát illetően egymásnak ellentmondó adatok állnak rendelkezésre.

Célkitűzések

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Meg kívántuk határozni, hogy a fitoösztrogéneket képviselő transz-rezvertarol és annak glikozidja, a transz-piceid milyen mennyiségben fordul elő magyar borokban.
2. Kerestük a választ arra, hogy az egyes évjáratokat, pincészeteket és fajtákat, képviselő borokat egymással összehasonlítva, milyen egyezések és eltérések állapíthatók meg.
3. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója csak az ismert cisz-rezvertarol keletkezésével jár-e, vagy esetleg további új komponensek is kimutathatók a reakció eredményeképp.
4. Amennyiben más, további komponensek keletkezése figyelhető meg célul tűztük ki ezek azonosítását is HPLC, MS és MS/MS módszerekkel.
5. Célunk volt továbbá fullerének alkalmazásával egy olyan MALDI TOF tömegspektrometria alapú módszer kifejlesztése, mellyel lehetővé válik a származékképzés nélkül nehezen ionizálható szexuálszteroidok gyors tömegspektrometriás vizsgálata biológiai mintákból.

Anyagok és módszerek

Transz-rezveratrol és transz-piceid standardok

A transz-rezveratrolt (99%) valamint a transz-piceidet a Sigma-tól (Sigma-Aldrich Budapest, Hungary) vásároltuk. Az oldatokhoz, valamint az eluensek készítéséhez használt etanolt a Reanal-tól (Reanal Rt. Budapest, Hungary), a metanolt a Scharlau-tól (HPLC-grade, Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain) szereztük be. Az eluensekhez általunk előállított kétszerdesztillált vizet, a transz-rezveratrol és a transz-piceid vizes oldataiban pedig MilliQ vizet (Millipore Co., MA, USA) használtunk.

Szexualsteroid standardok

A MALDI TOF tömegspektrometriás szteroidmeghatározás beállításához ösztrent, β -ösztradiolt, ösztriolt, progeszteront és tesztoszteront használtunk analitikai standardként (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország). A törzsoldatok készítése során 0.1 mg hormont oldottunk fel 800 μ L metanolban (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spanyolország). Az oldódást követően az oldathoz 200 μ L MilliQ vizet adtunk. A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz a törzsoldatokat 80%-os metanollal hígítottuk.

Fullerén mátrix

A szexualsteroidok MALDI TOF analíziséhez mátrixként C₇₀ és C₆₀ fullerént (Gold grade, Hoechst AG Frankfurt, Németország) alkalmaztunk. Első lépésben telített oldatot készítettünk toluol (Spektrum 3D Kft., Debrecen, Magyarország) felhasználásával. Az oldatot pipettával vittük fel a MALDI plate (MTP 384 target plate, Bruker Daltonics, Bréma, Németország) felületére, ahol a toluol elpárolgását követően egy vékony fullerén kristályfilm képződött.

Borminták

42 különböző bort vizsgáltunk meg a villányi, valamint az egri bortermő régiókból, az évjáratok 2003-tól a 2007-ig terjedtek. A villányi borokat a Bock illetve a Polgár pincészetek biztosították, az egri borokat az Egri Korona Borház. A borokból a HPLC analízist megelőzően 1 ml-t Eppendorf csőben lecentrifugáltuk 10 percig 3000 rpm-en, így eltávolítva az esetlegesen előforduló lebegő részecskéket.

Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója

A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakcióját 14%-os alkoholos oldatban tanulmányoztuk. Az oldat 1 ml –ét UV fényt áteresztő Eppendorf csőben világítottuk meg teljes sötétségben egy Cole Palmer 9815 UV lámpa (Cole Palmer Instrument Co., Vernon Hills, Illinois) segítségével 365 nm hullámhosszon. A további HPLC analízis céljára 200µl térfogatú mintákat vettünk ki a reakcióelegyből 10, 30 és 60 perc, valamint öt óra elteltével.

Igazságügyi csontanyag

A minta-előkészítés során a lágyrész maradványok eltávolítását követően a csontokat PBS pufferrel mostuk le, majd kézzel őröltük 0.2 mm szemcseátmérő eléréséig. A hormonextrakció során 100 mg csontörleményhez 10.00 ml diklórmetánt (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk, majd az elegyet háromszor extraháltuk ultrahangos kádban 15 percen át. Az extraktumokat egyesítettük, bepároltuk, majd a bepárlási maradékot 10 µL acetonitril/víz (9:1) v/v arányú keverékében oldottuk fel.

Vizelet minták

A vizeletmintákat egy, a harmadik trimeszterben lévő 29 éves terhes nőtől vettük le. A mintákat először centrifugáltuk 20 percig 4000 rpm-en 4°C –on, leülepítve a lebegő szennyeződések. A vizelet felülúszóját három alkalommal diklórmetánnal extraháltunk 1:1 arányban. Az extraktumokat egyesítettük, bepároltuk, majd a bepárlási maradékot 10 µL acetonitril/víz (9:1) v/v arányú keverékében oldottuk fel.

Borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának HPLC analízise

A transz-rezveratrol és transz-piceid meghatározáshoz használt HPLC berendezés egy Dionex P680 grádiens pumpát (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), egy héliumos gáztalanító rendszert, és egy Rheodyne 8125 injektort (Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Germany) tartalmazott. A kromatogramok detektálása, valamint az elválasztott komponensek abszorpciós spektrumának meghatározása Dionex 340D UV–Vis diódasoros detektor (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) segítségével történt. A folyadékromatográfias elválasztás 250mm×4.6mm méretű, C₁₈–as (ODS) fordított fázisú HPLC oszlopon történt meg. A mérési paraméterek beállításához, valamint a kromatogramok elemzéséhez a Chromeleon Data Management szoftvert (Version 6.60 SP3 Build 1485, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA)

használtuk. Az elválasztást többlépcsős, bináris grádiens elúció segítségével oldottuk meg. „A” eluensként metanol–víz–ecetsav (10/90/1; v/v/v) arányú keveréke, „B” eluensként pedig metanol–víz–ecetsav (90/10/1; v/v/v) arányú keveréke szolgált 1.5 ml/perc áramlási sebesség mellett. A grádiens összesen 35 perc hosszú kétlépcsős profilú volt, az elválasztást 306 és 286 nm –en detektáltuk.

HPLC-APCI tömegspektrmetria

A HPLC készüléket egy Bruker HCT Esquire (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) tömegspektrométerhez kapcsoltuk egy microsplitter szelep segítségével (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). A tömegspektrometriás ionizációt atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval (APCI) oldottuk meg. A tömegspektrométer, illetve a mérési paraméterek beállításához az Esquire Control Version 5.3 Build 11 (Bruker Daltonics Bréma, Németország) szoftvert használtuk, az adatok kiértékeléséhez pedig a Data Analysis Version 3.3 Build 146 (Bruker Daltonics Bréma, Németország) szoftvert.

MALDI TOF tömegspektrometria

A méréseket egy Autoflex II típusú (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel végeztük. A készülék reflektron detekciós üzemmódban működött pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt. Az ionizációhoz egy MNL-205MC (LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Németország) típusú 337 nm hullámhosszúságú pulzáló nitrogén lézert alkalmaztunk. A méréseket megelőzően külső kalibrációt alkalmaztunk, a kalibrációs pontokat mustársav és 2,5-dihidroxibenzoészav mátrix molekulák csúcsai adták. A minták tömegspektrumait 200 m/z és 500 m/z között vettük fel, valamennyi spektrum 1000 lövés eredményét összesítve készült. A mérési paraméterek beállításához a FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert használtuk, az adatok kiértékeléséhez pedig a Bruker FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert.

Eredmények és megbeszélésük

Magyar borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalma

A jelen munkában 42 különböző magyar bor került feldolgozásra a 2003-2007-es évjáratokból, három pincészetet, és két földrajzi és klimatikus szempontból elkülönült bortermő régiót reprezentálva. A vizsgált borok esetében a transz-rezveratrol tartalom általában a Merlot, a Pinot Noir, a Syrah, valamint a Cabernet Sauvignon fajtákban volt kiemelkedő. Eredményeink alapján a transz-rezveratrol 0,4 mg/l és 10,4 mg/l közötti mennyiségekben fordult elő. Kiemelkedően jelentős mennyiségű transz-rezveratrolt sikerült kimutatni a Bock Cabernet Sauvignon (2006) vörösborban (10,4 mg/l), valamint a Bock Merlot (2006)-ban (7,2 mg/l). A Polgár pincészet borai átlagosan hasonló mennyiségű transz-rezveratrolt tartalmaztak, mint a Bock pincészet borai. A legnagyobb mennyiségű transz-rezveratrolt a Polgár Syrah (2005)-ben sikerült kimutatni, az érték 5,1 mg/l-nek adódott. Az egri borvidékről származó vörösborokban a transz-rezveratrol átlagos koncentrációja alacsonyabb volt, mint a villányi borvidék boraiban, a mennyiségek 0,4 mg/l és 2,5 mg/l közötti értékeket voltak. A legmagasabb koncentrációt 2,5 mg/l-t a 2007-es Egri Kékfrankosban detektáltuk. A vizsgált borok transz-piceid tartalma 0,1 mg/l és 4,4 mg/l közötti érték volt. Kiemelkedően magas transz-piceid koncentrációt találtunk a Bock Kékfrankos (2007) borban (4,4 mg/l) valamint az Egri Kékfrankos (2007) borban (3,7 mg/l). A vizsgálat tartalmazott egy fehér és egy rozé bort is, a Bock pincészettől. A vörösborokkal összehasonlítva, várakozásainknak megfelelően, mind a transz-rezveratrol mind transz-piceid mennyisége alacsonyabbnak adódott a fehér, és rozé bor borkészítési technológiájának megfelelően. A fehérborban a Bock Capella Cuvée (2003) borban ez a mennyiség 0,7 mg/l volt a transz-rezveratrol esetében, míg a transz-piceid esetében az érték 0,1 mg/l-nek adódott. A Bock Rose Cuvée (2007) rozé borban, nagyságrendileg hasonló mennyiséget találtunk, mind a két komponens esetében 0,5mg/l-t.

A legalacsonyabb transz-rezveratrol és transz-piceid mennyiségeket a 2003-as évjáratú borokban találtuk, egy esetben pedig (Bock Cabernet Franc 2003) egyik komponenst sem sikerült detektálnunk. Ennek hátterében a borok érésével és állásával összefüggő oxidatív destrukció állhat. Bizonyos évejáratokban ugyanakkor kiugró polifenol mennyiség mutatható ki borokban. Ez gyakran összefügg a tárgyévben megfigyelt kedvező klimatikus viszonyokkal (meleg száraz időjárás), mely kiemelkedő mennyiségű és minőségű szőlő és bortermést hoz. Ezzel szemben azokban az években, amikor a késő nyári, kora őszi időszakok hűvösnek és csapadékosnak bizonyultak az adott évjáratú borok polifenol tartalma is alacsony volt. Ennek oka a polifenolok UV stresszt gátló tulajdonságaiban keresendő, hiszen szintézisüket többek

között a naps órák magasabb számával járó fokozott UV sugárzás is katalizálja. A csapadékos időjárás továbbá kedvez a szőlőnövények gombás, különösen a *Botrytis cinerea*-val való fertőződésének. A mikrobiális infekció, ugyan szintén fokozza a transz-rezveratrol szintézist, de a szürkerothadás folyamatának előrehaladtával, a *Botrytis cinerea* stilbén oxidáz enzime a transz-rezveratrol destrukciójához vezet.

Az Egri Korona Borház esetében láthatjuk, hogy a hűvösebb és csapadékosabb klímájú egri bortermő régióban alacsonyabb átlagos transz-rezveratrol koncentrációval találkoztunk (1,47 mg/l), azonban a transz-piceid átlagos mennyisége (0,92 mg/l) nem bizonyult egyértelműen alacsonynak, mely azonban egy kiugró értéknek (Egri Blau Burger 2007 3,6 mg/l) köszönhető. Ezt figyelmen kívül hagyva az átlagértéket 0,36 mg/l-nek határozhatjuk meg, ami láthatóan alacsonyabb a villányi borok estében mért értékeknél. Ennek okaként klimatikus tényezőket valószínűsíthetünk mivel Villány Magyarország déli részén található, ahol a klíma az országos átlaghoz viszonyítva meleg, a csapadék mennyisége pedig alacsony. Eger ugyanakkor az Északi-középhegység régiójában található, itt a klíma hűvösebb és csapadékosabb is. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a bortípuson, és a borkészítési technológián kívül a közvetlen és közvetett klimatikus faktorok: is hatással vannak a borok transz-rezveratrol és piceid tartalmára.

Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója

A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciójának nyomon követéséhez egy HPLC-APCI MS, tandem MS (MS/MS) rendszert használtunk. A sötétben tartott törzsoldat analízise során mindössze egy komponenst detektáltunk, mely 21,9 percnél eluálódott. Az abszorpciós spektrum, a retenciós idő, valamint a tömegspektrum (229,2 m/z, $[M+H]^+$) alapján ez a transz-rezveratrol molekulának felelt meg. A tíz perc UV fényel történő besugárzást követően egy második csúcs is megfigyelhetővé vált a kromatogramon 23,2 percnél, ezt a retenciós idő, az abszorpciós spektrum, valamint a tömegspektrum (229,2 m/z) alapján cisz-rezveratrolként azonosítottuk. A cisz-rezveratrolt reprezentáló csúcs mögött továbbá megjelent egy alacsony intenzitású harmadik csúcs is, 23,5 percnél. Ez a komponens nem volt megtalálható a kontroll mintában, így egyértelműen a reakció termékeként azonosítható. Mennyisége 30 és 60 perc besugárzást követően is növekedett. Mivel az ismeretlen komponens mennyiségének növekedése nem járt együtt a cisz-rezveratrol mennyiségének változásával, ugyanakkor a transz-rezveratrol koncentrációja ezzel párhuzamosan folyamatosan csökkent, azt feltételezzük, hogy a kérdéses anyag a transz-rezveratrol molekulából keletkezik. Az ismeretlen komponens abszorpciós spektruma a transz-rezveratroléhoz volt hasonló. Míg a transz-rezveratrol spektrumában azonban két abszorpciós maximum (220 nm, 305 nm)

figyelhető meg, addig az új vegyület sepktrumában egy harmadik abszorpciós maximum (250 nm) is detektálható. Szemben a transz- és a cisz-rezveratrol 229,2 m/z értékével a harmadik komponens 227,2 m/z értéknél detektáltuk, tehát ennek tömege 2 Da-al kevesebb a rezveratrol (228,2 Da) tömegénél.

A transz-rezveratrol fragmentációja során keletkezett, irodalomból is ismert, fragmens ionokat 210,9 m/z, 192,9 m/z, 134,9 m/z, és 119,0 m/z értékeknél figyeltük meg. A 210,9 m/z, és 192,9 m/z értéknél látható fragmensek víz kilépésével és fenolos hidroxilcsoportok eliminációjával keletkeznek. A 134,9 és 119,0 m/z értéknél látható fragmensek a rezveratrol molekula hasadásával keletkeznek, és egy-egy fenolos gyűrűt, valamint egy alkilancot tartalmaznak hármassal kötve. A cisz-rezveratrol fragmentációs mintázata egyezett a fentiekkel. Az új komponens MS/MS analízise során is megfigyeltük a már azonosított fragmenseket, ezek tömege azonban részben eltérő volt. A 134,9 és 119,0 m/z értéknél detektált fragmensek tömege nem változott, a 210,9 m/z és 192,9 m/z értéknél detektáltak viszont 2-2 Da-al kisebbek voltak, mint a rezveratrol esetében.

A besugárzás legegyszerűbb következménye egy destruktív hatás lehet, mely a fenolos gyűrűk felnyílásával jár. Ebben az esetben szembetűnő lenne azonban az abszorpciós spektrum jelentős mértékű megváltozása, amit nem tapasztaltunk. Másik lehetőség, hogy a két hidrogén a fenolos hidroxilcsoportok oxidációja során válik le, azonban az MS/MS vizsgálatok kizárták ennek lehetőségét, mert ebben az esetben nem látnánk az ismeretlen komponens esetében is mind a két vízkilépéssel keletkező fragmenst. A harmadik lehetőség egy fenantrén származék keletkezése, ezt kontroll kísérlettel zártuk ki. Az így előállított termék retenciós ideje és abszorpciós spektruma nem felelt meg az általunk keresett molekulának.

További lehetőség a 2 Da tömegvesztésre a rezveratrol fenolos gyűrűit összekötő alkilancok közötti kötésének oxidációja hármassal kötést eredményezve. Ezt erősíti meg, hogy a centrális alkilancban bekövetkezett töréssel keletkező fragmensek, 119 m/z és 134,9 m/z értéknél (melyek egy-egy hármassal kötést is tartalmaznak) változatlanul voltak jelen mind a transz-, mind a cisz-rezveratrol, mind pedig az új komponens MS/MS spektrumában is. Feltételezve, hogy az azonosítatlan komponens már a fragmentáció folyamata előtt tartalmazta a háromszoros kötetést a struktúra közepén, az eredmények azt igazolják, hogy az új vegyület egy centrális C-C hármassal kötést tartalmaz. A feltételezések bizonyítását quantummechanikai számítások segítségével végeztük el, összehasonlítva a feltételezett struktúra megfigyelt, és számított abszorpciós spektrumát, melynek eredménye jó egyezést mutatott. Az eredmények megbízhatóságát a transz-, a cisz-rezveratrol, valamint a kontrollkísérletben előállított fenantrén származék segítségével ellenőriztük le. Az új komponens 3,4',5-trihidroxi-difenilacetilénként azonosítottuk.

Szexualsteroidok MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálata

A műszeres paraméterek beállítását és a megfelelő mátrix kiválasztását öt, gyakran előforduló szexualsteroid hormon standardjával végeztük el. A férfi hormonok közül a tesztoszteron, a női nemi hormonok közül pedig az ösztron, ösztradiol és ösztriol, illetve a progeszteron standardját használtuk. Munkánk során C_{70} és C_{60} fulleréneket elsőként alkalmaztunk MALDI mátrixként. Az ösztrogének kimutatása negatív ionizációs módban, míg a tesztoszteron és a progeszteron vizsgálata pozitív módban volt eredményes. Ennek hátterét az egyes hormonok funkciós csoportjai alapján határoztuk meg. Az ösztrogének kimutatása azért volt negatív módban sikerebb, mert több hidroxilcsoporttal rendelkeznek, mint ketocsoporttal ahol is könnyebben megvalósulhat a negatív polaritású tömegspektrometriás ionizációt során fellépő deprotonálódás. Mivel a tesztoszteron és a progeszteron több protonálható ketocsoportokkal rendelkezik, ezek esetében a protonálódással járó, pozitív polaritású MALDI ionizáció hatékonyabb. Az ösztrogéneket ennek megfelelően negatív töltésű kvázimolekula ionként, a progeszteront és a tesztoszteront pedig pozitív töltésű kvázimolekula ionként $[M+H]^+$ detektáltuk. A kimutathatósági határ (LOD) megállapítása hígítási sorozatok segítségével történt. A kimutathatóság minimumának azt a mennyiséget vettük, ahol az adott hormon vizsgálatakor kapott jel intenzitása legalább a megfigyelt zajszint háromszorosát adta. A LOD a vizsgált hormonok esetében C_{70} fullerént alkalmazva 39 és 74 pmol között alakult. Az elért legjobb tömegpontosság 5 ppm volt.

A módszer alkalmazhatóságát biológiai mintákon (csontszövet, vizelet) is megvizsgáltuk. Ennek során szilárd/folyadék, illetve folyadék/folyadék extrakciót végeztünk, az extraktumokat bepárlást, majd visszaoldást követően vizsgáltuk. A mintákat párban, pozitív és negatív polaritású ionizációval is lemértük. A vizelet vizsgálata során terhes vizeletből mutattunk ki a terhességre jellemző szexualsteroid markereket. Az ösztrogének közül sikeresen detektáltuk szulfátcsoporttal alkotott konjugátum alakjában az ösztradiolt, mely a termékeny korú nők elsődleges ösztrogénhormonja. A terhes állapotra specifikus hormonok közül pedig a terhes állapot klasszikus indikátoraként számon tartott ösztriolt, valamint a méhnyálkahártya megfelelő állapotát fenntartó progeszteront mutattuk ki. A csontszövet vizsgálata során a szexualsteroidokat a nemi identitás markereiként használtuk fel igazságügyi leletek nemének meghatározása során. Eredményeinket a hagyományos, antropológiai alapú nem meghatározás metodikájával vetettük össze, és erősítettük meg. Az említett két igazságügyi anyag vizsgálata során semmilyen ösztrogén hormont nem sikerült detektálni, a tesztoszteron kvázimolekuláris ionját azonban mindkét esetben kimutattuk. Így a leletek nemét férfiként határoztuk meg, mely megfelelt az igazságügyi orvostani vizsgálat eredményének is.

Összefoglalás

Munkánk első részében magyar borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának meghatározását végeztük el HPLC analízis segítségével. Vizsgálataink során az egri és a villányi bortermő régiót, valamint több (2003-2007) évjáratot hasonlítottunk össze. Az eredményeket az alábbiaknak megfelelően foglalhatjuk össze.

- Megállapítottuk, hogy a magyar vörösborokban, de különösen a villányi régióból származó borokban kiemelkedő mennyiségű transz-rezveratrol található. Ez átlagban 3-3,5 mg/l értéket jelent, míg a nemzetközi adatok alapján ez jellemzően 0,5 és 2,9 mg/l között van.
- A legnagyobb mennyiséget a Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon, és Pinot Noir fajták tartalmazzák.
- A mezőgazdasági szempontból sikeres bortermő években, a borokban általában magas transz-rezveratrol és transz-piceid tartalom jellemző.

Munkánk második részében a transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakcióját tanulmányoztuk HPLC MS és MS/MS módszerekkel.

- Megállapítottuk, hogy a fotoizomerizációs reakció során a cisz-rezvertarol mellett további reakciótermékek keletkeznek.
- Az egyik termék a cisz-rezveratrol ismert fotociklizációs reakciója során keletkező fenantrén származék a 2,5',7-trihidroxi-fenantrén.
- A másik ez idáig ismeretlen komponens a transz-rezveratrolból keletkezett.
- A tömegspektrometriás, valamint a tandem tömegspektrometriás adatok alapján ezt a molekulát egy acetilén származékként (3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén) azonosítottuk.

Kutatásaink harmadik területe szexuáliszteroidok tömegspektrometriás vizsgálata volt.

- Egy új, fullerén mátrixot alkalmazó eljárással sikeresen valósítottuk meg az öt leggyakoribb szexuáliszteroid hormon nagy érzékenységű, származékképzés nélküli MALDI TOF MS kimutatását.
- Munkánk során első alkalommal használtunk fulleréneket MALDI mátrixként.
- Biológiai minták feldolgozása során terhes vizeletből, illetve igazságügyi csontanyagból mutattunk ki ösztrogén, androgén és progesztagén hormonokat.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom Dr. Deli József professzor úrnak, programvezetőmnek, Dr. Ohmacht Róbert professzor úrnak, témavezetőmnek, valamint Dr. Márk Lászlónak. Értékes segítségük és szakmai vezetésük meghatározó volt disszertációm létrejöttében.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből Prof Dr. Sümegei Baláznak, Dr. Lóránd Tamásnak, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézetből Dr. Kovács L. Gábor egyetemi tanár úrnak, hogy hasznos ötleteikkel és tevételes segítségükkel támogatták előrehaladásomat. Köszönettel tartozom továbbá a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának, különös tekintettel Szemmelróthné Mátrai Erika és Molnár Erzsébet laboránsokra, akik nélkül kutatói tevékenységem nem valósulhatott volna meg. Köszönet illeti még közvetlen munkatársaimat is Dr. Takátsy Anikót és Böddi Katalint is támogatásukért, (és nem utolsó sorban azért, mert elviseltek).

Tudományos közlemények jegyzéke

A disszertáció alapját alkotó közlemények

1. Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC–APCI-MS.

Gergely Montsko, Martin S. Pour Nikfardjam, Zoltan Szabo, Katalin Boddi, Tamas Lorand, Robert Ohmacht, Laszlo Mark.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (196) 1: 44-50 (2008) IF:2.36

2. Analysis of nonderivatized steroids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using C70 fullerene as matrix.

Gergely Montsko, Alexandra Vaczy, Erzsebet Mernyak, Eva Frank, Zalan Kadar, Robert Ohmacht, Janos Wolfling, Laszlo Mark.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 395(3): 869-74 (2009) IF: 3.33

3. Trans-resveratrol and trans-piceid content of Hungarian wines.

Gergely Montsko, Robert Ohmacht, Laszlo Mark

Chromatographia 71(1): 121-124 (2010) IF: 1.31

4. Hormone Mass Fingerprinting: Novel possibility for high-throughput molecular sex determination of human skeletal remains by MALDI TOF mass spectrometry.

Gergely Montsko, Gabor Maasz, Zoltan Patonai, Istvan Bajnoczky, Brigitta Osz, Antonia Marcsik, Laszlo Mark
Forensic Science International (In press) IF: 2.01

5. Investigation of phenolic components of Hungarian wines.

Avar Péter.; Pour Nikfardjam Martin; Kunsági-Máté Sándor; **Montskó Gergely**; Szabó Zoltán; Böddi Katalin; Ohmacht Róbert; Márk László

International Journal of Molecular Sciences 8 (10): 1028–1038 (2007) IF: 1.1

Egyéb közlemények

1. Separation of Sesquiterpenes from Yarrow (*Achillea millefolium* L. s. l.) by LC-MS on Non-Porous Columns.

Gergely Montsko, Borbala Boros, Aniko Takatsy, Robert Ohmacht , Sabine Glasl, Liselotte Krenn, Laszlo Mark and Gottfried Reznicek

Chromatographia (67): 467-470 (2008) IF: 1.31

2. Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR spectroscopy.

Gergely Nagy, Tamas Lorand, Zoltan Patonai, **Gergely Montsko**, Istvan Bajnoczky, Antonia Maresik, Laszlo Mark

Forensic Science International (175) 1: 55-60 (2008) IF: 1.86

3. Use of fullerene-, octadecyl-, and triacontyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and in vitro glycated human serum albumin and fibrinogen.

Katalin Böddi, Anikó Takátsy, Szilvia Szabó, Lajos Markó, László Márk, István Wittmann, Róbert Ohmacht, **Gergely Montskó**, Rainer M. Vallant, Thomas Ringer, Rania Bakry, Christian W. Huck, Günther K. Bonn, Zoltán Szabó

Journal of Separation Science 32: 295 – 308 (2009) IF: 2.53

4. 9. Induction of mitochondrial destabilization and necrotic cell death by apolar mitochondria-directed SOD mimetics

Aliz Szabo, Maria Balog, Laszlo Mark, **Gergely Montsko**, Zsuzsanna Turi, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Tamas Kalai, Kalman Hideg, Krisztina Kovacs

Mitochondrion (in press)

IF.: 4.15

Össz. impakt faktor: 19.64

Előadások

1. Mass spectrometric analysis of non-derivatized steroids in biological matrices

Montsko G., Patonai Z., Kovács GL., Márk L.

6th International Medical Postgraduate Conference

Hradec Kralove, Czech Republic, 2009. november 19-21, 89. old.

2. Archeome: Complex biomarker analysis of ancient human remains with MALDI TOF/TOF mass spectrometry

Mark L., **Montsko G.**, Nemeth V., Marcsik A

Second International Symposium on Biomolecular Archaeology

Stockholm, Sweden, 2006. szeptember 7-9, 34. old.

3. Determination of steroid hormones by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry with using fullerene as the matrix

Mark L., Makrai L., **Montsko G.**, Alexandra Vaczy

27th Informal meeting on mass spectrometry

Retz, Austria, 2009. május 3-7, 25. old.

Poszterek

1. *Trans*-resveratrol and *trans*-piceid content of Hungarian wines

Montskó G., Jámbor É., Ohmacht R., Márk L.

15th International Symposium on Separation Sciences- Siófok, Hungary, 2009. szeptember 2-4, 198. old.

2. Bioaktív polifenolok analitikai vizsgálata MALDI TOF tömegspektrometriával

Montskó G., Németh V, Pandur E, Nagy J, Márk L

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006. május 23-26, 60. old.

3. Sztéránvázis hormonok kimutatása humán mintákból MALDI TOF tömegspektrometria alkalmazásával

Montskó G., Németh V., Pandur E., Nagy J., Márk L.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006. augusztus 30- szept 2, 17. old.

Egyéb előadások és poszterek

1. Paleoproteomics: determination of proteins and pathological biomarkers from bone remains, using MALDI TOF/TOF mass spectrometry

Montskó G., Németh V, Pandur E, Nagy J, Patonai Z, Márk L

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006. május 4-6, 112. old.

2. Biokompatibilis fullerén oldatok analitikai és toxicológiai vizsgálata

Montskó G., Vető S., Böddi K., Márk L

37. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2007. május 22-25, 73. old.

3. Ajak és szájpadosadék specifikus fehérjék kimutatása nyálmintákból MALDI TOF/TOF tömegspektrometria segítségével

Montskó G., Tihanyi R., Szabó T. Gy., Szabó Gy., Németh V., Márk L

38. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2008. május 20-23, 87. old.

4. Intracellular regulation of hepcidin expression

Pandur E., Nagy J., Szabó A., **Montskó G.**, Radnai B., Sipos K

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006. május 4-6, 109. old.

5. The function of human RNase L Inhibitor in translation

Nagy J., Pandur E., Szabó A., **Montskó G.**, Bognár Z., Sipos K

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006. május 4-6, 111. old.

6. MALDI TOF/TOF tömegspektrometria alkalmazása a jelátviteli folyamatokban jelentős kis molekulatömegű fehérjék azonosítására

Németh V., **Montskó G.**, Vető S, Bognár E, Márk L

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006. május 23-26, 63. old.

7. A ferroportin egy hepcidin hormon által szabályozott vas transzporter

Nagy J., Pandur E., Szabó A., **Montskó G.**, Bognár Z., Peti M. A., Sipos K

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006. május 23-26, 61. old.

8. A mitokondrium jelentősége a transláció szabályozásában humán sejtekben

Pandur E., Nagy J., Szabó A., **Montskó G.**, Sipos K

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006. május 23-26, 65. old.

9. A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon vizsgálata

Pandur E., Nagy J., **Montskó G.**, Peti M. A., Sipos K.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006. augusztus 30- szept 2, 18. old.

10. Komplex biológiai minták GSH tartalmának meghatározása ioncsapdás tömegspektrometria segítségével

Németh V., **Montskó G.**, Solti I., Vető S., Tucsek Zs., Hocsák E., Márk L.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006. augusztus 30- szept 2, 20. old.

11. Az A-1 antitripszin szerepe a hepcidin éréseben

Pandur E., Nagy J., Poór V. S., **Montskó G.**, Sarnyai Á., Miseta a., Sipos K

39. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2009. május 19-22, 105. old.

12. LC-MS analysis of green tea polyphenols

Éva Jambor, Balázs Marics, Simon Armbruszt, **Gergely Montskó**, László Márk, Róbert Ohmacht

15th International Symposium on Separation Sciences- Siófok, Hungary, 2009. szeptember 2-4, 190. old.