

Szteroid hormonok és más apoláris molekulák tömegspektrometriás analízise

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Avar Péter

Témavezetők: Dr. László Márk és Dr. Pirger Zsolt

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi kémiai Intézet

Pécs

2016

Bevezetés

Szteroidok

A szteroidok a szterol lipidek közé sorolható molekulák. Jellemző rájuk, hogy a közös szerkezeti felépítés, ami a szterán vázon alapul. Az állati sejtekben történő szteroid szintézis a koleszterin képződésével kezdődik. A koleszterinből kiindulva épül fel a többi szteroid. A vázat alkotó szénatomok száma alapján megkülönböztetünk C18 (ösztrogének), C19 (androgének) és C21 szteroidokat. A C21 csoportba a progesztinek, glükokortikoidok és a mineralokortikoidok tartoznak. A szteroidok a glicerofosfolipidekhez és a szfingolipidekhez hasonlóan fontos membránalkotók. Vannak köztük endogen hormonok, illetve szerepet játszhatnak a jelátvitelben. A szteroidok fiziológiás és patológiás koncentrációinak megfigyelése az endokrinológia központi kérdése, de ezek a molekulák környezeti szennyezésként is megfigyelhetők. Funkciójuk szerint a szteroidok lehetnek nemi hormonok, kortikoszteroidok vagy anabólikus hatású szteroidok. Dolgozatomban csak progesztogén hatású anyagokat és ösztrogéneket analizáltam, ezek mind nemi hormonok.

A progesztinek, a természetes progeszteron (PRG) és annak származékai, de bizonyos szintetikus molekulák, mint a levonorgestrel (LNG) vagy a drospirenon (DRO) is rendelkeznek progesztogén hatással. Az egyes molekulák biológiai hatása némileg eltér egymástól. A progesztiniket széles körben használják szintetikus orális fogamzásgátlók komponenseiként (SOCs), hormonpótló terápiában (HRT) és számos nőgyógyászati betegség kezelésében. Irodalmi adatok szerint több mint 100 millió nő szed fogamzásgátlót éves szinten. A szájon át, vaginálisan vagy egyéb módon alkalmazott szerek bejutnak a véráramba kifejtik hatásukat és eközben jelentős hányaduk metabolizálódik is. A metabolitok és a változatlan progesztinek nagy része a veséken keresztüljutva a vizelettel együtt kiürül a szervezetből. Jelentős mértékű a szulfát és glükuronid metabolizáció. A metabolitok jelentős része az anyamolekulához hasonló hatást fejt ki, aktív. Ezen molekulák szennyezésként a háztartásokból a csatornarendszereken keresztül a szennyvíztisztítói telepekre jutnak, ahol a szennyvízkezelés során részben eltávolítják őket a szennyvízből. Lebontásuk, illetve eltávolításuk a szennyvízből nem tökéletes, annak ellenére, hogy a tisztítóüzemekben rendelkezésre állnak megfelelő módszerek. Progesztogén anyagok nemcsak a szennyvíztelepeken keresztül juthatnak az elővízekebe, hanem a papírgyárak termelése által,

illetve mezőgazdasági termelés következtében is Folyamatosan növekszik az arra vontkozó bizonyítékok száma, hogy a környezeti szennyező progesztinek beavatkoznak a vízi élőlények hormonrendszerének működésébe.

Az ösztrogének elsősorban human női nemi hormonként ismertek. Elmondható azonban, hogy ezen molekulák általánosan megtalálhatóak a gerincesekben és szerepet játszanak a hímek hormonrendszerében is. Hozzájárulnak nemcsak a nemi reprodukciós, hanem számos sejt szintű folyamat szabályozásához. A legerősebb hatású, legpotensebb természetes ösztrogén a β -ösztradiol (E2). Az E2 endogen szteroidként termelődik és megtalálható emberi és állati szövetekben és testfolyadékokban is. Leginkább a menopauzális/posztmenopauzális hormonpótló terápiában (HRT) betöltött szerepéről, illetve az életkor előrehaladásával összefüggésbe hozható betegségek kezelésében való alkalmazásáról ismert. Az E2 nemcsak a nők hormonja, hatásaival nemcsak a női nemi traktus szöveteit, hanem más szöveteket is befolyásol, például az agyszövet is egy fontos célpontja. Az emlősökben az ösztrogének, és az androgének is, mint például a tesztoszteron (T), főként az ivarszervekben és a mellékvesében termelődnek. E2 számos szövetben termelődhet keringő prekursorokból (legjelentősebb ilyen prekursor a T), mindkét nemben aromataáz (CYP19) enzimek segítségével. Emberben és rágcsálókban az aromataázok legaktívabban a hypothalamusban termelődnek, de az agyban is megtalálhatóak, az amygdala, a hippocampus, a középagy és az agykéreg területén. Az intenzív human terápiás használat következtében az E2 és az EE2 a két leggyakrabban előforduló környezetet terhelő ösztrogén típusú szteroid hormon. Az Európai Unióban a gyógyszerfelügyeleti folyamatok részét képezi, hogy irányelveket határoznak meg. Ezen irányelvekben más elemek mellett azt is lefektették, hogy az élővizek gyógyszermaradvány szennyezésével kapcsolatosan stratégiai megközelítés kidolgozására van szükség. Az E2 és EE2 2013-ban került az EU megfigyelési listájára (watch list of emerging pollutants) (Directive 2013/39/EU). Méréseinkkel egyidőben, 2015-ben a 2008/105/EC irányelvet követve döntés született arról, hogy ezen anyagok (és a listán régóta szereplő más molekulák) jelenlétét monitorozni kell az Unió területén (Commission Implementing Decision 2015/495). Ezen anyagok analízisének számos módja van. A metodika a vizsgálatok céljától, illetve a rendelkezésre álló instrumentális háttértől erősen függ. A szakirodalomban leírt applikációk gyakran GC-MS-t, LC-MS-t vagy immunoesszéet használnak, de állnak rendelkezésre UV-VIS, fluorescenciás vagy elektrokémiai detektorral kombinált kromatográfiás módszerek is. Az analitikai kémia rohamos fejlődése évekkal ezelőtt lehetővé tette, hogy a környezetet szennyező szteroidokat tömegspektrometriás módszerekkel már literenként néhány ng

jelenléte esetén is mérhessük. Ez igaz mind a progesztinekre, mind az ösztrogénekre, de van egy fontos eltérés a két csoport tömegspektrometriás mérése között. a progesztinek általában –valószínűleg protonált ionok keletkezésének köszönhetően- könnyen ionizálódnak előzetes kémiai módosítások nélkül pozitív ionizációs módban. Ugyanakkor az E2 és az EE2 esetében az ionizáció során könnyebben veszít proton a molekula, így az ionizáció negatív módban sokkal jelentősebb mértékű. A negatív módban végbemenő ionizáció sajnos gyakran, és ezen ösztrogének esetében is viszonylag nagy kimutatási határokkal jár. Általánosan igaz, és az E2 és EE2 esetében is elmondható, hogy az analitikai módszerek érzékenysége ilyen esetben megfelelő funkciós csoport jelenléte esetén javítható a molekula kémiai módosításával. Az E2 és az EE2 analízis előtti derivatizálásával módunk nyílik a molekulák pozitív módban történő detektálására és ezáltal jelentősen megnövelhetjük a mérés érzékenységét is. A környezeti szennyezők tömegspektrometriás monitorozásában gyakran használt módszer, hogy egyszerre sok, 40-100, vagy még több szennyező ionjainak jelenlétét követik full MS vagy targeted MS/MS szkenneléssel derivatizálás nélkül. Jelenleg az ilyen stratégiára épülő módszerekkel az E2 és az EE2 nem, vagy csak magas kimutatási határokkal mérhető. Ugyanakkor többen is publikáltak különböző reakciókat az E2 derivatizálására. Ezek közül én a danzil-kloriddal (DSCI) végzett derivatizálást választottam. Irodalmi adatok alapján van ennél ígéretesebb derivatizálószer (1-metilimidazol-2-szulfonil klorid), és nem a danzil-kloriddal végzett reakció eredményezi a legkisebb kimutatási határt, de azért nagyon alacsony LOD érhető el és a DSCI jóval olcsóbb az említett anyagnál.

Karotinoidok

A karotinoidok erősen apoláris prenol típusú lipidek. Alapvázuk egy 8 izoprénből felépülő lineáris C_{40} molekula. Antioxidáns hatásúak, megtalálhatóak az emberi szervezetben, állatokban, növényi szövetekben is. Néhány karotinoid a zsírban oldódó provitaminok közé tartozik. A legismertebb ilyen a β -karotin. A β -karotin és származékai β -jonon végcsoporttal rendelkeznek és az A-vitamin előanyagaiként fontos elemét képezik az ember illetve általánosan az emlősök étrendjének. Színes karotinok természetes forrásaként számos növény szolgál. A pigmentáció a kromofórnak, a molekulában jelen lévő konjugált kettős kötés rendszernek, köszönhető. A több kettős kötést tartalmazó karotinoidok fényelnyelése nagyobb ezáltal a molekula színe a konjugált kettőskötések számától függ. A karotinoidok két nagy

csoportha oszthatóak: karotinokra and xanthofilokra. A karotinok csak szén és hidrogénatomokból állnak (pl.: α -, β -, γ -karotin, illetve likopin). A xantofilok oxigéntartalmú karotinszármazékok, hidroxil-, keto-, epoxi- és metoxi- csoportokat tartalmazhatnak. Több mint 700 karotinoid fordul elő a természetben, és a különböző növények karotinoid tartalma rendkívül eltérő. Meghatározásukra általában HPLC-UV-VIS vagy HPLC-ECD módszert alkalmaznak C_{18} illetve C_{30} állófázisokkal. Más apoláris lipidekhez hasonlóan a karotinoidok tömegspektrometriás analízisére is leginkább APCI ionforrást használnak, de a lágyabb ionizációt jelenti ESI is bevethető analízisükre.

Célkitűzések

Szteroid mérések

1. Egyszerű, gyors és érzékeny metód kifejlesztése élővíz minták DRO, LNG és a PRG tartalmának meghatározására.
2. Kellően érzékeny és gyors módszerek kifejlesztése az E2 és az EE2 mint környezeti szennyezők mérésére, valamint az E2 endogén mennyiségének vérben és agyszövetben való meghatározására.
3. Az egerek agyában megtalálható endogén E2 normál szintjének felmérése, esetleges regionális eltérések vizsgálata.
4. Az előző pontokban említett szteroidokból adódó környezeti terhelés jelenlegi mértékének megbízható felmérése magyar és külföldi élővizekben.

Karotinoidok szerkezetének azonosítása

5. Mameyből (*Pouteria sapota*) extrahált β -kriptoxantin-epoxidok azonosítása

Mintaelőkészítés

Környezetanalitikai mérések

Folyókból, vízfolyásokból és a Balatonból származó minták gyűjtése

Itthon és Szlovéniában gyűjtöttünk mintákat a Balatonból, hat Kárpát medencei folyóból (Duna, Dráva, Mura, Száva, Tisza és Zala), kisebb vízfolyásokból illetve a Pécs belterületén áthaladó Pécsi-víz nevű csatornából. A mintákat a vízfolyások, illetve a tó vízének felső 30 cm-es rétegből vételeztük, a parttól számított 2 méteren belül. A dolgozatban két különálló vizsgálatot írok le. Az elsőt 2014 júliusában végeztük. Ebben 53 mintavételi ponton vizsgáltuk progesztin szennyezés jelenlétét a Balaton vízgyűjtő területén. A második vizsgálat 2015 júliusában készült. Ennek során 21 mérési ponton vettem mintát és az élővíz ösztrogén szennyezését (E2 és EE2) határoztam meg a Kárpát medence nagy folyóiban. Az első (progesztin) vizsgálatban 770 ml, a másodikban 1000 ml térfogatú élővíz mintákból végeztem analízist. A Pécsi-víz (PV) csatorna esetében 500ml-t használtam fel.

A gyógyszermaradványok vízmintákból való meghatározásához szilárd fázisú extrakciót alkalmaztam Strata C18-E (1g/20 mL) SPE tölteteken. A progesztinek esetében az extraktumot metanolban feloldva analizáltam. Az ösztrogének vizsgálata során a beszárított extraktumhoz derivatizáló anyagot adtam és csak derivatizálás után került sor az analízisre.

Endogén E2 szintjének vizsgálata egér agyszövetben és vérben

Kísérleti állatok

A kísérletekben az egyetemen tartott és szaporított felnőtt nőstény egereket (C57BL6) használtunk. Az állatok 12 óránként váltakozó nappali illetve éjszakai körülmények között éltek és *ad libitum* táplálkozhattak. Minden, az állatokat érintő eljárás elfogadott protokollok alapján az etikai irányelveknek megfelelően zajlott (Pécsi Tudományegyetem; BA02/2000-15024/2011). Normál és ovariectomizált (OVX) állatokat vizsgáltunk. Az ovariectomizáció jelen esetben az petefészkek bilaterális eltávolítását takarja. A beavatkozás során a műtéti anesztéziát izofluránnal váltottuk ki. Az OVX egereket a beavatkozás után két héttel vizsgáltuk. Az állatok feláldozása decapitációval történt. A vérmintákat heparinnal keverve

Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. A regionális koncentrációk vizsgálata során az egeragyakból kimetszett 500 μ vastagságú koronális metszeteket analizáltunk. Ezek számozása az egyessel kezdődik a nazális oldalon és kaudális irányba nő.

Danzil származékok előállítása

Az E2 és az EE2 standardekét és a minták beszárított extraktumait is a következők szerint derivatizáltam: 50 μ L LC-MS minőségű vízben oldott 0.2 mólos nátrium-bikarbonát és 50 μ L acetonban oldott 1 mg/mL koncentrációjú danzil-klorid oldatot adtam minden mintához. Ezen keverékeket 300 rpm sebességgel rázatva 65°C-on inkubáltam 10 percig. Ezután 2 percig jégre helyeztem a mintákat, majd lecentrifugáltam őket és áthelyeztem a felülúszókat a HPLC autosamplerébe illeszkedő mintatartókba, amit 4°C-ra hűtöttem.

HPLC-MS/MS módszerek

DRO, LNG és PRG, mint környezeti szennyezők analízise

Minden mintából 5 μ L-t injektáltam 3 alkalommal a HPLC-MS rendszerbe. A kromatográfiás elválasztás egy Kinetex 2.6 μ C18 100Å HPLC kolonnán (100*2.1 mm) valósult meg, amit 40°C-ra temperáltam. A mozgófázis A (0.01 v/v% hangyasav vízben) és B (0.01% v/v% hangyasav acetonitrilben) komponensekből állt. Az áramlási sebesség 300 μ L/perc volt. A gradiens 35% B-ről indult, amit izokratikusan tartottam 3 percig, majd 9 perc alatt egyenletesen felemeltem 55% B-re, ezt az eredeti összetétel 0,2 perc alatt történő visszaállítása, majd az oszlop 7,8 perces mosása követte.

Az alkalmazott tömegspektrométer fűtött electrospray ionforrással rendelkezett, melyet pozitív módban működtettem. A electrosprayre 4.0 kV feszültséget kapcsoltam. A bevezető kapillárist 300 °C-ra fűtöttem. A probe heatert 50 °C-ra. Az S-lencsék RF értékét 70-re állítottam. A fragmentációhoz az alábbi HCD (Higher-Energy Collisional Induced Dissociation) cella energiákat állítottam be: DRO: 55% , PRG: 45% és LNG: 45%. Az adatok kiértékelését a Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48-as verziójú szoftverével végeztem.

A kiértékelés során megfigyelt ionokat akkor fogadtam el, ha azok m/z hányadosa(i), és azok retenciós ideje a következő határértékek közé esett/estek: DRO - MS1: 367.21-367.24, MS2: 97.06-97.08, retenciós idő: 5.2 ± 0.25 perc; LNG - MS1: 313.20-313.23, MS2: 109.05-109.07 és 245.18-245.20, retenciós idő: 5.7 ± 0.25 perc; PRG - MS1: 315.21-315.24, MS2: 97.06-97.08 és 109.05-109.07, retenciós idő: 9.8 ± 0.25 perc. A kromatográfiás csúcsok csúcs alatti területének integrálásához ICIS algoritmust alkalmaztam a következő beállításokkal: területi zaj faktor: 5.0, csúcs zaj faktor: 10.0 és minimum csúcsintézés 3.0 (S/N).

E2 és EE2, mint környezeti szennyezők analízise

Minden derivatizáción átesett mintából 10 μ l-t injektáltam 3 alkalommal a HPLC-MS rendszerbe. A kromatográfiás elválasztás egy Kinetex 2.6u XB-C18 100Å 150x2.1mm HPLC kolonnán valósult meg, melynek hőmérsékletét a mérés során termosztát segítségével 30°C-on tartottam. A mozgófázis ugyanazon A és B komponensből állt, mint a progesztinek mérésénél. Az áramlás sebességét 400 μ l/percre állítottam. A mozgófázis kezdetben 10% B-t tartalmazott. Ezt izokratikusan tartottam 1 percig, majd 2 lépésben felemeltem először 2 perc alatt 25% , majd további 2 perc alatt 70% B-re. Ezután 10 perc alatt tovább emeltem a B eluens részarányát 75%-ra. Ezt a kezdeti összetétel visszaállítása és az oszlop 15 perces mosása követte. Az E2 kromatográfiás csúcsa 13.09-13.17 percnél eluálódott, az EE2-é 13.66-13.73 percnél. Ionjaik detektálása pozitív ionizációs módban történt. Az elektroprayre 4.0 kV feszültséget kapcsoltam. A bevezető kapillárist 380 °C-ra fűtöttem, a probe heatert pedig 300 °C-ra. Az S-lencsék RF értékét 60-ra állítottam. A fragmentációhoz 50% (E2) és 49% (EE2) HCD (Higher-Energy Collisional Induced Dissociation) cella energiákat állítottam be. Az adatok kiértékelését a Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48-as verziójú szoftverével végeztem. Single ion monitoring analízis során 0,5 Da széles ablakban rögzítettem az E2-nek (506,23-506,25 m/z) és az EE2-nek (530,23-530,25 m/z) megfelelő kromatográfiás csúcsokat. A fragmentációs átmenetek célzott követésekor (tMS2) a következő MS/MS átmeneteket vettem figyelembe 0,4 m/z prekursor izolációs ablakot alkalmazva: 506.24-171.10 (E2) és 530.24-171.10 (EE2).

Endogén E2 szintjének vizsgálata egér agyszövetben és vérben

Minden egyes derivatizált mintából 25 µl-t injektáltam 3 alkalommal. a kromatográfiás elválasztás egy Kinetex EVO 5u C18 100Å HPLC oszlopon (150*2.1mm) történt, amelyet 30°C-ra temperáltam. A mozgófázis a másik két metódnál is leírt A és B eluensekből állt. Az áramlási sebesség 300 µl/perc volt. A mozgófázis kiindulási összetétele 75% B és 25% A eluns volt. Ezt 1 perc izokratikus szakasz után 2 perc alatt 80% B és 20% A-ra változtattam. Ezután a B eluens részarányát 2 perc alatt 99%-ra emeltem, majd ott tartottam azt 5 percig. Ezután a mozgófázis összetételét visszaállítottam a kezdetire és az oszlopot 15 percig mostam. A tömegspektrométert a környezeti ösztrogének vizsgálatánál leírt módon állítottam be. A szövetmintákhoz homogenizálás előtt 50 pg EE2-t adtam, amit a kiértékelés során belső standardként használtam.

Eredmények és megvitatásuk

Szteroid mérések

Környezetanalitikai mérések

A progesztin mérések során 1ng/L alatti kvantifikálási határt sikerült elérni kevesebb mint 1 liter vízminta felhasználásával. A metód során nincs szükség kémiai derivatizálásra így elkerülhető az azzal járó többlet környezetterhelés.

Progesztinek koncentrációi nagy eltéréseket mutattak a Balaton körüli 53 mérési ponton. 23 minta egyáltalán nem tartalmazott kiértékelhető mennyiségű (<LOQ) szennyezést. 21 mérési ponton, vagyis az összes pont alig kevesebb, mint felén mutattunk ki progesztin szennyezést. A 21 mintából 20 esetben detektáltunk PRG-t. LNG-t 6 (No 1, 5, 11, 12, 20, 21), DRO-t 5 helyen (No 1, 5, 11, 19, 21) találtunk. 4 mintában (No 1, 5, 11, 21) mindhárom szteroid jelen volt. A mért koncentrációk ng/l-ben: 0,26-4,30 (DRO), 0,85-3,40 (LNG) és 0,23-13,67 (PRG).

Az E2 és az EE2 derivatizálás nélkül csak magas LOQ értékekkel mérhető. Negatív módú mérésekkel a következő kiértékelési limiteket mértem: E2: 7,5 µg/l LOQ, EE2: 20 ng/l LOQ. Az alkalmazott derivatizálási lépést is tartalmazó metóddal lényegesen javult a

kiértékelhetőség határa: 0,05 ng/l (E2), és 0,001 ng/l (EE2). Ugyanakkor a derivatizálás miatt ez a módszer kevésbé környezetkímélő, mint a progesztineknél alkalmazott módszer. Mindkét ösztrogént előfordult az általam vizsgált élővizekben, de az EE2 jóval kisebb mennyiségben volt kimutatható, mint az E2. A mért koncentrációk nulla és 5,8 ng/l (E2) illetve nulla és 0,7 ng/l (EE2) közé estek. Viszonylag sok EE2-t mértem a Balaton vízgyűjtő területének két pontján, a Zala folyóban (0,7ng/L) és a Hévíz-Páhoki csatornában (0,5ng/L). Az E2 jelenlétét MS/MS átmenettel a 23-ból 12 esetben tudtam megerősíteni. Az EE2 jelenlétét annak alacsonyabb koncentrációja és rosszabb (0,2ng/L) MS/MS kiértékelhetőségi határa miatt MS/MS átmenettel csak 2 minta esetében tudtam megerősíteni (a Hévíz-Páhoki csatornában és a Zala folyóban). 5 minta szűrés utáni analízise alapján ezen szennyezés egy része (17-33% E2 és 0-5% EE2) a lebegő részecskékkel asszociáltan van jelen

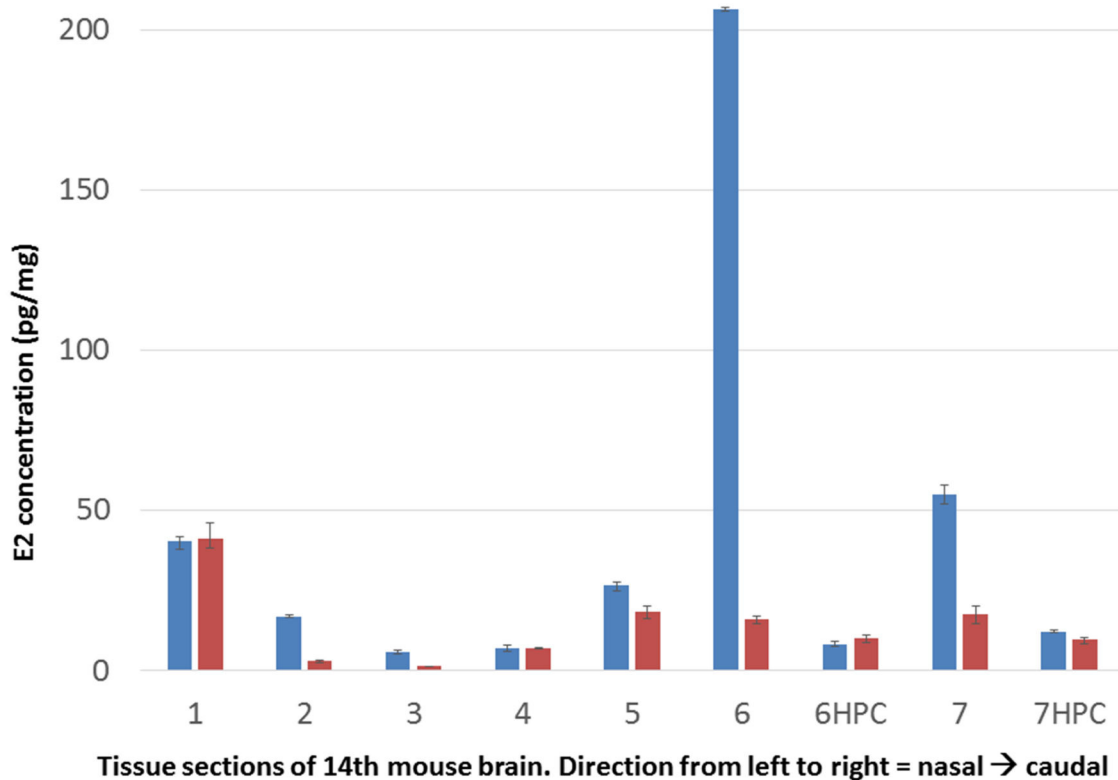
Az ösztrogének intenzív használatának ismeretében nem meglepő, hogy az E2 és EE2 számos élővízben kimérhető mennyiségben van jelen világszerte. 2003 és 2013 között publikált adatok alapján 18-ból 13 vizsgálatban találtak legalább egy mérési helyen 1 ng/l-t meghaladó E2 koncentrációt. 1 ng/l feletti EE2-t 50%-os eséllyel találtak. Az Európai Unió szabályozása 2013-ban helyezte ezen anyagokat megfigyelési listára és 2015-ben döntöttek arról, hogy a jövőbeni monitorozásuk során 0,035 ng/l (EE2) illetve 0,4 ng/l (E2) vagy ezeknél kisebb kimutatási határokkal rendelkező módszereket kell alkalmazni. Az általam leírt danzil-kloridos származékképzés olcsó, gyors és eléggé egyszerű ahhoz, hogy használatát mások is megfontolják ilyen célokra. A nemzetközi adatok tükrében a Kárpát medence folyóiban és a Balatonban mért E2 és EE2 szennyezés mérsékeltnak mondható. Még a két fővárosban mért szintek (3,0 ng/l E2 és 0,1 ng/l EE2 Budapesten és 5,2 ng/l E2 Ljubljanában) is elfogadhatónak tűnnek. Érdekes azonban figyelembe venni, hogy nagyon kevés adat áll rendelkezésre, hogy a koncentrációk a vízhozam csökkenése esetén drasztikusan megemelkedhetnek és hogy a legtöbb toxikológiai vizsgálat időtartama néhány hét vagy hónap, ezért a szennyezés hosszú távú hatásait nehéz feltárni. A jelen vizsgálatban az élővizekben mért alacsony ng/l koncentrációjú E2 és EE2 a teljes ösztrogén szennyezésnek csak egy része (Wise, et al. 2011). A vizsgálatokban megfigyelt alacsony hormonszennyezés önmagában valószínűleg nem jelent akut közegészségügyi problémát, de helyenként befolyásolhatja a vízi élővilágot.

Endogén E2 egéragyban és vérben

A kidolgozott LC-MS metódokat segítségével gyorsan és viszonylag egyszerűen mérhető az E2 vér és agyszövet mintákból. Sikertelt felmérni az E2 endogén szintjeit felnőtt nőstény egerek különböző agyrégióiban, illetve vérében. A vérben mért E2 értékek a hüvelykenetek hisztológiai képe alapján meghatározott menstruációs fázissal jó korrelációt mutattak. Összehasonlítottuk OVX és normal egerek vérének E2 koncentrációját. Az OVX egerekben a beavatkozás után két héttel 1-3 pg/ml azaz a normal értékeknél 10-75-ször kisebb E2 szintet tapasztaltunk.

Metódunkkal az E2 meghatározásához kevesebb mint 5 mg agyszövetre van szükség. Az átlagos egerek agyának tömege megközelítőleg 350-450 mg, ezért módsterünk lehetőséget nyújt az egéragyban az E2 eloszlásának felmérésére. A hormone mennyiségi kimutatásának határa 0.05 pg E2 a kromatográfiás oszlopon, azaz 0.2 pg mintánként. Szöveti koncentrációra átszámolva ez 0.04 pg/mg 5 mg agyszövet esetén. Nagyobb szövetmetszet vizsgálatakor természetesen kisebb, illetve kisebb szövetmetszet esetén nagyobb kimutatási határba ütközhetünk. Hypothalamus, hippocampus és agykéregi szekciókat analizáltunk (n=9, 1.-9.). A következő E2 koncentrációkat figyeltük meg: hypothalamus: 0.20-50 pg/mg, hippocampus: 1.0-155 pg/mg, agykéreg: 0.25-6.2 pg/mg. Az agykéreg esetében a bal és job oldalt külön is vizsgáltuk. A két oldal koncentrációinak aránya 0,5 alá esett 1 esetben, 0,5 és 1,5 közé esett 4 agynál és 1,5-nél nagyobb volt 4 agy esetében.

Koronális metszetekkel segítségével mértük az E2 koncentrációjának alakulását az agy sagitális síkjában előrehaladva (n=5). Az így végzett mérésekből számított átlagkoncentrációk hasonlóak voltak az 1.-9. egéragyban mért értékekhez, de az egyes szekciók között jelentős eltérések mutatkoztak.



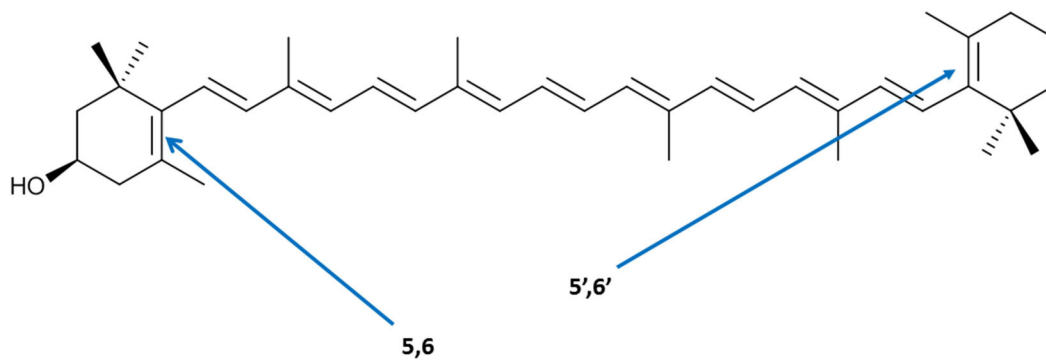
E2 koncentrációk a 14. vizsgált egéragyban. 1-7: kéreg régiók 1-vel jelöltem a nazális oldalon elhelyezkedő szélső metszetet, 7-tel pedig a caudális oldal felőli szélső metszetet. A 6HPC-vel, illetve 7HPC-vel jelölt oszlopok hippocampus régiókra vonatkoznak a 6-os illetve a 7-es metszetből. Az egy-egy számhoz tartozó két oszlop közül a bal oldali mindig a bal félteke, a jobb oldali pedig a jobb félteke adott kérgi szekciójában mért érték.

Az eddig analizált kisszámú minta (n=14 normal egéragy, n=5 normal vérplazma, n=1 OVX vérplazma) nem teszi lehetővé jól megalapozott következtetés levonását, de az adatok felvetették a kérdést, hogy a kérgi területeken és a hippocampusokban analízise során megfigyelt különbségek a bal és a jobboldal között vajon csak a véletlennek köszönhetőek-e. Ennek kiderítésére további vizsgálatokra van szükség és jelentősen emelnünk kell a mintaszámot. A kérdés azért fontos, mert jelenleg a két féltekét sok szempontból egységesnek tekintjük, ami már a kísérletek tervezésében is megjelenik. Az egyes méréseket gyakran a két félteke között osztják fel, például a bal féltekén végeznek immunhisztokémiát és a jobbon végeznek molekuláris kémiai analízist. Viszont ha esetleg E2 szempontjából lateralizációval kell számolni, akkor azt figyelembe kell venni számos jövőbeli vizsgálat tervezésekor, és ez már lezajlott mérések értelmezését is befolyásolhatja.

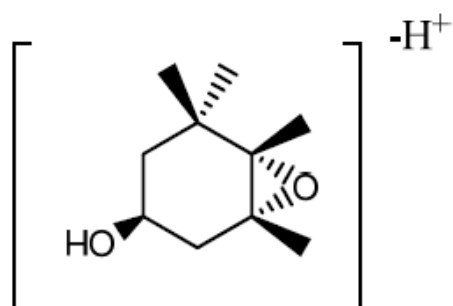
Karotinok szerkezetének azonosítása

Az egyetem karotin munkacsoportja a mamey termésből izolált karotinokból két kromatográfiás frakció analízisét bízta rám. Mindkettőt β -kriptoxantin epoxidként azonosították UV-VIS spektrumaik alapján. A 14,5 percnél gyűjtött komponens fajlagos tömege 568.43 (m/z) volt. Ez a tömeg (m/z) egyezik a β -kriptoxantin monoepoxid. elméleti tömegével. Ezen ion fragmentációja során számos leányion keletkezett még viszonylag alacsony ütközési energiák esetén is. A fragmentációs profil jó egyezést mutatott a β -kriptoxantin fragmentációjának irodalomban fellelhető leírásaival. A következő jellegzetes ionokat figyeltem meg a mérések során: 553.40 ((M-15) vagy β -cryptoxanthin), 488.36 (M-C₆H₈), 476.36 (M-C₇H₈), 461.34(β -cryptoxanthin-C₇H₈), 415.30 (M-153, a hidroxidcsoportot tartalmazó gyűrű elvesztése a protonált molekula 7,8 szén-szén kötésének felnyílásával) valamint sok további iont, melyek a polién lánc különböző helyeken történő felnyílásából adódóan keletkezhetnek.

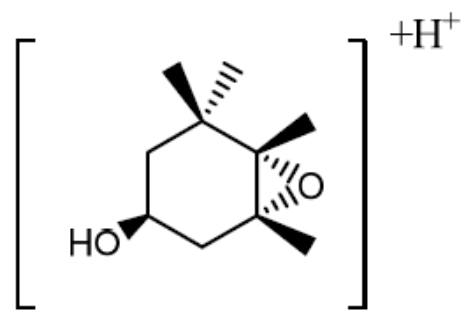
A másik komponens, amit a 17,5 percnél gyűjtött frakció tartalmazott fajlagos tömege szintén 568.43 (m/z) volt. Ennek a fragmentációja a másik komponenséhez igen hasonló profilt eredményezett. Ugyanazon ionok jelentek meg intezíven a spektrumban, bár ezek egymáshoz viszonyított aránya nem teljesen egyezett. Az epoxidáció helyének meghatározása céljából két lehetséges leányion elméleti tömegét határoztam meg. (169.12340 és 171.13769) Ezen ionok mindegyike tartalmazta a hattagú gyűrűt, 4 metilcsoportot egy oxigént epoxid formában, és egy hidroxil csoportot, mivel ezek együttesen csak akkor lehetnek jelen egy leányionban, ha az epoxidáció helye 5,6. Ezután minden rögzített fragmentációs spektrumban lekerestem, hogy jelen van-e a két ion (169.11-169.13 és 171.13-171.15). Mindkét ion jelen volt a 17.5 percnél gyűjtött komponens fragmentációs spektrumaiban, ugyanakkor egyik sem volt megtalálható a másik komponens spektrumaiban.



Az epoxidáció két helyen történhet a β -kriptoxantinban az 5,6 szén-szén kettős kötés helyén vagy az 5',6' szén-szén kettős kötés helyén.



m/z 169.12



m/z 171.14

Az 5,6 és az 5',6' epoxidok megkülönböztetésére használt ionok képletei 169.12 (a bal oldalon) és 171.14 (a job oldalon)

Új eredmények

1. Original, sensitive and fast methods based on SPE and LC-MS have been developed for the determination of the following environmental contaminants: DRO, LNG, PRG, E2 and EE2.
2. A significant steroid hormone contamination including quantitative data was measured in the catchment area of Lake Balaton and in several Central European rivers.
3. A sensitive method has been developed for the determination of E2 from brain tissue, physiological concentrations in the mouse brain have been surveyed.
4. Using MS/MS experiments the identity of 5,6 and 5',6' β -cryptoxanthin-epoxides was successfully confirmed and I could tell them apart.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a PTE-ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében valamint az egyetemen más intézeteiben, illetve a Balatoni Limnológiai Intézetben dolgozó személyeknek, akik segítettek munkámat és ezúton kiemelten megköszönöm az alábbi személyek támogatását:

Prof. Dr. Ábrahám István

Dr. Agócs Attila

Prof. Dr. Deli József

Gulyás Gergely

Prof. Dr. Juvancz Zoltán

Dr. Maász Gábor

Dr. Márk László témavezető

Dr. Pálhalmi János

Dr. Pirger Zsolt témavezető

Schmidt János

Prof. Dr. Sümegi Balázs

Dr. Takátsy Anikó

Turcsi Erika

Közlemények listája

A disszertáció témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Közlemények tudományos folyóiratokban

- **Avar P**, Zrínyi Z, Maász G, Takátsy A, Lovas S, G.-Tóth L, Pirger Z (2016)
β-estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin
Environ Sci Pollut R, DOI: 10.1007/s11356-016-6276-2 IF: 2.828
- **Avar P**, Maász G, Takács P, Lovas S, Zrínyi Z, Svigruha R, Takátsy A, G.-Tóth L,
Pirger Z (2016)
HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples Drug
Testing and Analysis, 8: 123-127. IF: 2.506
- Turcsi E, Murillo E, Kurtán T, Szappanos Á, Illyés TZ, Gulyás-Fekete G, Agócs A,
Avar P, Deli J (2015)
Isolation of Beta-Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3'-
Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*) J Agr Food Chem, 63: 6059-
6065. IF: 2.912

Tudományos előadások

- **Avar P**, Maász G, Takács P, Lovas S, Zrínyi Z, Svigruha R, Takátsy A, G.-Tóth L,
Pirger Zs (2015)
Szteroid szennyezők tömegspektrometriás vizsgálata a Balaton vízgyűjtő területén
XII. Környezetvédelmi analitikai és technológiai konferencia, Balatonszárszó,
Hungary
- Pirger Z, Takács P, Bévárdi N, Svigruha R, Maász G, **Avar P** (2014)
Humán eredetű szteroid terhelés és annak lehetséges élettani hatásai a Balaton és a
Zala vízgyűjtőjén IV. Ökotoxikológiai Konferencia, Budapest, Hungary
- Pápai Z, Maász G, Schmidt J, **Avar P**, Márk L (2014)
Lipidek időbeli és térbeli változásainak feltérképezése a korai embriogenezis során
III. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Hungary

Konferenciákon bemutatott poszterek

- Pálhalmi J, **Avar P**, Ábrahám M. I (2016)
Single molecule imaging of AMPA receptor in live neural network of adult mouse

brain, International Brain Research Organization (IBRO) Workshop, Budapest, Hungary

- **Avar P**, Maász G, Zrínyi Z, Takátsy A, Pirger Z (2015)
Quantitative measurement of 17 β -estradiol and Ethinyl estradiol in some Central-European rivers, European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 16), Turin, Italy
- **Avar P**, Maász G, Takács P, Svigruha R, G.-Tóth L, Pirger Z (2015)
HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples, International Symposium on Separation Sciences (ISSS), Ljubljana, Slovenia

Egyéb közlemények

Közlemények tudományos folyóiratokban

- Antus Cs, Radnai B, Dombóvári P, Fónai F, **Avar P**, Matyus P, Rácz B, Sümegi B, Veres B (2015) Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: Structure and function relationship Eur J Pharmacol, 748: 61-67. IF: 2.532
- Kuzma M, Fodor K, Maász G, **Avar P**, Mózsik G, Past T, Fischer E, Perjési P (2015) A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat. J Pharmaceut Biomed, 103: 59-66. IF: 2.867
- Maász G, Pirger Z, Reglődi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyák A, Hashimoto H, **Avar P**, Jámbor E, Tamás A, Gaszner B, Márk L (2014)
Comparative Protein Composition of the Brains of PACAP-Deficient Mice Using Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis J Mol Neurosci, 54: 310-319. IF: 2.343
- Patonai Z, Maász G, **Avar P**, Schmidt J, Lóránd T, Bajnóczky I, Márk L (2013)
Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes Int J Legal Med, 127: 529-533. IF: 2.597
- Hajdú T, Fóthi E, Kővári I, Merczi M, Molnár A, Maász G, **Avar P**, Marcsik A, Márk L (2012)
Bone tuberculosis in Roman Period Pannonia (western part of Hungary) Mem I Oswaldo Cruz, 107: 1048-1053. IF: 1.363
- **Avar P**, Nikfardjam MPS, Kunsági-Máté S, Montskó G, Szabó Z, Böddi K, Ohmacht R, Márk L (2007)

Investigation of phenolic components of Hungarian wines Int J Mol Sci, 8: 1028-1038.
IF: 0.750

- **Avar P**, Montskó G, Nikfardjam MPS, Ohmacht R, Márk L (2007)
Villányi borok polifenolos komponenseinek analitikai meghatározása Magyar
Epidemiológia 4: 23-27. NO IF
- Nikfardjam MSP, Márk L, **Avar P**, Figler M, Ohmacht R (2006)
Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian
Villány region Food Chem, 98: 453-462. IF: 2.433
- Márk L, Pour Nikfardjam M S, **Avar P**, Ohmacht R (2005)
A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-
piceid in Hungarian wines J Chromatogr Sci, 43: 445-449. IF: 0.930

Tudományos előadások

- **Avar P**, Pápai Z, Kuzma M, Maász G (2014)
Kapszaicin metabolizmusának vizsgálata Orbitrap MS segítségével
16. Labortechnika Kiállítás, Tömegspektrometriai Szakmai nap, Budapest, Hungary
- Zelenyánszki D, Schmidt J, Pápai Z, Maász G, **Avar P**, Márk L (2014)
Tumormarkerek azonosítása MALDI imaging képalkotó technika segítségével
III. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Hungary
- **Avar P**, Pápai Z, Kuzma M, Maász G (2013)
HPLC-MS analysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and their metabolites
12nd Internal Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, Hungary

Konferencián bemutatott poszter

- **Avar P** (2015)
Cell energetics with HPLC-MS
33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, Poland