

mark.laszlo_314_25

**LÉZERES MINTABEVITELRE ÉPÜLŐ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS
MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA BIOAKTÍV
VEGYÜLETEK VIZSGÁLATÁBAN**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

MÁRK LÁSZLÓ



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI ÉS ORVOSI KÉMIAI INTÉZET

PÉCS
2025.

Bajnóczy István barátom emlékének...

„Felfedezni valamit annyit tesz, mint látni, amit mindenki lát, és közben arra gondolni,
amire még senki.”

Szent-Györgyi Albert

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
1.1. Az értekezésben szereplő hivatkozások és betűszavak kezelése	10
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Lézer ablációs tömegspektrometria	11
2.2 Mátrix-segített lézerdeszorpció/ionizáció	13
2.3. Lézeres elpárologtatást alkalmazó képképzési tömegspektrometria	21
3. Célkitűzések	27
4. Alkalmazott készülékek és módszerek	28
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	29
5.1. Kis molekulatömegű vegyületek MALDI vizsgálata	29
5.1.1. Mátrixok hatása	29
5.1.2. Szteroidok vizsgálata	31
5.1.3. Fitoösztrogének, polifenolok, antocianinok vizsgálata	42
5.2. Bioaktív peptidek és fehérjék vizsgálata	59
5.2.1. Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid tömegspektrometriás vizsgálata	59
5.2.2. Fehérje expresszió vizsgálata PACAP-hiányos (PACAP KO) egérmodellben	75
5.2.3. Évszakfüggő neuropeptidok azonosítása hibernáció során	82
5.2.4. Fej-nyaki és szájüregi tumorbiomarkerek MALDI TOF MS vizsgálata	89
5.2.5. Elsődleges csonttumor (oszteosarkóma) MALDI TOF MS vizsgálata	96
5.2.6. Száj- és ajakhasadékgyulladásos gyermekek nyálproteomikai vizsgálata	98
5.3. Lézer ablációra épülő képképzési tömegspektrometria	101
5.3.1. Tumorszövet heterogenitásának vizsgálata	101
5.3.2. Patológias spermatogenezis molekuláris mechanizmusának vizsgálata	115
5.3.3. Embriónális implantáció és embrió-endometrium kommunikáció molekuláris hálózatainak vizsgálata	125
5.3.4. Nagy térbeli felbontású MALDI IMS vizsgálatok neuropeptidok sejtszintű expressziójának detektálására	138
5.3.5. Lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (LAESI) alkalmazása a képképzési tömegspektrometriában	143
6. Legfontosabb eredményeim összefoglalása	153
6.1. Kis molekulatömegű vegyületek MALDI TOF MS vizsgálata	153
6.2. Bioaktív peptidek és proteinek MALDI vizsgálata	155

6.3. Képkalkotási tömegspektrometria	157
7. Kutatási eredmények ipari, klinikai diagnosztikai hasznosítása	160
8. Köszönetnyilvánítás	162
9. Irodalomjegyzék	164
9.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	164
9.1.1. Közlemények referált szakfolyóiratokban	164
9.1.2. Összefoglaló művek	166
9.1.3. Az értekezés témájához kapcsolódó könyvfejezetek	166
9.1.4. Az értekezésben szereplő szabadalmak, mintaoltalmak	167
9.2. Az értekezésben nem, vagy nem részletesen tárgyalt, a témához szorosabban kapcsolódó egyéb saját közlemények	168
9.3. Felhasznált irodalom	170

Rövidítések jegyzéke

9-AA	9-aminoacridine, 9-aminoakridin
AC	adenylate cyclase, adenilát cikláz
APCI	atmospheric pressure chemical ionization, atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
AM	antimesometrial, antimezometriális
ART	assisted reproductive technology, asszisztált reprodukciós technika
ATP	adenosine triphosphate, adenzin trifoszfát
BL6	egértörzs
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adenzin-monofoszfát
Cat	catechin, katekin
CBA F1	egértörzs
CD-1	egértörzs
CF FAB	continuous-flow atom bombardment, folyamatos áramlású gyors atombombázás
CG	cerebral ganglion, agyi idegdúc
CGT	UDP-galactose:ceramide-galactosyltransferase, UDP-galaktóz:ceramid-galaktozil transzferáz
CHAPS	(3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate, 3-[(3-kolamidopropil) dimetilammónium]-1-propánszulfonát
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav
CID	collision-induced dissociation, ütközés-indukált disszociáció
CMC	carboxymethyl-cellulose, karboximetil-cellulóz
c-MET	hepatocyte growth factor receptor, májsejt növekedési faktor receptor
CNS	central nervous system, központi idegrendszer
COC	cumulus-ocyte complex, kumulus-petesejt komplex
CREB	cAMP response element-binding protein, cAMP response element-kötő fehérje
CSPG	chondroitin sulfate proteoglycan, kondroitin szulfát proteoglikán
CT	computer tomography, computer tomográfia
CTAB	cetyl-trimethyl-ammonium bromide, cetil-trimetil-ammónium bromid
Cy	cyanidin
DA	dopamin
DAN	1,5-diaminonaphthalene, 1,5-diaminonaphthalén
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6 diamidino-2-fenilindol
DESI	desorption electrospray ionization, deszorpciós elektroporlasztásos ionizáció
DIOS	desorption/ionization on porous silicon, porózus szilikonon létrejövő deszorpció/ionizáció
DHA	docosahexaenoic acid, dokozahexaénsav
DHAP	dihydroxyacetophenone, dihidroxiacetofenon
DHBA	2,5-dihydroxy-benzoic acid, 2,5-dihidroxi-benzoesavat
Dp	delphinidin
DSG1	desmogle-1, dezoglein-1
DT	drift time, sodródási idő
DTT	dithiothreitol, ditiotreitól
DYNLL1	dynein light chain type1, dyenin könnyűlánc 1
ECS	endocannabinoid system, endokannabinoid rendszer
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermal growth factor receptor, epidermális növekedési faktor receptor
Epicat	epicatechin, epikatekin
ERK	extracellular signal-regulated kinase, extracelluláris szignál-regulált kináz
ESI	electrospray ionization, elektroporlasztásos ionizáció
ETD	electron transfer dissociation, elektrontranszfer disszociáció
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded, formalinfixált paraffinba ágyazott
FITC	fluorescein-isothiocyanate, fluoreszcein-izotiocianát

mark.laszlo_314_25

fsLAESI	femtosecond laser ablation electrospray ionization, femtoszekundumos lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció
fsLDPI	femtosecond laser desorption postionization, femtoszekundumos lézer deszorpció posztionizáció
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy, Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
GABA	gamma-aminobutyric acid, gamma-aminovajsav
GC	gas chromatography, gázkromatográfia
Glu	glucoside, glükózid
GluAc	acetyl-glucoside, acetilglükózid
GluCoum	coumaroil-glucoside, kumaroilglükózid
GPC	glycerophosphatidyl-choline, glicerofoszfátidil-kolin
HGF	hepatocyte growth factor, májsejt növekedési faktor
HESI	heated electrospray ionization, fűtött elektroporlasztásos ionizáció
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid, 5-hidroxi-indol-3-acetát
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma, fej-nyaki laphámsejtes karcinóma
5-HT	5-hydroxy-tryptamine, szerotonin
HPLC	high performance liquid chromatography, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPV	human papillomavirus, humán papillomavírus
H&E	hematoxylin-eosin, hematoxin-eozin
IARC	International Agency for Research on Cancer, Nemzetközi Rákkutató Ügynökség
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee, Intézményi Állathasználati és Állatgondozási Bizottság
ICR	ion cyclotron resonance, ion ciklotron rezonancia
ICSI	intracytoplasmatic sperm injection, intracitoplazmatikus spermiuminjektálás
IEF	isoelectric focusing, izoelektromos fókuszálás
IMS	imaging mass spectrometry, képalkotási tömegspektrometria
IPA	ingenuity pathway analysis,
IR	infrared, infravörös
IR-LAMICI	infrared laser ablation metastable-induced chemical ionization, infravörös lézer ablációs metastabil-indukált kémiai ionizáció
ID	internal diameter, belső átmérő
IL	interleukine, interleukin
ITO	indium-tin oxide, indium-ón oxid
IVF	<i>in-vitro</i> fertilization, mesterséges megtermékenyítés
JNK	C-jun N-terminal kinase, C-jun N-terminális kináz
LA	laser ablation, lézer abláció
LAESI	laser ablation electrospray ionization, lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció
LA-FAPA	laser ablation coupled to flowing atmospheric-pressure afterglow, lézer ablációs áramló atmoszférikus nyomású utólagos besugárzású ionizáció
LC MS	liquid chromatography coupled mass spectrometry, folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
LCPUFA	long chain polyunsaturated fatty acid, hosszú láncú többszörösen telítetlen zsírsav
LDI	laser desorption ionization, lézerdeszorpciós ionizáció
LEMS	laser electrospray mass spectrometry, lézer elektroporlasztásos tömegspektrometria
LFQ	label-free quantification, jelölés nélküli kvantifikáció
LIBS	laser induced breakdown spectrometry, lézer indukált plazma spektrometria
LMWC	low molecular weight compound, kis molekulatömegű vegyület
LOD	limit of detection, kimutatási határ
LPAR3	lysophosphatidic acid receptor 3, lizofoszfátidsav receptor 3
LPC	lysophosphatidyl-choline, lizofoszfátidil-kolin
LPE	lysophosphatidyl-ethanolamine, lizofoszfátidil-etanolamin

mark.laszlo_314_25

LTM	long term memory, hosszútávú memória
LTQ	linear ion trap, lineáris ioncsapda
LYPLA1	lysophospholipid lipase 1, lizofoszfolipid lipáz 1
M	mesometrial, mezometriális
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization, mátrix-segített lézerdeszorpció/ionizáció
MALDESI	matrix-assisted laser desorption electrospray ionization, mátrix-segített lézerdeszorpciós elektroporlasztásos ionizáció
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogén-aktivált protein kináz
MC	mesocerebrum, mezocerebrum
MRI	magnetic resonance imaging, mágneses rezonancia képalkotás
MS	mass spectrometry, tömegspektrometria
MSLDI	matrix suppressed laser desorption/ionization, mátrix elnyomott lézerdeszorpció/ionizáció
Mv	malvidin
MWCO	molecular weight cut-off, molekulatömeg levágás
m/z	mass/charge ratio, tömeg/töltés arány
NALDI	nanoparticle-assisted laser desorption/ionization, nanorészecske-segített lézerdeszorpció/ionizáció
NAPA	silicon nanopost array, szilikon nanooszlop array
NAPE-PLD	N-acylphosphatidyletanolamin phospholipase D, N-acil-foszfatidil-etanolamin-foszfolipáz D
NCL	nucleolin, nukleolin
Nd:YAG	Nd-doped yttrium-aluminium garnet, Nd-adalékolt ittrium-aluminium oxidkristály
NMR	nuclear magnetic resonance, mágneses magrezonancia
OA	oleic acid, olajsav
OD	outer diameter, külső átmérő
PAC1-R	PACAP type 1 receptor, PACAP 1 típusú receptor
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid
PACAP KO	PACAP knock out, PACAP génkiütött
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis, poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	phosphate-buffered saline, foszfátpuffer sóoldat
PC	phosphatidyl-choline, foszfatidil-kolin
PDZ	primary decidual zone, elsődleges deciduális zóna
PE	phosphatidyl-etanolamine, foszfatidil-etanolamin
PE-P	plasmalogene phosphatidyl-etanolamine, plazmalogén foszfatidil-etanolamin
PFA	paraformaldehyde, paraformaldehid
PG	prostaglandin, prosztaglandin
PGI2	prostacyclin, prosztaciklin
PGM	phosphoglycerate mutase, foszfoglicerát-mutáz
PI3K	phosphoinositide 3-kinase, foszfatidilinozitol-3-kináz
PK	pyruvate kinase, piruvát kináz
PKA	protein kinase A, protein kináz A
PL	phospholipid, foszfolipid
Pn	peonidin
PoC	postcerebrum, posztcerebrum
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor, peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
PSD	post source decay, ionforrás utáni fragmentáció
Pt	petunidin
PUFA	polyunsaturated fatty acid, többszörösen telítetlen zsírsav
QTOF	quadrupole time-of-flight, kvadrupól repülési idő analízátor
RIA	radioimmunoassay, radioimmunassay

mark.laszlo_314_25

ROI	region of interest, érdekes régió
SA	sinapinic acid, mustársav
SALDI	surface-assisted laser desorption/ionization, felület-segített lézerdeszorpció/ionizáció
SCOS	sertoli cell only syndrome, „sertoli cell only” szindróma
SDS	sodium dodecyl sulfate, nátrium-dodecil-szulfát
SELDI	surface-enhanced laser desorption/ionization, felület-erősített lézerdeszorpció/ionizáció
SIM	selected ion monitoring, szelektív ionkövetés
SM	shingomyelin, szvingomielin
STAT	signal transducer and activator of transcription, transzkripció szignál transzdukciós és aktiváló fehérje
TAG	triglyceride, triglicerid
TCA	trichloroacetic acid, triklórecetsav
TDPA	3,4',5-trihydroxy-diphenylacetaldehyde, 3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén
TESE	testicular spermium extraction, hereszöveti spermium extrakció
TFA	trifluoroacetic acid, trifluorecetsav
TGFβ3	transforming growth factor beta 3, transzformáló növekedési faktor beta 3
THAP	trihydroxyacetophenone, trihidroxiacetofenon
TMED2	transmembrane emp24 domain-containing protein 2, transzmembrán emp24 domaintartalmazó fehérje 2
TNC	tenascin C, tenaszkin C
TOF	time-of-flight, repülési idő analizátor
UV	ultraviolet (spectrum range), ultraibolya (spektrum tartomány)
VIP	vasoactive intestinal peptide, vazoaktív intesztinális peptid
Vis	visible (spectrum range), látható (spektrum tartomány)
VPAC1	Type 1 VIP/PACAP receptor, 1-es típusú VIP/PACAP receptor
VPAC2	Type 2 VIP/PACAP receptor, 2-es típusú VIP/PACAP receptor
VLCPUFA	very long chain polyunsaturated fatty acid, nagyon hosszú láncú többszörösen telítetlen zsírsav
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

A tömegspektrometria napjaink egyik legáltalánosabban alkalmazott analitikai eljárása, amely alkalmas szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés arányának (m/z) nagyhatékonyságú meghatározására. A tömegspektrometria lényege, hogy a vizsgálandó vegyületek gáz halmazállapotú részecskéiből ionokat állít elő, majd ezeket a relatív tömegük és töltésük hányadosa szerint szétválasztja és detektálja.

A tömegspektrometriás eljárások több mint 100 éve járulnak hozzá a fizikai, kémiai, biológiai és orvosi kutatások rohamos fejlődéséhez. Napjainkban a tömegspektrométerek méretének és árának jelentős csökkenése nagyban elősegíti a módszerek elterjedését, így jelenleg ez az egyik legdinamikusabban fejlődő és legtöbbet alkalmazott analitikai eljárás. Rutinszerűen alkalmazható széles tömeg- és polaritás-tartományban különféle vegyületek tömegének és szerkezetének vizsgálatára. Intenzív a fejlesztés a különböző ionforrások területén is, amelynek eredményeként jött létre a két leggyakrabban alkalmazott mátrix-segített lézerdeszorpció (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI, electrospray ionization) technika. Ezek kifejlesztése alapvető fontosságú volt a modern tömegspektrometria fejlődésében, hiszen segítségükkel lehetőség nyílt nagy molekulatömegű, nem illékony biopolimerek, peptidek, fehérjék, valamint szintetikus makromolekulák szerkezetének komplex tanulmányozására.

Jelen értekezés munkásságom közel két évtizedes lézer ablációs/deszorpció, elsősorban MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálatainak eredményeit foglalja össze, amelynek szinte egészét a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében munkacsoportom, illetve tanszékem által létrehozott tömegspektrometriás laboratóriumban végeztem el.

Egy analitikus munkája során — a változó tudományterületi trendeket követve, illetve az együttműködő partnerek igényeinek fejet hajtva — gyakran kalandozik el a különböző tudományterületek és mintamátrixok között, így nehéz igazán koherens képet mutatni egy ilyen összefoglaló jellegű műben. Ennek ellenére vallom, hogy a tömegspektrometria, főként a lézeres elpárologtatás és ionizáció alkalmazása, valamint a tudományterületen elvégzett módszertani fejlesztések megteremtik a kellően erős kohéziót a különböző minták, vizsgálatok és eredmények között. Vizsgálataim gerincét a lézerdeszorpció (laser desorption ionization, LDI), illetve mátrix-segített lézerdeszorpció ionizációra épülő tömegspektrometria képezi, amely kiegészült lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (laser ablation electrospray ionization, LAESI) és femtoszekundumos lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (femtosecond laser ablation electrospray ionization, fsLAESI) mérésekkel. A biológiai és klinikai minták komplexitása miatt, valamint a kifejlesztett vizsgálati módszerek mindennapi rutin adaptálása érdekében gyakran egészítettem ki a vizsgálatokat más analitikai technikákkal. Több esetben alkalmaztam folyadékkromatográfiát, gélelektroforézist, UV-Vis vagy Raman spektrometriát. A kvantitatív analitikai problémák megválaszolására, illetve molekulaszervezet azonosítására a MALDI méréseket elektroporlasztásos (electrospray ionization, ESI) vagy atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) kapcsolt tandem tömegspektrometriával egészítettem ki.

A lézerimpulzussal történő elpárologtatás és ionizáció képalkotási tömegspektrometriás (imaging mass spectrometry, IMS) vizsgálatait hazánkban elsőként alkalmaztam és

munkacsoportomban számos mintaelőkészítési és technikai fejlesztést hajtottunk végre ezzel a módszerrel kapcsolatban.

Disszertációm, különböző biológiai és klinikai minták (pl. nyál, vizelet, könny, szérum, szeminális plazma, spermium, tej, szöveti biopszia) eltérő felépítésű és tulajdonságú komponenseinek (peptidek, fehérjék, lipidek, polifenolok, endokrin metabolitok) tömegspektrometriás vizsgálatára kifejlesztett új módszereket és a vizsgálatok eredményeit mutatja be. Értekezésem gerincét 25 olyan közlemény alkotja, amelyek jól bemutatják a PhD fokozat megszerzése utáni tudományos munkám főbb irányait. Ezt egészíti ki a disszertációban részletesen tárgyalt témákhoz közvetlenül kapcsolódó 2 összefoglaló munka, 5 könyvfejezet és 8 szabadalom/oltalom. Mindezeket túl további 22 saját közlemény kapcsolódik a feldolgozott tömegspektrometriás témához, alkalmazva a kifejlesztett lézer ablációs módszereinket vagy kiegészítve azok eredményeit. Az értekezés során végig többes szám első személyben tárgyalom az eredményeket ezzel is hangsúlyozva, hogy azokat munkacsoportom egykori és jelenlegi tagjaival, valamint kollaborációs partnereinkkel közösen értük el. A közlemények társszerzői nagy segítségemre voltak az egyes kutatások tervezésében, kivitelezésében, az eredmények értelmezésében, illetve a közlemények megírásában, az ábrák elkészítésében. Vizsgálataim egy-egy jól meghatározott biológiai vagy klinikai probléma (pl. neuropeptidok detektálása, tumordiagnosztika, korai embrionális fejlődés, spermatogenezis) megoldása köré csoportosultak, így az értekezés leíró részében, az egyes fejezetek elején röviden ismertetem az adott kutatási téma irodalmi hátterét.

Analitikai eredményeim talán legjelentősebb hatása azok ipari és rutin diagnosztikai hasznosításában rejlik, amelyeket dolgozatom végén foglalok össze. Munkám során végig törekedtem a tényleges innovációtranszferrel hasznosítható célok kitűzésére, valamint az alap- és alkalmazott kutatások eredményeinek ipari adaptálására. Ennek eredményességét legjobban az elmúlt 20 év sikeres ipari együttműködései, elnyert pályázatai fémjelzik.

1.1. Az értekezésben szereplő hivatkozások és betűszavak kezelése

A doktori disszertációmban szereplő irodalmi forrásokat az előfordulás sorrendjében szögletes zárójelben említtem, míg a dolgozat alapját képző saját közleményeimre az adott fejezetekben római számmal hivatkozok, amelyeket a megjelenésük kronológiai sorrendjében tüntetek fel.

A szövegben a tudományterület sajátosságainak köszönhetően nagyszámú rövidítést, betűszót használok. Ezek jelentését igyekeztem azok első előfordulásának helyén a szövegben megadni, azonban a könnyebb áttekinthetőség érdekében a dolgozat elején megtalálható a leggyakrabban alkalmazott rövidítések jegyzéke.

2. Irodalmi áttekintés

Az 1960-as években a nagyenergiájú lézerforrások megjelenése után világszerte intenzívvé vált a foton-anyag kölcsönhatások és a lézer ablációs/deszorpciós folyamatok vizsgálata. A multidiszciplinális kutatások kiterjedtek a fizikai és kémiai folyamatok leírására, modellezésére és a lehetséges applikációk optimalizálására. Hazánkban több munkacsoport ért el nemzetközileg meghatározó eredményeket a nano- és femtoszekundumos lézerimpulzusokkal kiváltott elemanalitikai alkalmazásokkal (pl. LIBS, LA-ICP-MS) kapcsolatban, míg a bioaktív makromolekulák (pl. fehérjék, peptidek) analizésére alkalmas módszerek (MALDI) mechanizmusának értelmezésére valamennyivel kisebb figyelem irányult [1, 2].

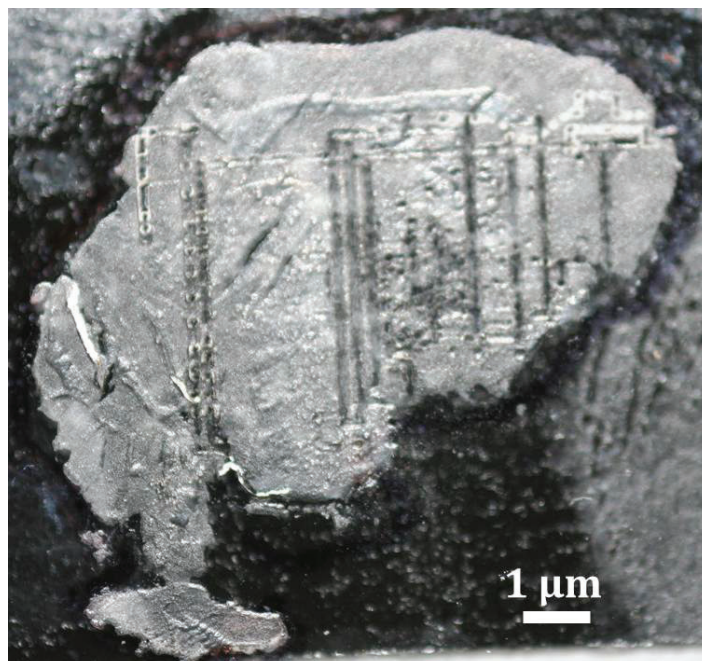
Az alábbi alfejezetekben az abláció/deszorpció fizikai, fizikai-kémiai mechanizmusainak mélységeit mellőzve, néhány alapfogalom ismertetése mellett, elsősorban a disszertációm témáját érintő analitikai kémiai lehetőségek rövid irodalmi ismertetésére vállalkozom.

2.1. Lézer ablációs tömegspektrometria

Nagy energiájú impulzuslézer nyalábját egy szilárd vagy folyékony felületre fókuszálva olyan lokális teljesítménysűrűség (10^6 - 10^{12} W/cm²) érhető el, amely elegendő az adott terület pillanatszerű elpárologtatásához, szublimálásához. A minta felületén a lézer fókuszpontjában lejátszódó részfolyamatok (pl. fotonabszorpció, anyag kilökődés, párolgás, lökeshullám képződés) összességét lézer ablációnak (LA) nevezzünk, amelynek széleskörű ipari, mikroelektronikai, művészeti, klinikai, anyagtudományi és analitikai kémiai alkalmazási lehetőségeit ismerjük [2-11]. A folyamat legfontosabb kísérleti paramétere az ablációs küszöb, amely az a minimális fluencia (J/cm²), amelynél egy adott atom vagy molekula jelentős mennyiségben megfigyelhető az ablációs felhőben. Ez a küszöb a lézer hullámhosszától függ, és a rácsban lévő atomok közötti Lennard-Jones potenciált feltételezve szimulálható, azonban általánosságban pontos értékét kísérleti úton határozzák meg. A lézerfény intenzitásának, energiasűrűségének megfelelően, az ablációs küszöbérték alatt nem következik be anyageltávozás, ilyenkor csupán felületi sérülések (pl. átkristályosodás, olvadás) keletkeznek, míg az felett megtörténik a mintafelület ablációja (1. ábra). Ezt az ablációs küszöbérték felett tapasztalható anyagkilökődést számos analitikai eljárás hasznosítja mintabevitel, illetve ionizáció céljára (pl. MALDI, LDI, LAESI). Az energiasűrűség további növelése a plazmaképződési küszöbértéket elérve már a gőzfázis optikai lebontásához és letörési plazma keletkezéséhez vezet, amely lehetőséget teremt elemanalitikai vizsgálatok elvégzésére (pl. lézer indukált plazma spektrometria, LIBS) [2].

A minta molekuláinak gázfázisba juttatása, illetve ionizációja történhet gyors, tipikusan nano- és femtoszekundum impulzushossz-tartományba eső monokromatikus, jól kollimált fénynyalábbal. Az abláció mechanizmusa nagyban függ az alkalmazott lézerimpulzus hosszától. Míg nanoszekundumos lézerek esetén a termikus folyamatok a jellemzőek, addig femtoszekundumos tartományban a minta lokális ionizációja és az ott keletkező töltött részecskék elektrosztatikus taszító kölcsönhatása és ennek hatására bekövetkező Coulomb-robbanás a meghatározó [2, 12]. Az analitikai lézer ablációs módszerekben alkalmazott fényforrás hullámhossza többnyire az UV vagy IR

tartományba esik, míg frekvencia-tartománya 50-2000 Hz közötti, ennek megfelelően igen népszerűek a nitrogén-, Nd:YAG szilárdtest-, mid-IR lézerek [9].



1. ábra: A lézer ablációs küszöbérték felett tapasztalható lézer ablációs kráterek megjelenése egy fagyasztott egér agy metszet felületén 5 ns 2940 nm Q-kapcsolt mid-IR lézerimpulzusok (IR Opolette 100, LAESI) alkalmazása esetén (fotó: Prof. Vértés Ákos, The George Washington University).

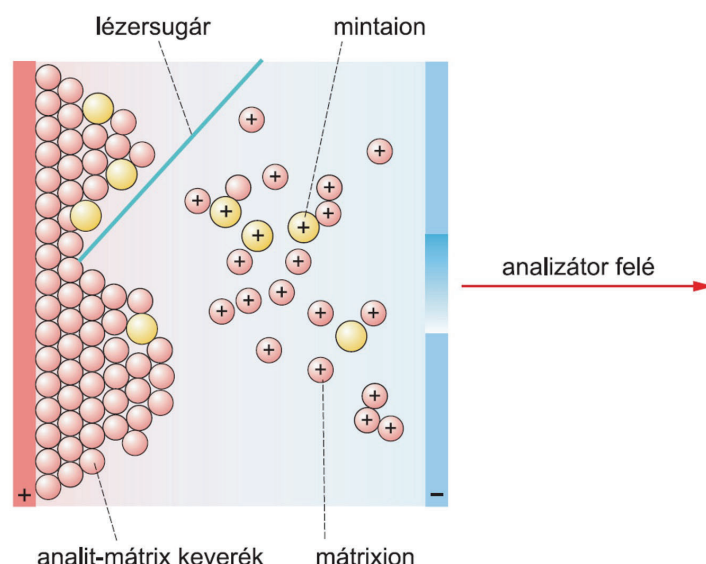
A lézerrel kiváltott abláció és molekuláris deszorpció jelenségével annak fizikai folyamatainak leírásával és modellezésével számos kutatócsoport foglalkozott, azonban a mai napig nem teljesen tisztázott a jelenség pontos mechanizmusa [8, 12-14]. Molekuladinamikai modellezéssel és elméleti számításokkal néhány fizikai jellemző meghatározható, azonban számos paraméter csak empirikus úton adható meg pontosan [15].

Az alkalmazott lézer energiája általában kettős hatású: elvégzi a szilárd minta ablációját és ionizálja a keletkező részecskefelhőben található vegyületeket, azonban nem minden esetben történik meg mindkét folyamat. Vannak ionizációs technikák, amikor a lézer a minta elpárologtatásáért felelős, míg az ionizációt egy másodlagos ionforrás végzi el. Ilyen technika többek között a lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (LAESI) [15-18], a lézer elektroporlasztásos tömegspektrometria (laser electrospray mass spectrometry, LEMS) [19], az infravörös lézer ablációs metastabil-indukált kémiai ionizáció (infrared laser ablation metastabile-induced chemical ionization, IR-LAMICI) [20], a lézer ablációs áramló atmoszférikus nyomású utólagos besugárzású ionizáció (laser ablation coupled to flowing atmospheric-pressure afterglow, LA-FAPA) [21], és a mátrix-segített lézerdeszorpciós elektroporlasztásos ionizáció (matrix-assisted laser desorption electrospray ionization, MALDESI) [22].

2.2 Mátrix-segített lézerdeszorpció/ionizáció

A 60-as évek végétől intenzív fejlesztések kezdődtek a nem illékony, nagy molekulatömegű vegyületek tömegspektrometriás vizsgálataival kapcsolatban, majd ezt követően fókuszba kerültek a lézerimpulzusokra épülő ionizációs lehetőségek [23-27]. A tömegspektrometriás „illékonyági gát” áttörésére számos deszorpciós/ionizációs technika jelent meg, azonban a termikus bomlásra érzékeny biológiai aktív szerves vegyületek, biopolimerek analízise során gyakran keletkeztek rövid élettartalmú fragmensek. Ezen probléma megoldását az 1984 és 1986 között Karas és Hillenkamp által kifejlesztett UV-MALDI jelentette [28-30]. Vizsgálataik során a mintamolekulákhoz nagy feleslegben, kis molekulatömegű illékony, kromofór molekulaszervezetet tartalmazó (pl. nikotinsav) ún. mátrix anyagot keverték, amely az alkalmazott UV lézer hullámhosszán erős rezonancia-abszorpciót mutatott. Tanaka és munkatársai 1987-ben számoltak be egy alternatív lézer deszorpciós ionizációról, amelyben oldószerként glicerint, lézerenergia abszorbensként pedig finom fémport használtak. Meghatározó, 1988-ban publikált tanulmányukban sikeresen azonosítottak 35 kDa molekulatömegű, egyszerűen töltött fehérjeionokat [31]. Korábbi, plazma deszorpciót és gyors atom bombázást alkalmazó tömegspektrometriás tanulmányok ugyan közöltek spektrumokat a 10-30 kDa tartományban [32-34], azonban a MALDI ionstabilitása és érzékenysége nagyságrendekkel meghaladta azokat. Ennek köszönhetően a MALDI bevezetése után a módszer multidiszciplinális térhódítása pillanatokon belül megtörtént [28-31, 35], azonban az applikációs fejlesztéseket a deszorpciós/ionizációs mechanizmus elemi folyamatainak leírása, átfogó értelmezése csak késlekedve követte. Néhány meghatározó jelentőségű, a 80-as években megjelent kutatási eredménytől eltekintve, a MALDI elméleti hátterének tisztázása csupán az ezredforduló környékén kapott megfelelő hangsúlyt és a mai napig nem ismert a deszorpció/ionizáció minden részfolyamata [13, 36-40]. Ezt a tudományos bizonytalanságot a lézer ablációs folyamatok és a MALDI elméleti hátterének, mechanizmusának kutatásában Vértés és munkatársai korán felismerték és olyan úttörő munkát végeztek, amely meghatározó jelentőségű a nemzetközi szakirodalomban [2, 41-48].

A MALDI folyamatban az alkalmazott mátrix hármasszerű hatása: először is kontrollált fotonabszorpciót és energiaátadást tesz lehetővé a kondenzált fázisú mátrix-minta keverékben, amely egyenletes és lágy deszorpciót idéz elő; másodsor kémiai reakciók révén elősegíti az ionizációt; végül kedvező feltételeket teremt a minta molekuláinak izolálásával (2. ábra). A mátrix-minta keverékben a lézerimpulzus/lézerimpulzusok hatására bekövetkező összetett eseménykasztr számos fizikai és kémiai folyamat eredőjeként teszi lehetővé a MALDI analitikai alkalmazását. A sikeres MALDI-MS analízis több döntő lépést foglal magában: a minta előkészítése, a minta gerjesztése és a kondenzált fázis szétesése, töltések generálása és elválasztása, valamint az elemzendő molekulák ionizálása, végül tömeg/töltés arány szerint szeparálás és detektálás [36].



2. ábra: A mátrix-segített lézer deszorpciós ionizáció elve [XXX, XXXII].

A MALDI mechanizmusának leírásában alkalmazott modellek fő korlátját az egyes elemi folyamatok külön-külön történő értelmezése jelenti. Az elsődleges és másodlagos események szétválasztásának fő oka azok eltérő időskálája. A lézerimpulzus nitrogén vagy Nd:YAG forrás esetében ca. 3-5 ns-ig tart, míg az ablációs felhő ütközésmentes sűrűsége való kiterjedéséhez több mikroszekundum szükséges [39]. Elsőként a lézer-anyag kölcsönhatása és az energia abszorpciója a meghatározó, amelyben a legjelentősebb paraméter a lézerfluencia. (A MALDI TOF műszerekben gyakorlatilag a lézerfluens egy kritikus paraméter, amelyet az adott feladathoz szükséges optimalizálni, beállítani.) Kiderült azonban, hogy nincs közvetlen összefüggés a fluencia és a keletkezett ionok belső energiája között [49, 50]. Ismertté vált, hogy a nagy lézerfluenciáknál tapasztalható káros hatások (pl. jelcsökkenés, ionsuppresszió) kialakulásáért az ablációs felhőben bekövetkező másodlagos folyamatok, például az axiális MALDI TOF rendszerek gyorsítási fázisában bekövetkező ütközések a felelősek [51].

1. táblázat: Mátrixként leggyakrabban alkalmazott vegyületek alkalmazási területei.

mátrix vegyület	protein	peptid	szénhidrát	lipid	nukleinsav
SA	X				
CHCA	X	X	X	X	
2,4-DHAP	X	X	X		
2,5-DHAP	X	X	X		
DHBA		X	X	X	
THAP		X	X	X	X
1,5-DAN		X		X	
9-AA				X	

A módszer egyik legkényesebb pontja az optimális mátrix kiválasztása egy adott vizsgálathoz, koncentrációjának, oldószerének és mennyiségének meghatározása. Általában mustársavat (SA), α -ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (HCCA, CHCA), 2,5-

dihidroxi-benzoésavat (2,5-DHBA), 2',4'-dihidroxiacetofenont (2,4-DHAP), 2',5'-dihidroxiacetofenont (2,5-DHAP), 2',4',6'-trihidroxiacetofenont (THAP), 9-aminoakridint (9-AA) alkalmazunk (1. táblázat), de vannak speciális applikációkhoz optimalizált mátrixok is (pl. fullerén, szén-nanocső, fém-vegyületek, fémporok, nemesfém bevonatok).

A peptidek és fehérjék MALDI vizsgálatára jellemző a vizsgálandó ionok nagy kezdeti ionsebessége, ami az alkalmazott mátrixtól függően jellemzően 300 és 800 m/s között változhat. Ez a kezdeti ionsebesség első közelítésben független a vizsgálandó vegyület tömegétől, valamint a töltési állapottól és az ion polaritásától. Az analitikailag hasznos áramlási tartományon belüli lézerfluencia sem befolyásolja, csupán a kristályosodást befolyásoló kísérleti változók, például az alkalmazott oldószerek és a mátrixként használt vegyületek eredményezhetnek jelentős v_0 eltolódást [39, 52, 53]. Általánosságban kijelenthető, hogy a nagyobb kezdeti ionsebességet okozó mátrixok (pl. 2,5-DHBA) lágyabb ionizációt tesznek lehetővé, míg például a CHCA nagyobb mértékű fragmentációt indukál. Egy-egy mátrix esetében néha eltérő kezdeti sebességek is megfigyelhetők, és jellemzően különböző kristályosodási állapotú területeknek tulajdoníthatók, mint például egy durván kristályos csepp-perem és egy mikrokristályos belső rész. A nagy kezdeti sebesség jelentős szórást mutat ($v_0 \pm 0,5 v_0$), amely a lineáris TOF analízis korlátaíért felelős, és jelentősen kompenzálható reflektoron detektor használatával. Az is megfigyelhető, hogy az axiális kezdősebesség lényegesen nagyobb, mint a radiális, ennek megfelelően a MALDI csóva erősen előre felé irányul, amely növeli az ionizációs hatásfokot és az analitikai érzékenységet. Ezt a kedvező orientációs folyamatot néhány különleges porozitással vagy nanostruktúrával rendelkező MALDI technika felerősítheti (pl. desorption/ionization on porous silicon, DIOS, silicon nanopost array, NAPA) további előnyöket jelentve [54-56]. A korábbi vizsgálatokból az is egyértelművé vált, hogy az abláció/deszorpció során mátrixból és a mintavegyület-mátrixból álló nagy molekulatömegű részecske-klaszterek jönnek létre. Ezek a molekuláris klaszterek az általános körülmények között rögzített MALDI tömegspektrumon nem, vagy csak a kémiai zajban jelennek meg, azonban az ionforrás nyomásának növelésére (ca. 2 mbar) intenzitásuk erősödik. Megfigyelhető volt továbbá az is, hogy nagyobb lézerfluencia esetén a klaszterek fragmentálódnak és eltűnnek a spektrumból [39].

A lézerfluencia hatására bekövetkező elsődleges folyamatokhoz hasonlóan az ablációs felhőben lejátszódó másodlagos interakciók is sokrétűek. A tömegspektrumon megjelenő ionok kvalitatív és kvantitatív paramétereiben elsősorban az ionizáció mechanizmusa, az ionszupresszió és a feleslegben alkalmazott mátrix hozzájárulása a meghatározó. A mintaelőkészítésnél alkalmazott oldat pH-értékének függvényében a vizsgált vegyületek meghatározott töltési állapotban épülnek be a mátrix kristályokba. Ennek köszönhetően a minta-mátrix keverékben mindig találhatóak már töltéssel rendelkező részecskék, amelyek a lézer abláció hatására kilökődnek így esetükben nincs szükség további aktív ionizációs lépésekre. Ennek ellenére a minta-mátrix klaszterben számos mátrix indukálta folyamat játszódik le, ugyanis a felszabaduló ionokat el kell választani az ellenionjaiktól,

ez mellett töltés átrendeződésre van szükség az eltérő polaritású funkciós csoportot tartalmazó vegyületeknél (pl. fehérjék, peptidek) [39].

Az eredendően semleges részecskék ionizációja számára a protontranszfer a legfontosabb másodlagos reakció. A peptidek és fehérjék meglehetősen magas proton affinitással rendelkeznek (>900 kJ/mol), lényegesen nagyobb, mint a tipikus mátrixok proton affinitás értékei, amelyek 850 és 900 kJ/mol között vannak. Várható tehát, hogy a mátrix hatékonyan protonálja a minta molekuláit és ennek megfelelően a MALDI TOF tömegspektrumban túlnyomórészt protonált formában fedezhetjük fel azokat [40]. A MALDI-t gyakran gyengén savas karakterű mátrixokkal végzik, és a tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban rögzítik. Azonban, ha a vizsgálandó komponens alacsony proton affinitással rendelkezik, előnyös lehet a negatív ionok mérése és egy bázikusabb mátrix használata. Ezekben az esetekben az elsődleges deprotonált mátrix hatékonyan képes elvonni protonokat a semleges molekuláktól, és/vagy nem ad protonokat a deprotonált részecskéknek. Az oligonukleotidok vagy foszforilált peptidek általában híg oldatban deprotonálódnak, majd a minta kristályosodásakor olyan sókat képeznek, amelyek nem protonálódnak gázfázisban. Ilyen esetekben megfelelő adalékanyagokkal (pl. spermin, ammónium sók) segíthető a protontranszfer és a pozitív polaritású ionizáció [57-59]. A protonátvitelhez kapcsolódik a hidrogénatom transzfer lehetősége is, amely során a molekulatömeg 1, 2 vagy akár 3 daltonnal növekedve detektálható. Calba és munkatársai megfigyelték, hogy a H atom transzfer fotokróm rendszerek MALDI ionizációjában intenzív $[M+3H]^+$ jelet produkálnak a tömegspektrumban. A deuterált mátrixszal végzett kísérletekből kiderült, hogy a H atomok mátrixmolekulákból származnak [60].

A MALDI ionizációs mechanizmusában a protontranszfer mellett jelentős szerepe van a kation transzfernek is. Ebben az esetben többnyire K^+ , Na^+ esetleg Li^+ ionadduktok keletkeznek az ablációs körülmények között. A kationokkal alkotott kvázimolekulaionok megjelenése gyakran zavaró lehet, azonban a gyenge protonálódást mutató komponensek esetében érzékenységnövelést is elérhetünk alkalmazásukkal (pl. a lipidek képzalkotási tömegspektrometriás vizsgálatánál nagyon gyakran a kálium- vagy nátrium-adduktok intenzívebb jelet produkálnak, mint a molekulaionok). Felmerül a kérdés, hogy miért jelennek meg a kationadduktok ilyen nagy jelintenzitással a tömegspektrumban annak ellenére, hogy a proton affinitása mindig nagyobb. A választ a minta komponensei és mátrix protonokért folytatott versengésében kereshetjük. A kationadduktok megjelenése jellemzően fontos azoknál a vegyületeknél, amelyek proton affinitása kisebb, mint a mátrixé. Ezért a meghatározandó komponensnek versenyeznie kell a semleges mátrixszal a gázfázisban elérhető protonokért és így a kationaddukt képzés a végső megoldás a molekula ionizációjára [61].

Molekuláris gyökkationok megjelenése elektrontranszfer segítségével számos MALDI spektrumban megjelenhet, ilyenkor a primer mátrixkationok $[M]^+$ másodlagos reakciókban elvonják az elektronokat a molekuláktól (A) (1), vagy éppen fordítva a semleges mátrixból (M) a pozitív töltésű ionokba (Cu^{2+}) történik a negatív töltés áramlása (2).



A MALDI esetében a tömegspektrumban megjelenő ionok relatív intenzitása számos paramétertől függ. Elsőként a mátrix és minta keverékének eloszlásától, ugyanis homogén mikrokristályos szerkezet hiányában a kapott eredmények reprodukálhatatlanok lehetnek. Itt azonban meg kell jegyezni, hogy míg korábban a mátrix-vegyület mikrokristályok homogén keverékének jelenlétét elengedhetetlennek tartották a megfelelő minőségű MALDI tömegspektrum felvételéhez, napjainkban számos alkalmazás használ egymással érintkező mátrix vagy minta rétegeket (pl. nanoparticle-assisted laser desorption/ionization, NALDI, surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI) ionizációt elősegítő felületeket (pl. NAPA, DIOS), illetve az analizálandó mintára párologtatott/szublimált/porlasztott mátrixot (pl. képkalkotási tömegspektrometria). Másodsorban az ablációs felhőben megfelelő számú ütközésnek kell megtörténnie, amely szoros korrelációban van az alkalmazott lézerfluencia értékével, mivel magasabb fluencia nagyobb mennyiségű kilökődött anyagot és így nagyobb sűrűségű gázfelhőt eredményez. Végül termikusan hozzáférhető aktiválási energiák szükségesek. Ha a releváns másodlagos reakciók nagy aktiválási energiával rendelkeznek, kinetikailag korlátozott ioneloszlás léphet fel, de ez igen ritka a MALDI tömegspektrometriában. Az alapvetően jellemző protontranszfer reakciók általában meglehetősen alacsony energetikai gáttal rendelkeznek, míg a kationtranszfer reakciókat kevésbé tanulmányozták, de a nátriumionok esetében az átvitel gátja jellemzően 5-10 kJ/mol, így termikusan meglehetősen hozzáférhető az ablációs gázelegyenletben [40].

A MALDI vizsgálatoknál a mátrixot nagy feleslegben alkalmazzák, azonban optimális koncentráció esetén a tömegspektrumban a mátrixionok csak csekély mértékben vagy egyáltalán nem jelennek meg. Ezt a jelenséget mátrix elnyomási effektusnak nevezzük és a mátrix-minta molekuláris kölcsönhatásainak köszönhetően jön létre (pl. protontranszfer, hidrogén transzfer).

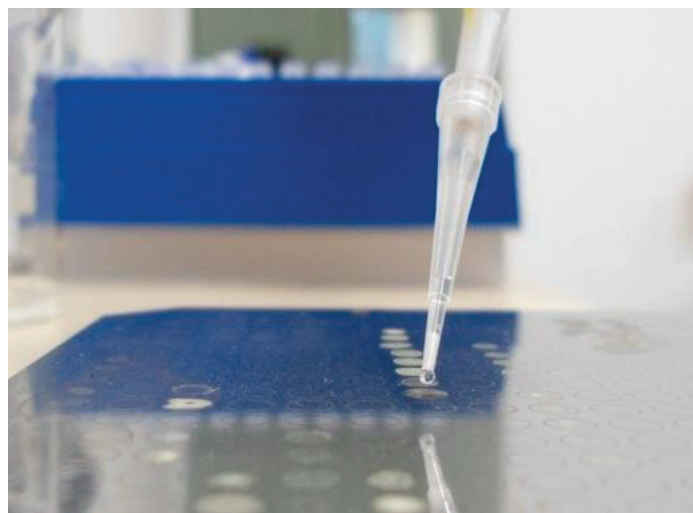
A mátrix elnyomási effektushoz hasonlóan az ablációs gázfelhő termodinamikai modellje azt is előrevetíti, hogy egyik komponens képes elnyomni a másik ionizációját. Ez a folyamat a minta elnyomási effektus, amely igen gyakori a MALDI esetében. Jól ismert például, hogy a triptikus emésztéssel előállított peptideknek csak egy részhalmaza figyelhető meg a MALDI-spektrumban, de ha az egyes peptideket elválasztjuk és külön elemezzük, akkor mindegyik detektálható. Azt találták, hogy a peptid-peptid szupresszió egy komplex keverékben erősen korrelál a gázfázis bázikusságával [40]. Ilyen szupressziós hatást figyelhetünk meg a lipidek és a fehérjék között a képkalkotási tömegspektrometriás alkalmazásokban, ahol a fehérjék vizsgálata előtt lipidmentesíteni kell a szövetmetszetet annak érdekében, hogy a peptidek és fehérjék detektálhatók legyenek.

A MALDI MS spektrumban feltűnő az egyszeres ionok dominanciája, amely az alkalmazások többségében előnyt jelent. Az előrejelzések és az empirikus tapasztalatok

alapján is megfigyelhető, hogy a többszörös töltésű ionok megjelenése a molekulatömeggel együtt növekszik. Ahogy a molekulák egyre nagyobbak lesznek, a töltések kellően elkülönülnek ahhoz, hogy egyre függetlenebbé váljanak. Így a rendszer belső Coulomb-energiája kellően lecsökken ahhoz, hogy a semleges mátrixú elektron- vagy protontranszfer reakciókkal való redukció megszűnjön és az ion többszörösen feltöltött maradjon. Ellentétben a nagy töltésű kis és közepes méretű ionok lényegében mindig +1 állapotba redukálhatók a semleges mátrixszal való proton- vagy elektronátviteli reakciókkal.

A MALDI módszer előnyei a nagy molekulatömegű fehérjék tömegspektrometriás elemzése során gyorsan körvonalazódtak, így meghatározó ionizációs technikává vált a biológiai minták vizsgálatában [62, XXVIII, XXIX,]. A MALDI esetében korábban 50-200 Hz frekvenciájú nitrogén lézer (337 nm, 3,72eV, 2,5 ns), míg napjainkban többnyire 1-2 kHz-es, frekvencia-háromszorozott Nd:YAG lézer (355 nm, 3,53eV, 3 ns) alkalmazása az általános.

A mintaelőkészítés során többnyire a mátrix- és a mintaoldat keverékét (0,2–2 µl) a rozsdamentes acél mintatartóra szárítjuk úgy, hogy lehetőleg homogén mikrokristályos szilárd elegyet kapjunk (3. ábra). A nanoszekundumos lézerimpulzusok ebből a szilárd felületből párologtatnak el anyagot, és ez az ionizált részecskefelhő, néhány nanoszekundum (tipikusan 80-200 ns) késleltetés után (delayed extraction) kerül az analizátorba. A késleltetett extrakció alkalmazásával javítható a spektrális felbontás, mivel a különböző kinetikus energiájú, de azonos tömegű ionok sebessége az analizátor fókuszáló lencséjéig kiegyenlítődik és így egy ionsomagként jutnak be a repülési csőbe és végül a detektorba [63].



3. ábra: Mintafelvétel MALDI TOF MS vizsgálathoz.

Különleges applikációk (pl. képképzési tömegspektrometria) esetén a mátrix felvitele történhet ködképzéssel, szublimáltatással vagy nanocseppek formájában, így biztosítható az optimális mátrix-minta arány és a kristályok homogenitása egyaránt.

A MALDI segítségével kíméletesen, jelentős fragmentáció nélkül és hatékonyan ionizálhatók még nagy tömegű, bomlékony molekulák is (fehérjék, lipidek, szénhidrátok, oligonukleotidok, polimerek), így igen elterjedt módszer a biológiai, orvos-biológiai

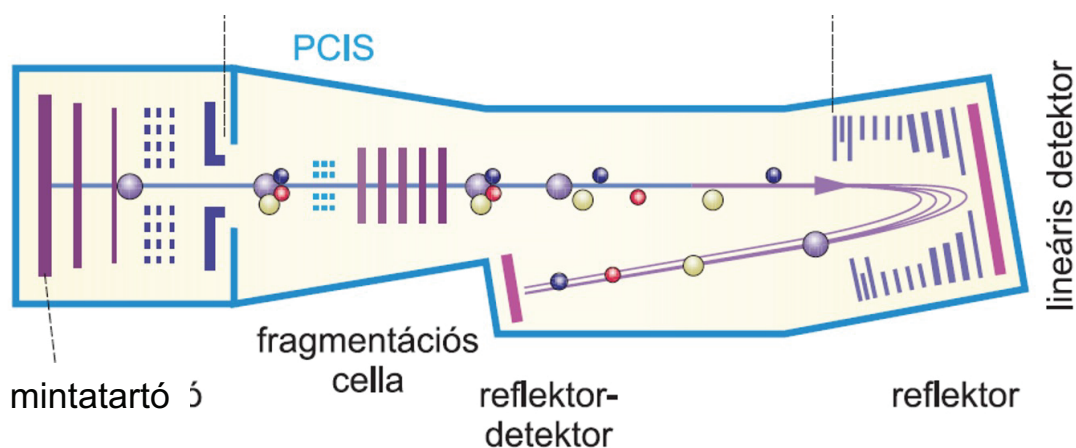
kutatásokban [62, 64-69]. További előnye az óriási minta-áteresztő képessége, amely napi több ezer mintát is jelenthet, illetve a tömegspektrum egyszerű felépítése, hiszen többnyire egyszeres, esetleg kétszeres ionok jelennek meg rajta. A módszer hátrányai főként a heterogén minta-mátrix kristályszerkezetre és a mai napig felderítetlen deszorpciós/ionizációs mechanizmusra vezethetők vissza, így az eredmények kvantitatív következtetések levonására csak korlátozottan használhatók. A kis molekulatömegű vegyületek mennyiségi vizsgálatának területén a legígéretesebb megoldások a nanorészecskék homogén felületének alkalmazása (NALDI) a mintatartó tálcán. Ebben az esetben ugyanis maga a felület segíti a lézer energiájának elnyelését és az ionizációt (SELDI) és így az eredményeket nem befolyásolja a minta/mátrix arány és kristályszerkezet. Alapvető fontosságú a mérések tömegtartományához optimalizált gyakori, akár minden minta mérése előtti tömegkalibráció. A MALDI módszer előnyeit és hátrányait a 2. táblázat foglalja össze.

Az ionforrás impulzusüzemű működése miatt a MALDI ideális analízátora a repülési idő analízátor (TOF). Ez mellett, a MALDI során többnyire egyszeresen töltött ionok képződnek, így a nagyobb tömegű vegyületek (pl. fehérjék, polimerek, poliszacharidok) molekula-, illetve kvázimolekula-ionjai csupán repülési idő analízátorral detektálhatók. A repülési idő analízátor alkalmazásával széles tömegtartomány és nagy érzékenység érhető el, amely reflektrom módban kiegészül a nagy spektrális felbontással is. A MALDI TOF tömegspektrometria által biztosított tömegtartomány miatt célszerűen két detektort alkalmazunk. A kis tömegű ionokat a nagyobb úthossz és jobb ionfókuszálást biztosító reflektrom detektorban, míg a nagyobb tömegűeket lineáris módban mérjük. A MALDI TOF/TOF MS készülék sematikus felépítését az 4. ábra mutatja be.

2. táblázat: A MALDI technika előnyeinek és hátrányainak összefoglalása [XXXII].

Előnyök	Hátrányok
egyszerű mintaelőkészítés	gyakori kalibrációs igény
egyszerű, könnyen értelmezhető spektrum	korlátozott kvantitatív információ
költséghatékony üzemeltetés	erős ionszupresszió
alacsony karbantartási költség	változó minőségű MS/MS adatok
kis mintamennyiség (1-2 mikroliter)	érzékenység a sótartalomra
nagy mintaáteresztő képesség	kis molekulatömegek interferenciája a mátrixszal
korlátlan ismételhetőség	széles prekursorion szelekciós ablak (TOF/TOF)
nagy érzékenység	
képalkotási lehetőségek	
rosszul oldódó minták, szuszpenziók vizsgálata	

A kimutatási határ rutinszerűen femtomol nagyságrendű, de mivel a minta kristályos állapotban a mintatartó tálcán van, így a minták tetszőleges alkalommal és számban újramérhetők, szállíthatók, fagyaszthatók, archiválhatók. Az egyedi lézerimpulzusok által generált spektrumokat önállóan is kiértékelhetjük vagy akár több ezer spektrumot egyesíthetünk a jobb jel/zaj viszony és a nagyobb érzékenység érdekében.



4. ábra: A MALDI TOF/TOF tömegspektrométer sematikus felépítése [XXX, XXXII].

A reflektoros detektorral rendelkező MALDI készülékek alkalmasak tandem tömegspektrometriás vizsgálatokra közvetlenül az ionforrás után bekövetkező fragmentálással (post source decay, PSD), ilyenkor a megemelt lézerenergia segítségével bekövetkező unimolekuláris bomlásokból keletkezett fragmens ionokat detektálhatjuk. Bizonyos körülmények között, tiszta, nagy mennyiségű (néhány mikrogramm) fehérjeminta esetében a módszer alkalmas intakt fehérjék terminális szekvenciáinak meghatározására. Néhány típusú MALDI TOF/TOF MS készülékkel megvalósítható a prekursor ion szelekció és fragmentáció is, melynek során az ionforrásból kilépő részecskéket a PSD mellett argongáz segítségével egy erre a célra kialakított ütközési cellában (collision-induced dissociation, CID) is fragmentálhatjuk.

Az utóbbi évtizedben a MALDI TOF MS egyre inkább kiszorul a proteomikai applikációkból, hiszen a nano- és mikrokromatográfiával kapcsolt nagy felbontású és tömegpontosságú tandem tömegspektrométerek lényegesen megbízhatóbb, akár kvantitatív eredményeket is szolgáltatnak. Ennek ellenére a MALDI technikák kiválóan alkalmasak nagy áteresztőképességű szűrészjellegű, molekuláris ujjlenyomat elemzésre épülő fehérje és peptid analitikai vizsgálatok elvégzésére. Az egyszerű mintaelőkészítés és a szükséges minta csekély térfogata (0,5-10 mikroliter) miatt szinte minden fajta mintán gyorsan és könnyen alkalmazható.

Számos próbálkozás volt az LC MS technikák diagnosztikai laboratóriumi bevezetésére, azonban ezek kevés sikerrel jártak. Ezzel ellentétben napjainkban, a modern mikrobiológiai laboratóriumok ezrével alkalmazzák különböző gyártók, kisméretű (benchtop) MALDI TOF MS készülékeit a kórokozók fajsztípus azonosításában és a mikrobiális fertőzések rutin diagnosztikájában [XXIX]. Ezek a mikrobiológiai felhasználásra optimalizált MALDI készülékek lineáris detektorukkal és tipikusan 200-2000 Hz-es Nd:YAG szilárdtest UV lézerükkel egy költséghatékony, de napi rutinban megbízhatóan használható megoldást jelentenek, amelynek segítségével szövetekből, vérből, vizeletből a töredékére csökkent a humán patogén baktériumok, gombák fajsztípus detektálásának ideje és költsége. A vizsgálatok során 96 minta felvitelére alkalmas rozsdamentes acél mintatartó tálcára cseppentve a mintát és a mátrix-oldatot, azt beszárítva mérhetünk. Az analízis tipikus vizsgálati ideje a lézer frekvenciája

függvényében ca. 30-50 másodperc/minta. A vizsgálatok során a készülék kalibrálásához általában egy baktériumfajból (pl. *E. coli*) készített kivonatot használunk. A gyártók a készülékekhez egyszerűen használható, az egyes felhasználási területekre kifejlesztett (pl. vérminták elemzése, baktériumok vagy gombák vizsgálata) készleteket forgalmaznak, amelyek segítségével néhány órás betanulás után bárki megfelelő, klinikailag validált eredményeket kaphat. Az eredmények kiértékelése automatikusan a megfelelő fajspecifikus adatbázis segítségével történik, amely tetszőlegesen bővíthető, fejleszthető.

2.3. Lézeres elpárologtatást alkalmazó képalkotási tömegspektrometria

Gyakran találkozhatunk a kifejezéssel: „egy kép többet ér ezer szónál” [70]. Az MS vizsgálatok evolúciójában nem is lehetne ennél jobban jellemezni a képalkotó tömegspektrometriás (imaging mass spectrometry, IMS) eredmények hatását a biológiai, a gyógyszer- és orvostudományi, valamint a klinikai molekuláris vizsgálatok fejlődésében. Napjaink egyik legizgalmasabb fejlesztése a tömegspektrometria képalkotó módszerként történő alkalmazása, ugyanis segítségével közvetlenül szöveti vagy sejtes mintákon vizsgálható a kérdéses molekulák térbeli eloszlása. Számos molekuláris képalkotó technika ismert (pl. immunhisztokémia, fluoreszcens mikroszkópia, mágneses magrezonancia, pozitron emissziós tomográfia, komputeres tomográfia), amelyek főként a klinikai és elméleti orvostudomány és a gyógyszer tudomány területén terjedtek el. Ezen képalkotási technikák közös jellemzője, hogy alkalmazásukkal jó térbeli felbontás és részletgazdag kép érhető el, azonban a kérdéses biomarker molekulát/molekulákat valamilyen módon láthatóvá kell tenni, tehát meg kell jelölni azokat. Ez óriási korlátot jelent a vizsgált komponensek számában, illetve a jelöléses technikák gyakorlatilag alkalmatlanok a még ismeretlen patológiás biomarkerek felfedezésére. Ismertek olyan képalkotó technikák is, ahol nem szükséges jelölés (pl. Raman-mikroszkópia), azonban ezekben az esetekben a spektrum nem szolgáltat kellően specifikus molekuláris képet. A képalkotási tömegspektrometria a fentiekkel ellentétben ötvözi a szövettani, anatómiai eloszlásra jellemző lokális struktúrákat az MS érzékenységevel, viszonylag nagy dinamikus tartományával, univerzalitásával és szerkezetazonosítási lehetőségeivel.

Az IMS gyökerei az 1960-as évek elejére nyúlnak vissza, ugyanis ekkor jelent meg a másodlagos ion tömegspektrometria (secondary ion mass spectrometry, SIMS) képalkotó alkalmazása. A kezdeti fejlesztések főként elemek (Al, Mg, Si) térbeli eloszlásának kimutatására szolgáltak [71], majd megjelentek a biológiai szövetek kis molekulatömegű komponenseinek (lipidek, gyógyszerhatóanyagok) vizsgálatai [72]. A részecskebombázással kiváltott ionizáció mellett természetesen a lézer ablációs tömegspektrometria is pillanatok alatt helyet kapott a képalkotási technikák között.

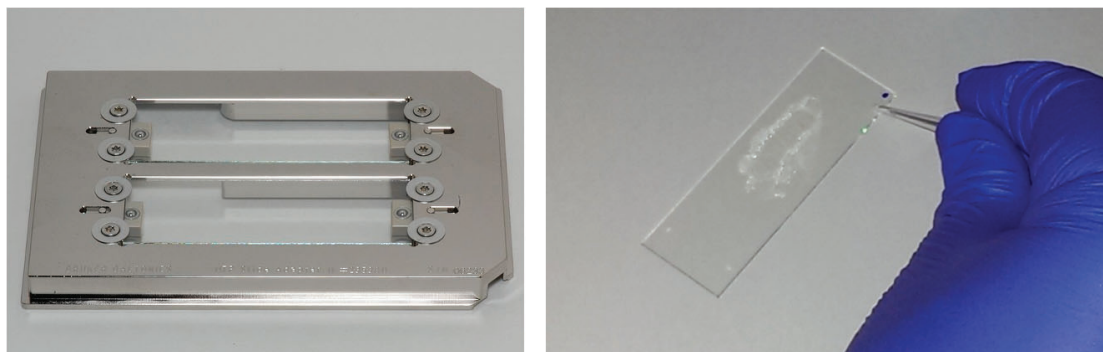
Caprioli és munkatársai a 90-es évek végén hozták nyilvánosságra a MALDI TOF MS módszer alkalmazását közvetlenül szövettani minták peptid és fehérje összetételének vizsgálatára [73]. Közleményüket követően világszerte intenzív érdeklődés indult meg a tömegspektrometriás eljárások képalkotási alkalmazásával és új „imaging kompatibilis” ionforrások kifejlesztésével és a lehetséges applikációkkal kapcsolatban [74, 75]. Ennek köszönhetően a lézer ablációs tömegspektrometria újra a kutatások fókuszába került és a

lézerimpulzusokkal kiváltott molekuláris képalkotás beszűrődött a biokémia, biológia, orvos- és gyógyszer tudományok világába. Nemes és Vértés 2007-ben fejlesztették ki a LAESI módszert, amelynél légköri nyomáson a víz gerjesztési hullámhosszán működő impulzus lézer segítségével végezett ablációt követően elektroporlasztásos ionizációt alkalmaztak [76]. Az új módszer, mátrix-mentes, *in-vivo* elemzési lehetőségeivel és nagy térbeli felbontásával szinte azonnal bizonyította benne rejlő képalkotási lehetőségeket [77, 78].

Az „omikák” (pl. genomika, proteomika, lipidomika, metabolomika) exponenciális fejlődéséhez, a jelölésmentes, kellő érzékenységű és univerzális detektálásra használható új, képalkotási tömegspektrometriás koncepció — amit összefoglalóan „spatialomics” is neveznek — megadta a heterogén felépítésű biológiai rendszerek lokális molekuláris változásainak nagy felbontású vizsgálati lehetőségét.

Jelenleg a leggyakrabban alkalmazott a MALDI képalkotási tömegspektrometria, melynek során egy speciális, átlátszó elektromos vezető réteget (indium-ón oxid, indium-tin oxide, ITO) tartalmazó mintatartóra 10-20 mikronos szövettani metszetet és mátxot szárítunk (5. ábra) [79-93]. A MALDI tömegspektrometria képalkotási alkalmazása során alapvető fontosságú egy vékony mátrixréteg kialakítása [94], a mátrixkristályok homogenitása és mérete, ennek megfelelően a mátrix felvitelének technológiája meghatározó jelentőségű. A mátrix felvitele történhet oldatból porlasztással vagy cseppképzéssel, illetve oldószer mentes körülmények között, szublimálással és szilárd bevonat létrehozásával (dry coating) [95-101]. Jelentős hatása van a szövet és a mátrixszal bevont felület egyenetlenségének, ugyanis kisebb felületi eltérések is csúcseltolódáshoz és az érzékenység csökkenéséhez vezethetnek. Nyilvánvalóan ez a hatás még kifejezettebben jelentkezik sejtes minták, teljes szervek, biopsziák vizsgálatakor, ilyenkor a felület 3D feltérképezésével pontról-pontra optimalizálhatják a lézer fókuszot, illetve belső kalibrációs standard alkalmazásával a tömegeltolódás is kiküszöbölhető [102].

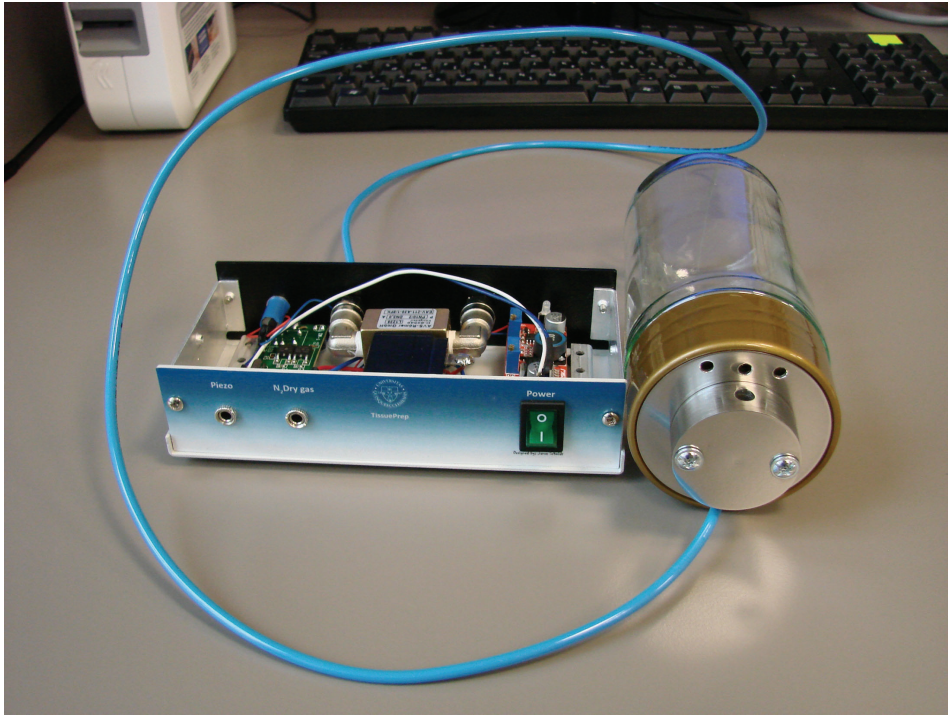
A kristályszerkezet mellett kritikus paraméter a szövetmetszet mátrixoldattal történő penetrációja és a vizsgálandó komponensek felületi extrakciója. A mátrixoldat készülhet bármilyen általánosan használt mátrixból, a vizsgálandó molekulacsoporttól, az ionizáció polaritásától és a kívánt térbeli felbontástól (a nagyobb kristályoknál (pl. DHBA) kisebb felbontás érhető el) függően, általában CHCA-t, 2,5-DHBA-t vagy 9-AA-t használunk. Az esetek többségében a mátrixoldatok frissen, 10-25 mg/ml koncentrációban készülnek, oldószerként 0,1%-os (V/V) trifluor-ecetsav vizes oldatát és szerves fázisként acetonitrilt, acetont vagy metanolt alkalmazva. A mátrixoldat felvitele a szövetmetszetre több, akár több száz ciklusban történik, amely a homogén mátrix eloszlás mellett biztosítja a vizsgálandó vegyületek felszíni extrakcióját is.



5. ábra: Speciális ITO lemezek befogadására alkalmas MALDI mintatartó és egy fagyasztva metszett (15 μm) egér uterus minta.

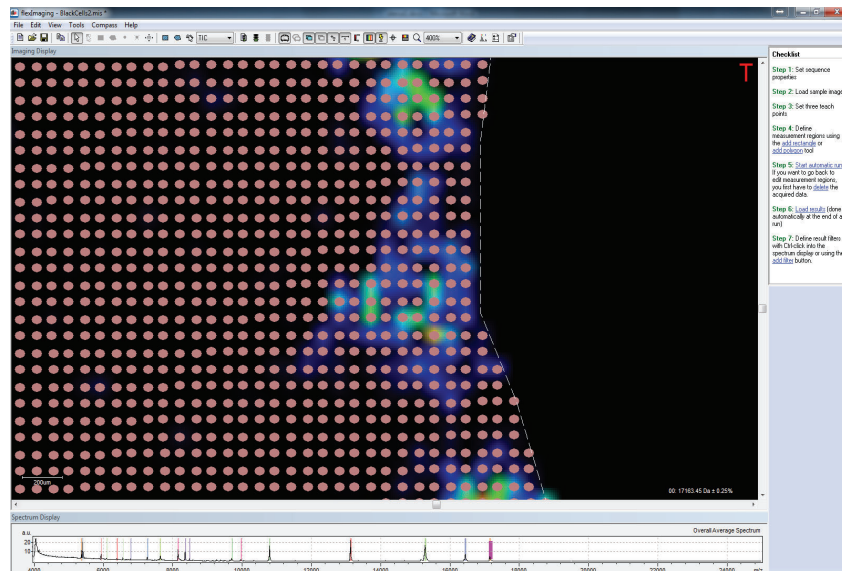
A mérési eredményeket jelentősen befolyásolja a bevonatkészítés során végbemenő extrakció, a mátrix/minta arány, valamint a kialakult kristályok mérete, szerkezete és térbeli eloszlása is. Kis térfogatú cseppeket alkalmazva magas felbontást érhetünk el, azonban a kevés oldószer jelenléte miatt alacsony hatásfokú extrakcióval megy végbe a folyamat. Nagyobb térfogat alkalmazása esetén nagyságrendekkel jobb extrakcióval és jelentősen rosszabb térbeli felbontással számolhatunk. Az alkalmazott folyadékcseppek méretének pontos szabályozhatósága tehát jelentős befolyással bír a mintaelőkészítés kimenetelére és reprodukálhatóságára.

Munkacsoportomban kifejlesztettünk egy olyan készüléket (6. ábra), amely szabályozott piezoelektromos porlasztás segítségével kiváló hatásfokkal végezte el a mátrixvegyületek homogén felvitelét a szövetminták felületére. Az általunk kidolgozott eljárás a jelenleg ismert technikákhoz képest jóval homogénebb mátrixréteg létrehozását teszi lehetővé úgy, hogy az ismert technikáktól eltérően a folyadékcseppek nem néhány száz nanométer átmérőjű kapillárisokon, perforációkon keresztül jutnak a mintára, hanem egy speciális puffertérben keletkeznek. A nagyfrekvenciás ultrahangos atomizáló által generált pár nanométer átmérőjű, a puffertérben lebegő cseppeket inert gáz (N_2) segítségével 50-100 ciklusban egyenletesen oszlatjuk el a minta felületén. A készülék képes minták temperálására is, amellyel csökkenthetőek az előkészítés során végbemenő bomlási folyamatok, valamint a hőmérséklet pontos szabályozásával nagymértékben növelhető a magképző helyek kialakulása és így a kristályosodási folyamat is tovább optimalizálható. Lehetőség van továbbá egy kiegészítő oldószertartály alkalmazásával kis mennyiségű emésztőenzim (pl. tripszin) gazdaságos felvitelére is. Ebben az esetben a temperált mintatartók lehetővé teszik az enzimatikus emésztési folyamatok lejátszódásához szükséges hőmérsékleti viszonyok (37°C) biztosítását.



6. ábra: Munkacsoportomban kifejlesztett piezoelektromos mátrixporlasztó berendezés (TissuePrep).

Amennyiben a szöveti fehérjék lokális eloszlásának meghatározása a célunk, akkor a mátrix felvitele előtt lipidmentesíteni kell a szövetmetszetet, hiszen ennek hiányában jelentős ionsuppressziós hatást tapasztalnánk [103-105]. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több tízezer tömegspektrumot veszünk fel (7. ábra), amelyeket a megfelelő szoftver az egyes m/z értékekhez tartozó intenzitások eloszlását képként jeleníti meg. A vizsgálatok alkalmasak lipidek, peptidek, fehérjék lokális eloszlásának akár 5-10 mikrométer felbontású feltérképezésére. A térbeli felbontás függ az alkalmazott lézer hullámhosszától, fókuszált méretétől és alakjától, a lézerimpulzusok kiosztásának geometriájától, a vizsgált terület nagyságától és a mátrix felvitelének technológiájától, de tipikusan 50-100 mikrométer. A nagyobb felbontás nagyságrendileg megnöveli a vizsgálat idejét és az összegzett mérési adatok méretét, így az optimális felbontás értékét az adott biológiai, klinikai kérdéshez és mintaszámhoz kell igazítani. Ne feledjük azt sem, hogy egy-egy szövetmetszet mérése során akár 150000-200000 lézerlövést is alkalmazhatunk, amely befolyásolja a lézer élettartalmát és az ionforrás tisztításának gyakoriságát.



7. ábra: A szöveti metszet mérési pontjainak (lézerfókusz-pontjainak) tipikus kiosztása az alkalmazott Bruker Autoflex Speed készülék esetében.

A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (*in-vivo* fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT-IR, Raman) képalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát. A MALDI IMS módszer kiváló lehet az új patológiás biomarkerek felfedezése során, mivel az egyes vegyületek, vegyületcsoportok lokális eloszlásának vizsgálatával azok közvetlenül köthetők az adott, gyakran nagy heterogenitással rendelkező egészséges vagy patológiás szöveti struktúrákhoz [106, 107]. Például, általa jól elkülöníthetők és meghatározhatók az egészséges, stromális vagy neoplasztikus sejtekben expresszálandó potenciális biomarker molekulák tömege, szerkezete.

A MALDI IMS vizsgálatok eredményei statisztikai szempontból is értékelhetők speciális szoftverek segítségével (pl. Bruker Daltonics ClinProTools, MATLAB). Ezek a programok normalizálás után a különböző csoportokba rendezett tömegspektrumokat összehasonlítva meghatározzák azok általános statisztikai értékeit, diszkriminációs értékeit és statisztikai próbáit. Lehetőség van egyes területekről felvett tömegspektrum-csoportok közvetlen spektrális összehasonlítására is, amely látványosan bizonyíthatja az egészséges és patológiás szövetekből kimutatott patológiás jelzőmolekulák prediktív értékét.

A tömegspektrometriás képalkotás óriási előnye, hogy a molekuláris változásokat *in-situ* a szöveti struktúrákkal együttesen tudjuk vizsgálni, azonban a minták összetételének komplexitása miatt az ionszuppressziós hatások is kiemelten jelentkezők. A mindennapi gyakorlatban a prediktív értékű molekuláris változások kvantitatív meghatározása érdekében az IMS vizsgálatokat célzott immunhisztokémiai elemzésekkel egészítjük ki.

A MALDI mellett képalkotásra bármely lézer deszorpciós technika alkalmazható, azonban ezek érzékenysége és térbeli felbontása általában elmarad a hagyományos MALDI IMS technikától. Speciális kiegészítőkkel, pl. optikai szál segítségével történő fókuszálással akár 5 mikrométer alatti térbeli felbontást is elérhetünk [108], amely fontos

mark.laszlo_314_25

információkat szolgáltat a sejtszintű metabolomikai, peptidomikai, lipidomikai és proteomikai kutatásokhoz. Az in-vivo körülmények között is alkalmazható atmoszférikus nyomáson működő módszereknél (pl. LAESI) élő sejtek molekuláris változásait pl. neurális hálózatok metabolizmusát, kommunikációját is vizsgálhatjuk [XXXI].

Speciális fluoreszcens festéket és az adott hullámhosszra optimalizált lézert alkalmazva megvalósítható, hogy a lézerlövés hatására egy fluoreszcensen megjelölt sejt vagy sejtcsoport párologjon el, így ezek molekuláris felépítése akár sejtszinten detektálható legyen [XXXII]. Ezt a technikát könnyen kombinálhatjuk a hagyományos immunhisztokémiai, fluoreszcens mikroszkópiás módszerekkel, amelyek növelik az eredmények orvosdiagnosztikai, klinikai alkalmazásának lehetőségeit.

3. Célkitűzések

A lézer abláció/deszorpció alkalmazása a molekuláris tömegspektrometriában immár fél évszázados hagyományokra tekinthet vissza, és fejlődése a mai napig töretlen. Napjainkban az analitikai kémia és főként az „omikák” kiváló, state-of-the-art műszerezettséggel vannak felvértezve, mégis gyakran szembesülünk azzal, hogy a biológiai és klinikai kérdések megválaszolása komoly nehézségekbe ütközik. A legáltalánosabb problémák a mintaelőkészítés során, illetve a magasfokú biológiai variabilitás miatt alakulhatnak ki. A MALDI és más lézeres mintabeviteli technikák többnyire kiküszöbölik a mintaelőkészítésből származó bizonytalanságokat, így a mai napig versenyképesek maradtak a rutin vizsgálatok és a fejlesztések során egyaránt. A képkalkotási tömegspektrometria egy olyan univerzális, nagy érzékenységgű és specificitású, a lokális szövettani és molekuláris heterogenitást kezelni képes módszer, amely a modern bioanalitika, biokémia és klinikai diagnosztika egyik hajtóereje lehet. Értekezésemben felvázolt munkánkat 3 fő cél köré csoportosítottam, amelyek a lézer abláció, elsősorban a MALDI tömegspektrometria alkalmazása a kismolekulatömegű vegyületek, a peptidek és fehérjék, valamint a szövetminták közvetlen vizsgálatában. Ennek megfelelően az alábbi célokat fogalmaztuk meg a két évtizedet átívelő munkánk során:

- fullerének (C_{60} , C_{70}) MALDI mátrixként való alkalmazása és a mérési körülmények optimalizálása kis molekulatömegű vegyületek vizsgálatára,
- szteroid hormonok, szintetikus szteránvázas vegyületek, polifenolok, antocianinok kémiai módosítást nem igénylő, nagy mintaáteresztőképességű tömegspektrometriás vizsgálatának kidolgozása,
- a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) tömegspektrometriás vizsgálatának kifejlesztése és a peptid jelenlétének detektálása biológiai és klinikai mintákból,
- fehérjék expressziós változásainak meghatározása PACAP hiányos (PACAP KO) egérmodellben,
- évszakos változásokat mutató (hibernációs) neuropeptidok kvalitatív és szemikvantitatív tömegspektrometriás meghatározása,
- patológiás folyamatokra (fej-nyaki tumor, oszteoszarkóma, ajak- és szájpada hasadék) jellemző potenciális biomarkerek kimutatására alkalmas módszer kidolgozása,
- a képkalkotási tömegspektrometria bevezetése és módszertani fejlesztése,
- tumorok molekuláris heterogenitásának tömegspektrometriás vizsgálata,
- a patológiás spermatogenezis lokális lipidomikai változásainak feltérképezése,
- szövetszintű molekuláris változások meghatározása a korai fázisú embriogenezis során,
- a mesterséges megtermékenyítés (IVF) hatásainak térbeli és időbeni vizsgálata az endometriális és embrionális lipid metabolizmusra,
- egy sejt (single cell) felbontású képkalkotási tömegspektrometria fejlesztése.

4. Alkalmazott készülékek és módszerek

Ebben a fejezetben az általános MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálatok részleteit ismertetem. Az egyes alfejezetekben tárgyalt konkrét analitikai feladatok specifikus mintaelőkészítést és az ott használt eszközök beállításait és vegyszereket az adott vizsgálatok leírásánál adom meg.

MALDI TOF MS

A tömegspektrométer egy Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) MALDI készülék, amelyet FlexControl 2.4 szoftverrel vezéreltünk. A műszer 337 nm-es 100 kW-os csúcsteljesítményű 2,5 ns impulzusidővel működő MNL-205MC (LTB Lasertechnik Berlin GmbH, Berlin, Németország) nitrogén lézert használ, amelynek maximális frekvenciája 50 Hz. A külső tömegkalibrációt minden esetben Bruker peptid vagy alacsony tömegű protein kalibrációs standarddal (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük el. Az adatok kiértékelését FlexAnalysis 3.0 és ClinProTools 3.0 szoftverek segítségével hajtottuk végre. A protein kereséseket MASCOT (www.matrixscience.com, Matrix Science Ltd., London, Anglia) és Bruker Protein Scape (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) szerverek segítségével hajtottuk végre.

A vizsgálatokhoz Bruker MTP 384 rozsdamentes acél mintatartót használtunk. A mintatartót a mérések előtt a gyár által kidolgozott protokoll szerint lemostuk.

MALDI TOF képalkotási tömegspektrometria

Az IMS vizsgálatokhoz egy Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) típusú MALDI TOF/TOF készüléket alkalmaztunk. A műszer 1 kHz-es frekvencia-háromszorozott SmartBeam II Nd:YAG UV lézerrel működik (Lasertechnik Berlin GmbH, Berlin, Németország), melynek paraméterei a következők, hullámhossz: 355 nm, 532 nm, 1064 nm, 808 nm, csúcsteljesítmény: 170 kW, impulzus energia: 500 μ J, impulzusidő: 3 ns, átlagos teljesítmény: 1,5W.

A külső tömegkalibrációt minden esetben Bruker peptid vagy protein kalibrációs standarddal (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük el. Az adatgyűjtési és kiértékelési folyamatokat a FlexAnalysis 3.0, FlexImaging 3.0 és FlexControl 3.4 szoftver (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) segítségével valósítottuk meg.

A vizsgálatokhoz Bruker ITO bevonatos üveglemezeket és a befogására alkalmas Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcát használtunk. Az ITO üveglemezeket egyszer használtuk. A mátrix felvitele az általunk fejlesztett piezoelektromos porlasztóberendezéssel történt (lásd 6. ábra). A metszetek szkenneléséhez egy hagyományos nagyfelbontású lapszkennert, míg a hisztológiai metszetekhez a 3DHitech professzionális metszet digitalizáló berendezését használtuk.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

Kísérleti eredményeimet három alfejezetben mutatom be. Az első a kis molekulatömegű vegyületek vizsgálataival foglalkozik, majd a peptidek és fehérjék elemzéseit ismertetem, végül a képkalkotási tömegspektrometriás eredményeinket prezentálom.

5.1. Kis molekulatömegű vegyületek MALDI vizsgálata

A lézeres abláción és ionizáción alapuló technikák, így a MALDI is kiválóan alkalmas kis molekulatömegű (<800 Da) vegyületek (low-molecular weight compound, LMWC) kimutatására, illetve szerkezetük azonosítására. Az egyszerű mintaelőkészítés és a kis mintaigény (0,5-2 mikroliter) óriási előnyt jelent, azonban az alkalmazott mátrix vegyület spektrális interferenciája és erős ionszuppresszív hatása megnehezíti az értékelhető spektrumok felvételét. Bár a 80-as évek végén a MALDI MS forradalmasította a nagy, nem illékony, termikusan labilis molekulák (például fehérjék, peptidek, oligonukleotidok és poliszacharidok) elemzését, alkalmazását kis molekulatömegű vegyületekre hosszú ideig nem megfelelőnek, sőt haszontalannak tartották. Ennek egyik fő oka a mátrixhoz kapcsolódó ionok által generált nagy háttér volt az alacsony molekulatömeg tartományban. A második ok a folyadékkromatográfiával kapcsolt elektroporlasztásos ionizáció egyidejű robbanásszerű növekedése volt, ami az LC ESI MS-t a jelenleg elérhető egyik legsokoldalúbb és legerősebb analitikai eszközzé tette. Azonban a MALDI sajátos előnyei (pl. nagy tolerancia a szennyező anyagokkal és pufferekkel szemben, egyszerű spektrumok az egyszeres töltésű ionok szinte kizárólagos megjelenése miatt, tipikus szub-femtomol érzékenység és nagy áteresztőképességű elemzés) a kapcsolódó műszerek legújabb fejlesztéseivel párosulva, megalapozta a technika alkalmazását az LMWC vizsgálatokban. Valójában a MALDI MS kis molekulákra való alkalmazása folyamatosan növekszik, ami a metabolomikai vizsgálatok iránti érdeklődés növekedésének és az IMS technikák elsöprő terjedésének köszönhető [109].

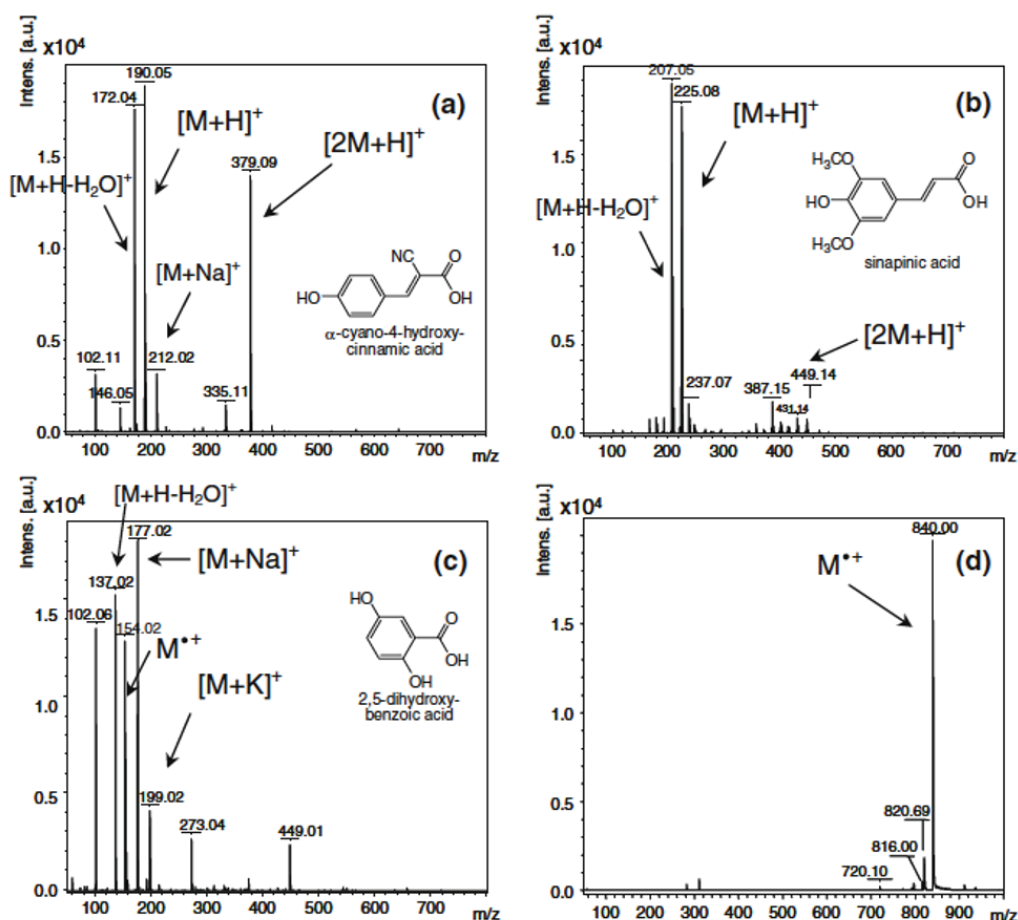
A kis molekulatömegű vegyületek vizsgálatára észszerűnek tűnik a mátrix mentes LDI használata, azonban ebben az esetben az eredményes ionizációhoz magasabb lézerfluenciára van szükség, amely erős fragmentációhoz vezethet. Szóba jöhet valamilyen felület-segített ionizációs technika alkalmazása is (pl. SALDI, SELDI, DIOS, NAPA) azonban ezek robosztussága, érzékenysége és reprodukálhatósága gyakran elmarad a MALDI MS vizsgálatok során tapasztaltakétól. Mindezeket szem előtt tartva a kis molekulatömegű vegyületek vizsgálatára többnyire MALDI TOF MS-t használtunk speciális mátrixokat (pl. fullerén) alkalmazva.

5.1.1. Mátrixok hatása

Ahogy korábban a 2.2. fejezetben ismertettem a MALDI MS sikeres alkalmazása szigorúan függ a mátrix megválasztásától. A mátrixként alkalmazott vegyületnek meg kell felelnie a specifikus követelményeknek, beleértve a minta komponenseinek beépülését a mátrix feleslegébe, a besugárzási lézer hullámhosszán történő nagy abszorpciót (elektronikus vagy vibrációs gerjesztéssel), hatékony ionizációt és szabályozott fragmentációt biztosítva. Az általánosan használt mátrixok jellemzően lineáris konjugált π -rendszereket és/vagy aromás gyűrűket tartalmaznak a fotonok UV-tartományban történő abszorpciójához, valamint savas funkciós csoportokat a minta

komponenseinek protonálásához. Általánosságban elmondható, hogy a benzoésav, a fahéjsav és a rokon aromás vegyületek származékait a fehérjék és peptidek mátrixaként használjuk [110], míg a pikolin- és borostyánkősavakat az oligonukleotidok MALDI MS analíziséhez [111].

A mátrixként használt vegyületek első generációja jellemzően 300 Da alatti kis molekulatömegű molekula, mint például a CHCA, SA, 2,5-DHBA. Az ilyen típusú mátrixok erős jelinterferenciát okoznak az m/z 600 alatti tartományban, ugyanis a lézereenergia hatására klaszterképződésre hajlamosak és sajnálatos módon ez az effektus az újabban használt 355 nm-es szilárdtest lézereknél még kifejezettebben jelentkezik. A képet még színesíti az ionklaszterek molekulaion csúcsai mellett gyakran megjelenő protonált, nátrium- és kálium-addukt ion jelek is (8. ábra).



8. ábra: Néhány általunk mátrixként alkalmazott vegyület pozitív módban rögzített MALDI TOF MS tömegspektrumja **(a)** CHCA, **(b)** SA, **(c)** 2,5-DHBA, **(d)** C_{70} fullerén [IX].

A mátrixháttér elnyomására számos adalékanyagot és speciális mátrix felviteli módot alkalmaztak [112]. Kvaterner ammónium sók, felületaktív anyagok (pl. cetil-trimetil-ammónium bromid, CTAB) használatával Guo és munkatársai bevezették a mátrix elnyomott lézereszorpciós ionizáció (matrix suppressed laser desorption/ionization, MSLDI) módszert [112]. Lin és Chen DHBA mátrix szől-gél polimerszerkezetbe való beépülése segítségével csökkentette a mátrix klaszterek megjelenését [113], míg mások

cézium- és litium-sók használatával csökkentették a mátrix ionszuppressziós hatását [114, 115].

A másik, népszerű stratégia a nagy molekulatömegű mátrix alkalmazása. Chen és munkatársai 2,3,4,5-tetrakis(3',4'-dihidroxi-fenil)-tiofén (DHPT) segítségével femtomol tartományban vizsgált aminosavakat, peptideket és B-vitamint [116]. Ugyancsak figyelemreméltó a szintetikus porfirinek alkalmazása, amelyek elég nagy molekulatömeggel rendelkeznek ahhoz, hogy biztosítsák a spektrális interferencia hiányát a kis molekulák számára. További előnyük, hogy lézerabszorpciójuk és proton affinitásuk finomhangolható a központi szerkezeten lévő oldalláncok változtatásával. Ayorinde és munkatársai először tesztelte a mezo-tetrakis(pentafluorfenil)porfirint (F 20 TPP), mint MALDI-mátrixot az alkil-fenol-etoxilátok elemzéséhez [117]. Az F 20 TPP-t számos más alkalmazásban is sikeresen alkalmazták, mint például növényi olajok zsírsavösszetételének elemzésére [118], cukrok, aszkorbinsav, citromsav és nátrium-benzoát kimutatására [119].

A szervetlen (pl. szilícium- és fémalapú) nanoanyagokat nagyrészt felületi deszorpciós ionizációs (SELDI, SALDI) technikákkal tanulmányozták. A szilícium alapú mátrixok közé tartoznak a szilícium nanooszlopok [56,120], a szilícium nanoszálak [121] és a szilícium nanopillérek [122], míg alkalmaznak arany [123-127], ezüst [128,129] szubsztrátokat vagy különböző fém-oxidokat úgy, mint titán-oxid [130-132], cink-oxid [133] és lítium-oxid [134].

A szén alapú nanorészecskék, fullerének, grafének, nanocsövek kiterjedt delokalizált elektronszerkezettel és így széles energia abszorpciós képességekkel rendelkeznek, ennek eredményeként viszonylag korán felmerült MALDI mátrixként, SALDI és SELDI felületként történő alkalmazásuk [135, 136]. Előnyös tulajdonságaikat kihasználva számos molekulacsoporton bizonyították széleskörű alkalmazhatóságát [137-139]. Korábbi fullerénekkel végzett tömegspektrometriás tapasztalataink alapján [XLI, XLV], munkacsoportomban a kis molekulatömegű vegyületek vizsgálatára fullerén (C₆₀, C₇₀) mátrixot alkalmaztunk.

5.1.2. Szteroidok vizsgálata [II, VI]

A semleges szteroid hormonokat többnyire gáz- vagy folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszerekkel elemzik [140-144]. A legtöbb szteroidvegyület azonban nem illékony, és nem tartalmaz poláris csoportokat, ami nem megfelelő kromatográfiás viselkedést és alacsony ionizációs hatékonyságot eredményez. A szteroidok származékképzése illékonyabb, hőstabilabb és polárisabb termékekkel megoldja ezt a nehézséget, de az ismeretlen kémiai csoportokat tartalmazó vegyületek reprodukálható, kvantitatív származékképzése, főként biológiai mintából nem egyszerű feladat [145].

A nemi hormonok és sok más szteroid alapvető biomolekulák az emberi és állati szervezetekben és alacsony koncentrációban erős endokrin aktivitással rendelkeznek. Szabályozzák az érést [146] és a szaporodást [147-153], és részt vesznek az immunológiai folyamatokban [154], a csontanyagcserében és oszteogenezisben [155-158]. Az etiológiai

jelentősége is ismert, mivel a szteroidok alapvető szerepet játszanak a csonttritkulás [159,160], a kardiovaszkuláris betegségek [161, 162], a prosztatarák [163-164] és az emlőrák [165-167] kialakulásában, pozitív korrelációval a vérplazma ösztrogénszintje és a daganatok és áttétek kockázata között. A hatást nem csak az intracelluláris szteroid receptorok közvetítik, hanem a membránhoz kapcsolódó szteroid receptorok is, amelyek összefüggésben állnak a növekedési faktorokkal és növekedési faktor receptorokkal [168].

A szövetekben vagy testnedvekben nagyon alacsony, nanomoláris vagy akár pikomoláris koncentrációjuk, valamint szerkezeti hasonlóságuk miatt pontos és érzékeny vizsgálati módszerek szükségesek a megbízható eredményekhez. A humán mintákat általában vérből, vizeletből vagy agy-gerincvelői folyadékból gyűjtik [169-175].

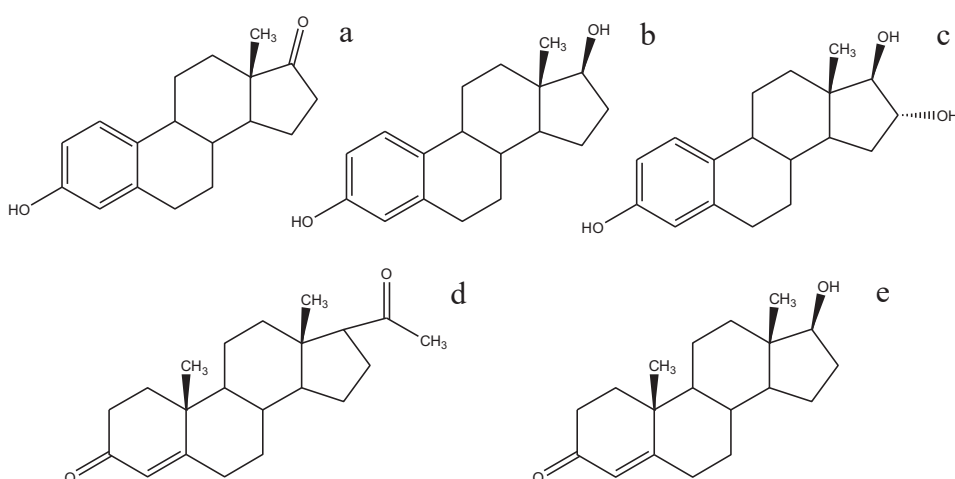
A szteroid vegyületek kimutatására korábban radioimmunoassay (RIA) technikát alkalmaztak [176], de a módszer nem minden esetben megbízható, főként újszülöttektől és csecsemőktől származó minták esetén [177-179]. Napjainkban, gázkromatográfiával vagy folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriát (GC MS/MS, LC MS/MS) és MALDI TOF MS-t alkalmaznak komplex biológiai minták szteroid összetételének vizsgálatára [180-184]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kis polaritással rendelkező szteroidoknak alacsony a hőstabilitásuk és az illékonyaságuk, így a közvetlen GC-elemzés nem kivitelezhető. Ez mellett a közvetlen MS analízis alacsony érzékenységet eredményez [185, 186], amelyet a szteroidok szerkezetében lévő savas vagy bázikus csoportok hiánya generál [187]. A probléma származékképzéssel oldható meg, melynek során a semleges szteroid vegyületeket illékonyabb és stabilabb termékekkel alakítják, egyben poláris funkciós csoportokkal módosítva, amelyek hatékonyabb ionizációt tesznek lehetővé [188]. A különféle származékképző reagensek széles skálája használatos, és több protokollt is kidolgoztak kifejezetten a különböző típusú kémiai csoportokkal rendelkező szteroidokra [189-193]. A MALDI TOF MS vizsgálatoknál a derivatizáló reagensek alkalmazása további előnyt jelent, mivel a szteroid vegyületek molekulatömege az általánosan használt mátrix anyagokéval azonos tartományban van, így a derivatizálószer tömegének hozzáadásával a kérdéses ion egy másik tömegtartományba kerül, ahol a mátrixcsúcsok már nem zavarják. Ugyanakkor a derivatizálás hátránya a különböző szteroid vegyületekre univerzálisan használható derivatizálószer hiánya, illetve a reakció csekély reprodukálhatósága biológiai mintákban [194-197].

Nagy érzékenységgű, a szteroid vegyületek kémiai átalakítását nem igénylő MALDI TOF MS módszert dolgoztunk ki C₇₀ fullerén mátrix alkalmazásával. A kísérletek kezdetén klasszikus MALDI mátrixként alkalmaztuk a fulleréneket szerves oldószerben oldódó vegyületek vizsgálatára. Ilyenkor toluolos C₆₀ vagy C₇₀ oldatot azonos térfogatú (10-10 µl) szerves apoláris oldószerben oldott mintával kevertünk össze, majd az elegy 2 µl-ét fokozatosan a rozsdamentes mintatartó tálcára cseppentettük. Ilyenkor a mintafelvitelnél igen körültekintően kellett eljárni, mivel a szerves oldószerek csekély viszkozitása miatt az oldatok elterültek a rozsdamentes mintatartó felületén, amely könnyen kontaminációt, a minták keveredését eredményezhette. Tapasztalataink alapján eredményesebbnek bizonyult a fullerén oldat előzetes rászárítása a mintatartóra, majd az oldószer elpárolgása

után keletkező nanokristályos vékony fullerén filmrétegre vittük fel a mintákat. Az eljárás előnye, hogy a polárisabb minták akár vizes oldatokból is mérhetők voltak, illetve a keresztszennyeződés kockázata a minimálisra csökkent. További előnyt jelentett, hogy a mátrix/minta arány optimalizálható volt úgy, hogy a beszáradt minta felületére újabb fullerén réteget szárítottunk. Ilyen „szendvics” technikát alkalmaztunk számos olyan esetben, amikor egyébként a fragmentáció jelentősnek bizonyult (lásd. 5.1.3. alfejezet, antocianinok, polifenolok). A leírtak alapján a kifejlesztett módszer közelebb áll a nanorészecske- vagy felület-segített lézerdeszorpció/ionizációs technikák egyikéhez (pl. SALDI, SELDI).

Munkánk során, szilárd C_{70} fullerén (gold grade, Hoechst) felhasználásával toluolban 23°C -on telített oldatot készítettünk, amelyet vékony filmréteggént szárítottunk rá a rozsdamentes mintatartó tálcára. Az oldószer elpárolgása után a szilárd fullerén bevonatra pipettáztunk a mérendő oldatokból és azok beszáradása után végeztük el a méréseket. A módszert öt általános nemi szteroid hormonon: ösztрон (1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one), β -ösztadiol (3,17 β , -dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene), ösztriol (1,3,5(10)-estratriene-3,16 α , 17 β -triol), tesztoszteron (17 β -hydroxy-3-oxo-4-androstene) és progeszteron (4-pregnene-3,20-dione) (9. ábra), szintetikus szteroidvegyületeken, valamint terhes egyéntől gyűjtött vizeletmintán teszteltük [II].

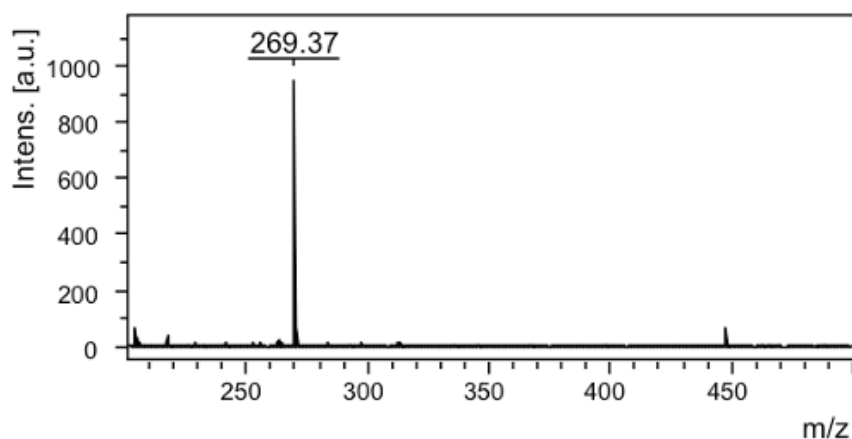
A szteroid hormon standardokból (Sigma-Aldrich) 0,1 mg-ot mértünk be, amit 1 ml metanolban oldottunk, majd a viszkozitás növelése érdekében az elegyhez 0,2 ml Milli-Q vizet adagoltunk. A referencia oldatok 1-1 μl -ét cseppentettük fel a mintatartón előzetesen kialakított szilárd C_{70} fullerén réteg tetejére, majd negatív és pozitív ionizációs módban is felvettük a reflektrom detektor segítségével detektált spektrumokat. Eredményeink jól reprezentálják, hogy a mátrixként alkalmazott C_{70} fullerén kellően elősegítette a nitrogénlaser energiájának abszorpcióját és meggátolta a szteroid vegyületek fragmentációját. A C_{70} molekulatömege (840,77 Da) kívül esett a mért tartományon, nem okozott sem jel interferenciát sem zajnövekedést a mérések során.



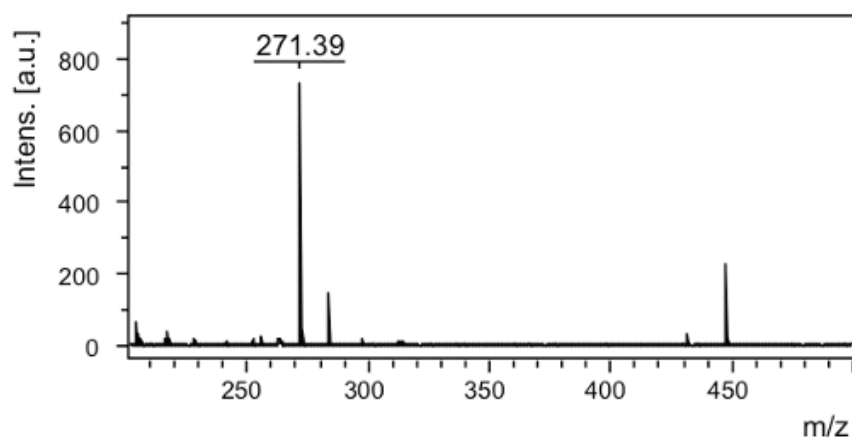
9. ábra: A vizsgált nemi hormonok kémiai szerkezete (a) ösztрон, (b) β -ösztadiol, (c) ösztriol, (d) progeszteron, (e) tesztoszteron.

mark.laszlo_314_25

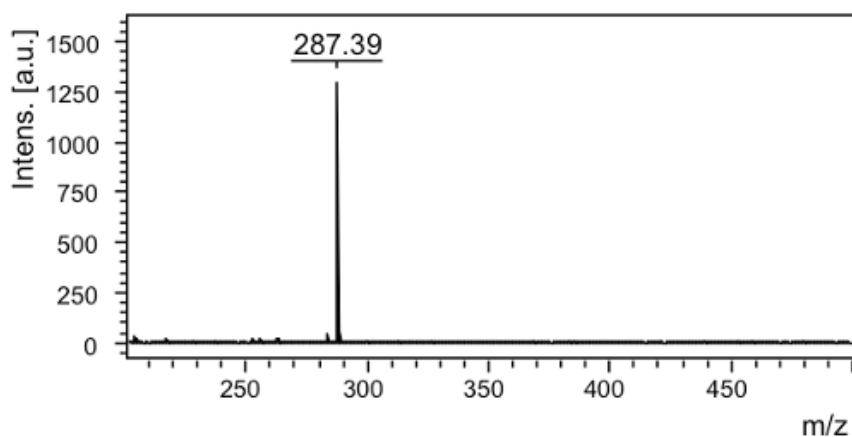
Az ösztрон, β -ösztradiol és ösztриol negatív módban, míg a progeszteron és tesztoszteron pozitív ionizációs módban mutatott jobb eredményeket. A vizsgálatok reprezentatív tömegspektrumjait a 10-14. ábrák szemléltetik, amelyek minden esetben 500-500 egyedi lézerpulzus (50 Hz) összesített eredményét mutatják. Az E1, E2 és E3 negatív módban deprotonált kvázimolekulaionként $[M-H]^-$, rendre m/z 269,37, m/z 271,39 és m/z 287,39, míg a tesztoszteron (m/z 289,19) és progeszteron (m/z 315,21) pozitív módban protonált kvázimolekulaionként $[M+H]^+$ volt detektálható.



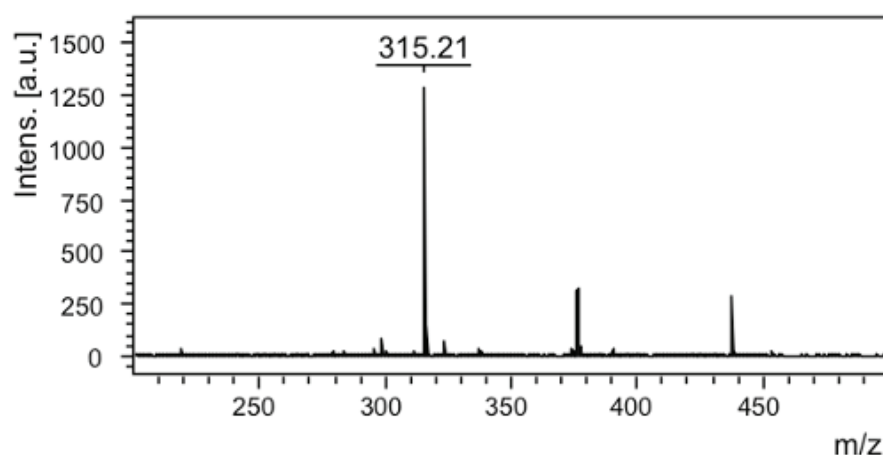
10. ábra: Az ösztрон referencia oldat C_{70} mátrix alkalmazásával negatív ionizációs módban készített MALDI TOF MS tömegspektruma.



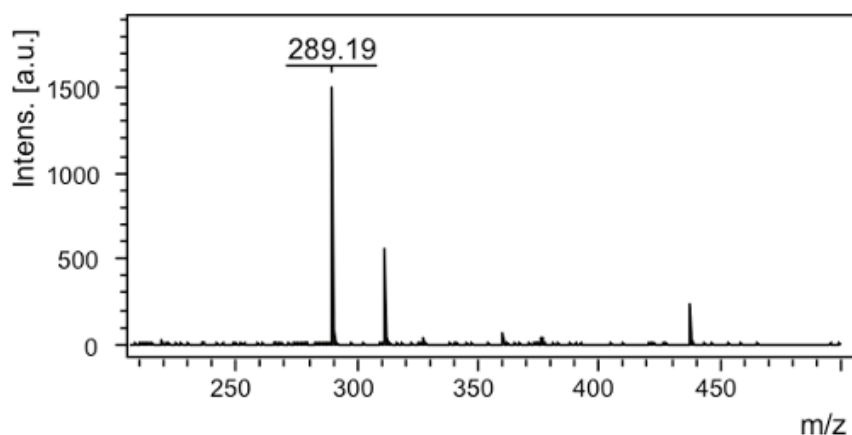
11. ábra: Az β -ösztradiol referencia oldat C_{70} mátrix alkalmazásával negatív ionizációs módban készített MALDI TOF MS tömegspektruma.



12. ábra: Az ösztriol referencia oldat C_{70} mátrix alkalmazásával negatív ionizációs módban készített MALDI TOF MS tömegspektruma.



13. ábra: A progeszteron referencia oldat C_{70} mátrix alkalmazásával pozitív ionizációs módban készített MALDI TOF MS tömegspektruma.



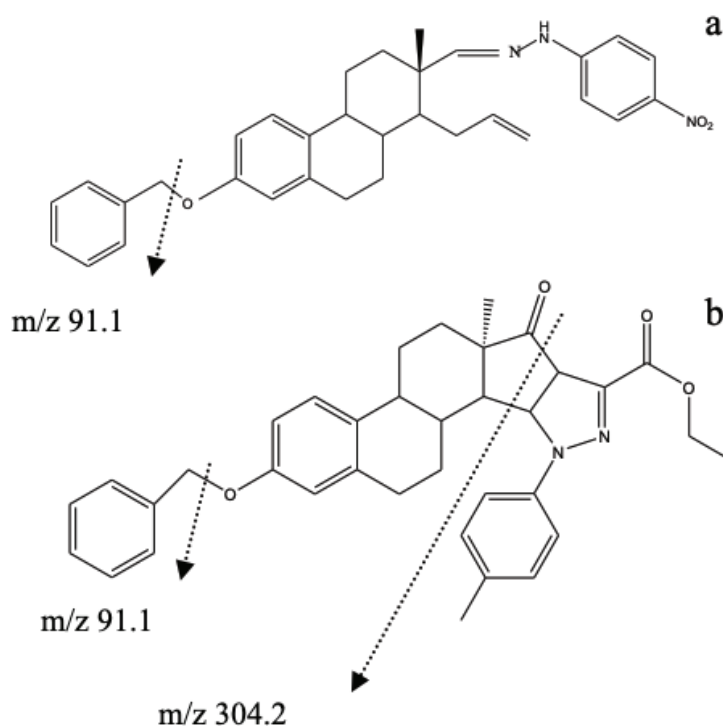
14. ábra: A tesztoszteron referencia oldat C_{70} mátrix alkalmazásával pozitív ionizációs módban készített MALDI TOF MS tömegspektruma.

A referencia oldatok MALDI TOF MS vizsgálataiból láthatjuk, hogy a C_{70} fullerén mátrix mindkét ionizációs módban hatékonyan bizonyult kémiaiilag nem módosított szteroid hormonok esetében. A kifejlesztett analitikai módszer segítségével az egyes nemi hormonokra vonatkozó kimutatási határokat a 3. táblázat összesíti. A szakirodalmi

adatokkal jól korrelálva az illékony oldószerrel, vékony rétegben felvitt nanokristályos fullerén réteg javította a módszer érzékenységét és az ionizációs hatásfokot [198]. Az eljárás teljesítőképességét és tényleges alkalmazhatóságát számos szintetikus szteroidszármazék és biológiai minta segítségével teszteltük [II, VI, XLIX, L, LI, LIX].

3. táblázat: A C_{70} mátrix jelenlétében elvégzett MALDI TOF MS vizsgálatok eredményei a detektált és elméleti (zárójelben) monoizotópos tömegek és kimutatási határok tekintetében.

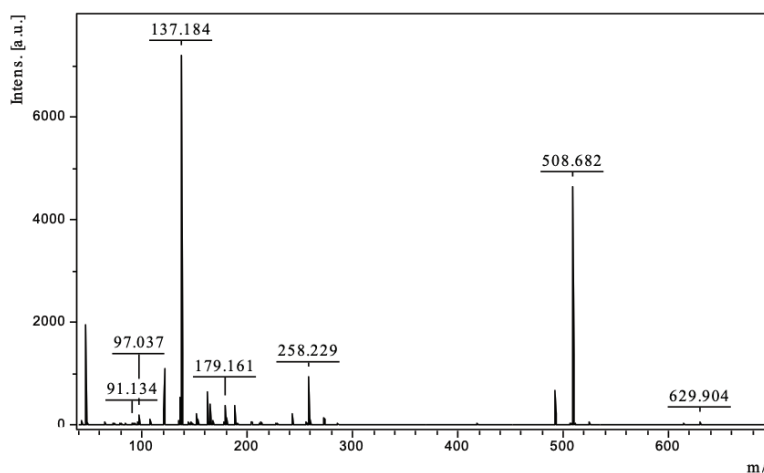
	monoizotópos tömeg (Da)	kimutatási határ („on plate” ng)	kimutatási határ („on plate” pmol)
öszttron $C_{18}H_{22}O_2$	269,37 (270,37)	20	74
β -öszttradiol $C_{18}H_{24}O_2$	271,39 (272,39)	11	39
öszttriol $C_{18}H_{24}O_3$	287,39 (288,39)	14	49
progeszteron $C_{21}H_{30}O_2$	315,21 (314,46)	12	38
tesztoszteron $C_{19}H_{28}O_2$	289,19 (288,43)	14	49



15. ábra: Eltérő csoportokkal módosított szintetikus szteroid konjugátumok kémiai szerkezete és néhány jellemző fragmens tömege **(a)** F-506 szteroid szekohidrazon (monoizotópos tömeg: 509,68 Da), **(b)** KE-47F heterociklusos ösztromszármazék (monoizotópos tömeg: 562,43 Da).

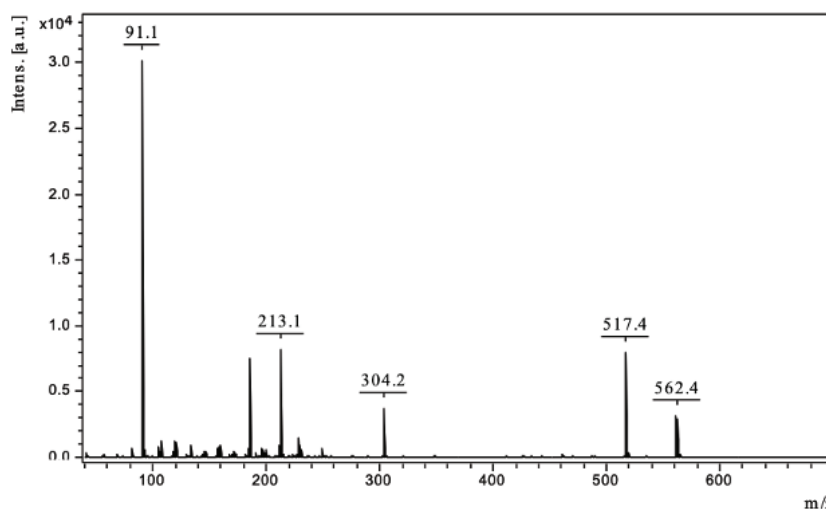
A szintetizált szteroid konjugátumok Szegeden, Wölfling professzor úr munkacsoportjában készültek. A sikeres együttműködés során az általuk előállított

vegyületek molekulatömege mellett azok fragmentációs profilját és így szerkezetét is módunkban állt meghatározni az új eljárás segítségével, jól kiegészítve az NMR mérések adatait. A MALDI nagy áteresztőképességének és a szokásos GC/LC MS mintaelőkészítés elhagyásának köszönhetően látványosan leegyszerűsödött és meggyorsult a minták analízise, szerkezetigazolása, amelynek eredményeként 5 közös publikáció és számos konferencia előadás született [II, XLIX, L, LI, LIX]. A 15. ábra két eltérő szerkezetű és ionizációs tulajdonságú szteroidszármazék kémiai szerkezetét mutatja be. Az F-506 kódjelű szteroid szekohidrazon detektálása negatív ionizációs módban volt hatékony az m/z 508,68 deprotonált kvázimolekulaion $[M-H]^-$ formájában. A keletkező fragementumok közül a legjelentősebb az m/z 137,18 értéknél megfigyelhető hidrazon csoportot képviseli (16. ábra)



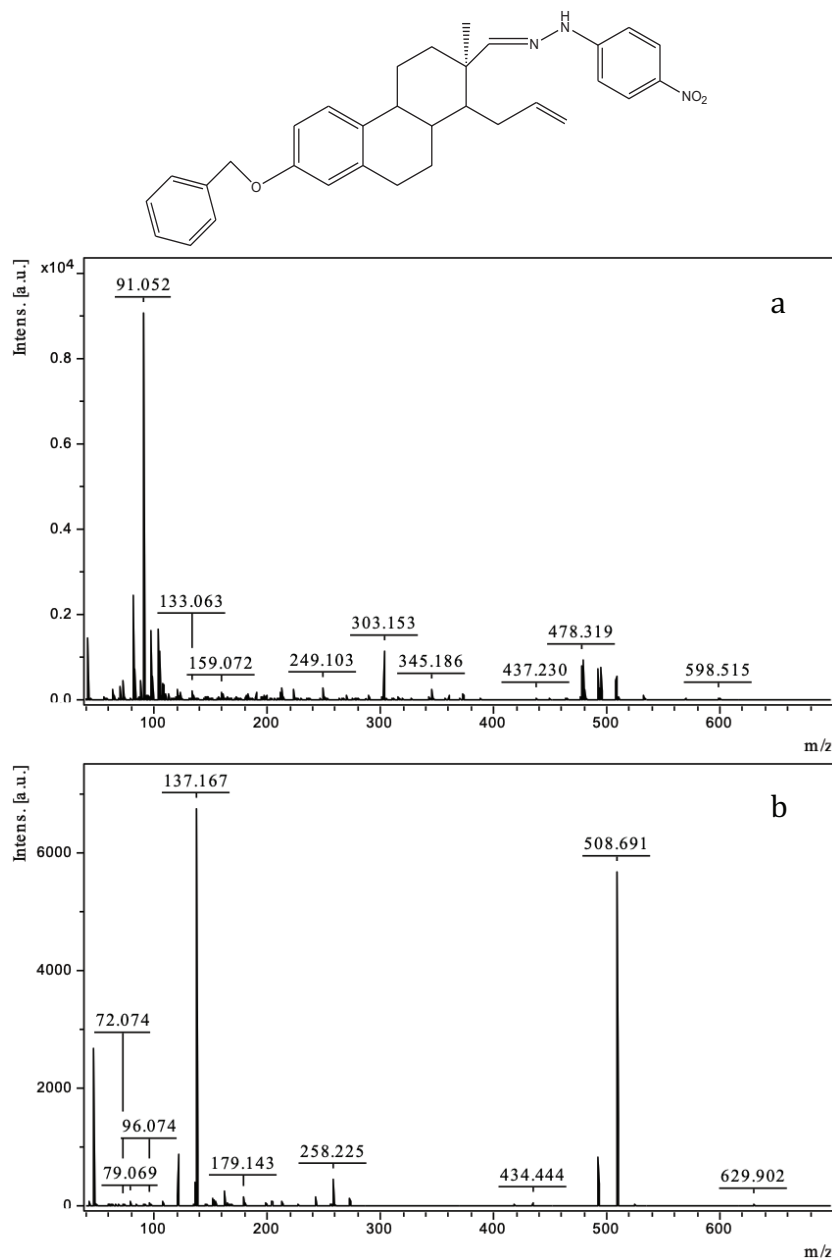
16. ábra: Az F-506 kódjelű szteroidszármazék negatív módban, C_{70} mátrix jelenlétében felvett MALDI TOF MS tömegspektruma.

A KE-47F jelű heterociklusos ösztrogénszármazék tömegspektrumát pozitív módban vettük fel, ahol az $[M]^+$ molekulaion (m/z 562,4) mellett több fragement, így a benzilcation (m/z 91,1) és az m/z 304,2-nél jelentkező hasadási termék volt detektálható (17. ábra) [199].



17. ábra: Az KE-47F kódjelű szteroidszármazék pozitív módban, C_{70} mátrix jelenlétében felvett MALDI TOF MS tömegspektruma.

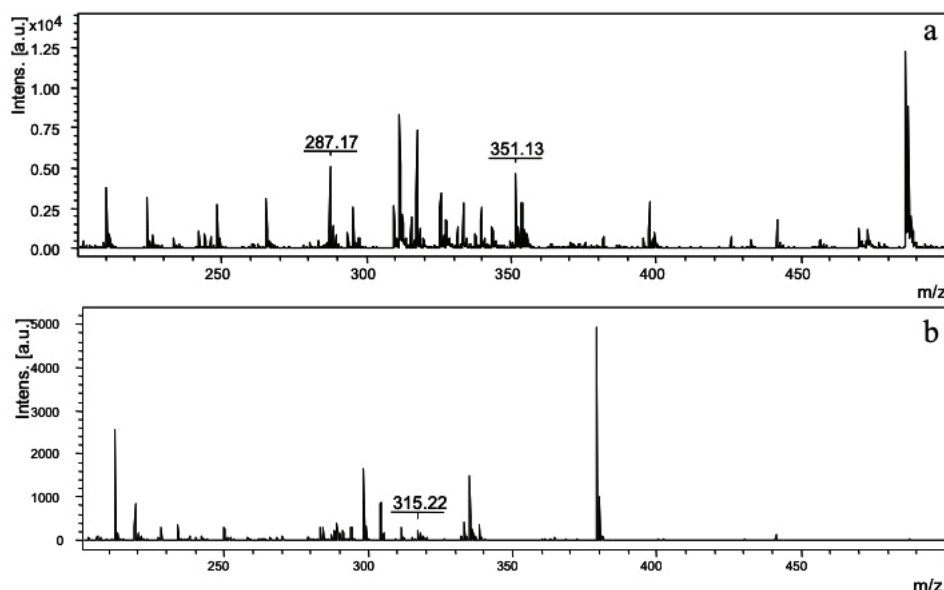
Számos további Szegeden szintetizált szteroidális termék molekulatömeg-igazolását és szerkezetazonosítását végeztük el a kifejlesztett módszer segítségével, bizonyítva annak széleskörű alkalmazhatóságát [XLIX, L, LI, LIX]. Ezek közé tartozott az EM-660 kódjelű szteroid hidrazon származék (molekulatömeg: 509,64 Da), amelynek szerkezeti képletét és pozitív, illetve negatív módban felvett spektrumját a 18. ábrán mutatom be.



18. ábra: Az EM-660 kódjelű szteroidszármazék szerkezeti felépítése és C_{70} mátrix segítségével készített MALDI TOF MS spektruma **(a)** pozitív és **(b)** negatív ionizációs módban.

A C_{70} MALDI mátrix alkalmazásának biológiai és klinikai alkalmazhatóságának lehetőségeit harmadik trimeszterben lévő 29 éves várandós nő vizeletmintáján teszteltük. A hormon kivonást folyadék-folyadék extrakcióval végeztük. Először a mintát 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 4°C -on 20 percig. A felülúszóból 1 ml-t háromszor extraháltunk 1 ml diklór-metánnal. Az oldószert vákuumban elpárologtattuk,

és a maradékot 10 µl acetonitril/víz (9:1) térfogatarányú elegyében újra feloldottuk. A vizsgálatokat negatív és pozitív módban is elvégeztük, az eredményeket a 19. ábra reprezentálja. Negatív ionizációs módban szabad ösztriolt (m/z 287,17) és ösztradiol-szulfát konjugátumot (m/z 351,13), míg pozitív módban szabad progeszteront (m/z 315,22) detektáltunk. A terhesség folyamán a feto-placentális egység nagy mennyiségben termel női nemi hormonokat, amelyek megjelennek az anyai vérben, vizeletben is. Jól ismert, hogy a vizeletben a nemi hormonok többnyire glükuronid és szulfát konjugátumok formájában vannak jelen, de alacsony koncentrációban megjelennek a szabad formák is [200, 201].

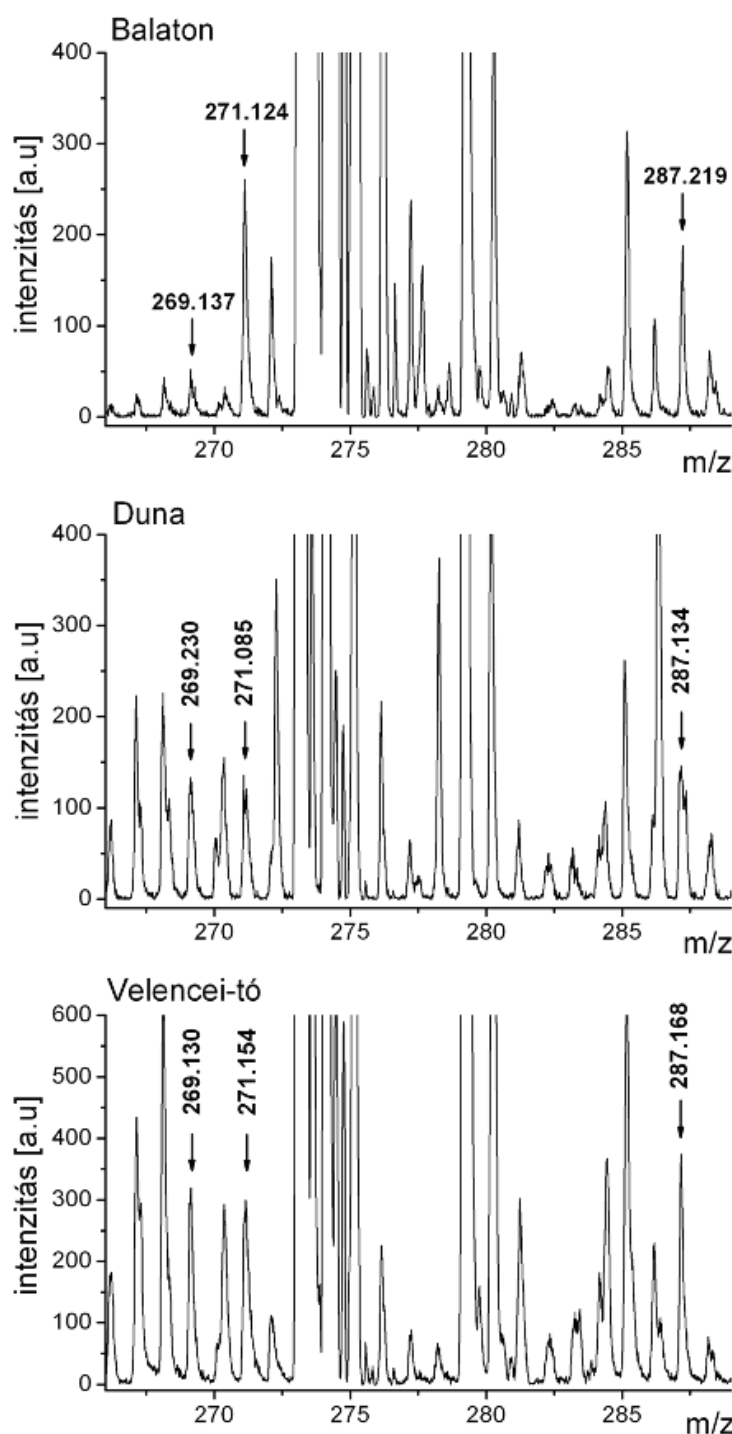


19. ábra: Harmadik trimeszterben járó terhes nő vizeletének C_{70} fullerén mátrix segítségével készített MALDI TOF MS spektruma **(a)** negatív, **(b)** pozitív ionizációs módban. Szabad ösztriol m/z 287,17, ösztradiol-szulfát m/z 351,13, szabad progeszteron m/z 315,22.

A HUN-REN Balatoni Limnológiai Kutatóintézetével (korábban MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany) együttműködve a környezetünket érintő, elsősorban a felszíni vizeinkben megtalálható szteránvázas gyógyszermaradványok kimutatására használtuk a C_{70} fullerén-segített lézer deszorpció/ionizációs módszert [VI].

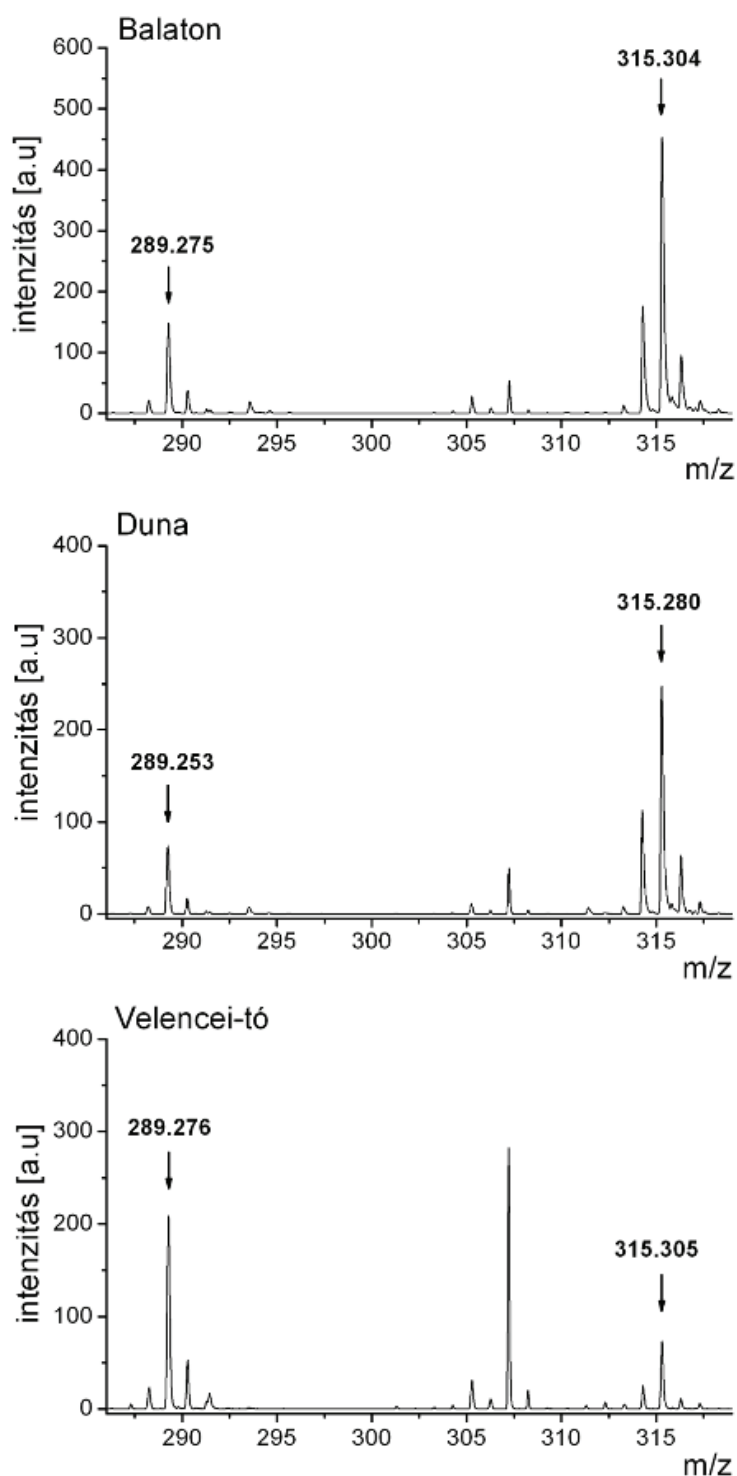
A vízmintákat 100 ml-es üvegedényekbe a Balatonból (Tihany), a Dunából (Budapest, Vigadó-tér) és a Velencei-tóból (Agárd) gyűjtöttük, 2009. áprilisában. A mintákat a felhasználásig 4°C-on tároltuk, majd a felhasználás előtt 10 percig 13000 g-n 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk (80 ml), majd azt vákuumban bepárooltuk és vizsgálat előtt a mintákat 1 ml steril bidesztvízben visszaoldottuk.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy mindhárom víztest hormonális szennyezettsége kimutatható. A MALDI-t kiegészítő kvantitatív LC MS vizsgálatok bizonyították, hogy a Velencei tónak a legnagyobb és a Dunának a legkisebb az ösztrogén típusú hormonterheltsége. Kvantitatív eredményeink jó egyezést mutatnak a szakirodalomban publikált eredményekkel [201, 202].



20. ábra: Ösztrogén hormonok C_{70} segített MALDI TOF MS vizsgálata (negatív mód) a Balaton, Duna és Velencei-tó vizéből (ösztroon: m/z 269, β -ösztradiol: m/z 271, ösztriol: m/z 287).

Ugyanakkor, a Balaton és a Duna esetében elmondható, hogy az ösztrogén típusú hormonok közül az ösztroon van legkisebb arányban, míg az β -ösztradiol, mint a női fogamzásgátlók egyik bomlásterméke, a legnagyobb mennyiségben (20. ábra). Értéke a Balatonban kiemelkedő. Vizsgálataink alapján az is megfigyelhető, hogy a Balatonban és a Dunában közel azonos arányban van a progeszteron és a tesztoszteron hormonszennyezés (21. ábra).



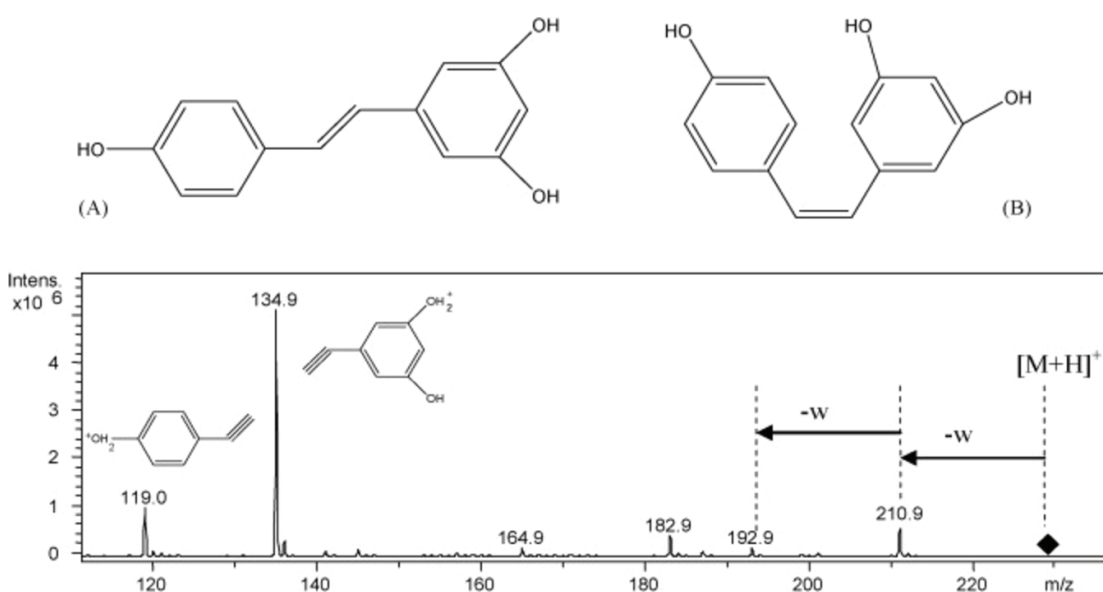
21. ábra: Progeszteron és tesztoszteron C_{70} segített MALDI TOF MS vizsgálata (pozitív mód) a Balaton, Duna és Velencei-tó vizéből (tesztoszteron: m/z 289, progeszteron: m/z 315).

Mindkét víztestben a progeszteron aránya a nagyobb, ez részben magyarázható azzal, hogy ezt a hormont mind a nők, mind a férfiak termelik és a vizelettel ürítik. Érdekes módon ez az arány a Velencei-tó esetében fordított volt. A MALDI TOF MS méréseinkben kontrollként gleccservíz (3200 m, Kaprun, Ausztria) használtunk, aminek szteroid hormon szintje detektálási határ alatt volt.

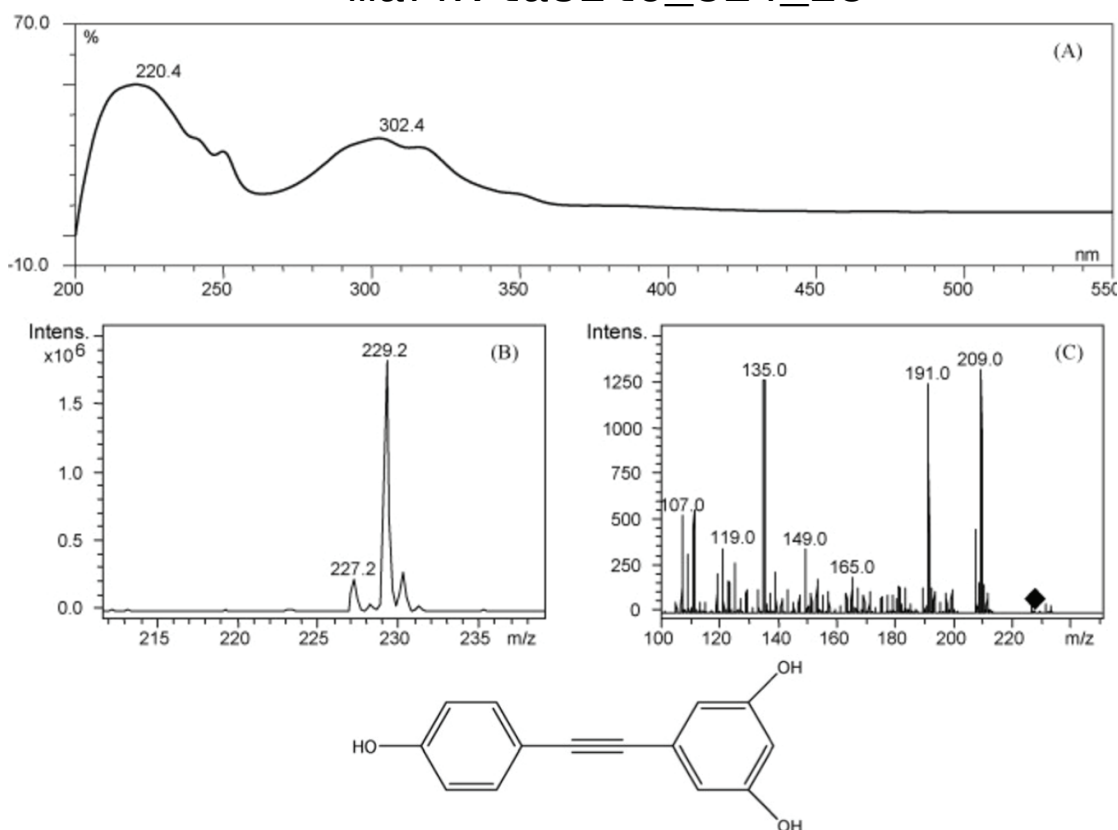
5.1.3. Fitoösztrogének, polifenolok, antocianinok vizsgálata [I, IX, XVII]

Munkacsoportomban 2003-ban kezdtem el, az elsősorban villányi régióból származó vörösborkok kémiai vizsgálatait a bennük található polifenolok kvalitatív és kvantitatív analízise céljából. Széleskörűen alkalmazható, minimális mintaelőkészítéssel alkalmazható, nagyérzékenységű HPLC, majd LC ESI/APCI MS és MALDI TOF MS módszereket fejlesztettünk ki. Az eltelt évek alatt elemzéseinket kiterjesztettük a tokaji, egri, szekszárdi borvidékekre, illetve nemzetközi együttműködésként macedoniai borokra. Mindezek mellett vizsgáltuk az egyes komponensek (pl. *transz*-rezveratrol, ferulsav, malvidin, kávésav), a vörösborkok és alkoholmentesített borkivonatok élettani hatásait sejtes, állatmodell és klinikai kísérletekben. Eredményeink igazolták a polifenolok pozitív élettani hatásait szívinfarktust követő patológiás elváltozásokban (pl. hipertrófia, kollagénrost lerakódás), oxidatív stresszben és inzulin rezisztenciában [LII, LIII]. A hosszútávú gyümölcsöző kapcsolatnak számos tudományos és ipari eredménye született a két évtized során [IX, XVII, XLII, XLIII, XLVII, LIV].

Folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás vizsgálataink segítségével elsőként azonosítottunk egy új rezveratrol származékot (3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén, TDPA) [I], amely a *transz*-rezveratrol UV izomerizációjakor a *cisz*-rezveratrol mellett jön létre (22. és 23. ábrák).



22. ábra: A *transz*- és a *cisz*-rezveratrol szerkezeti képlete (A) és APCI MS/MS fragmentációs profilja (B) [I].



23. ábra: A *transz*-rezveratrol UV izomerizálása során keletkező származék (3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén, TDPA) UV-Vis spektrumja (A), APCI MS (B) és MS/MS (C) spektrumja.

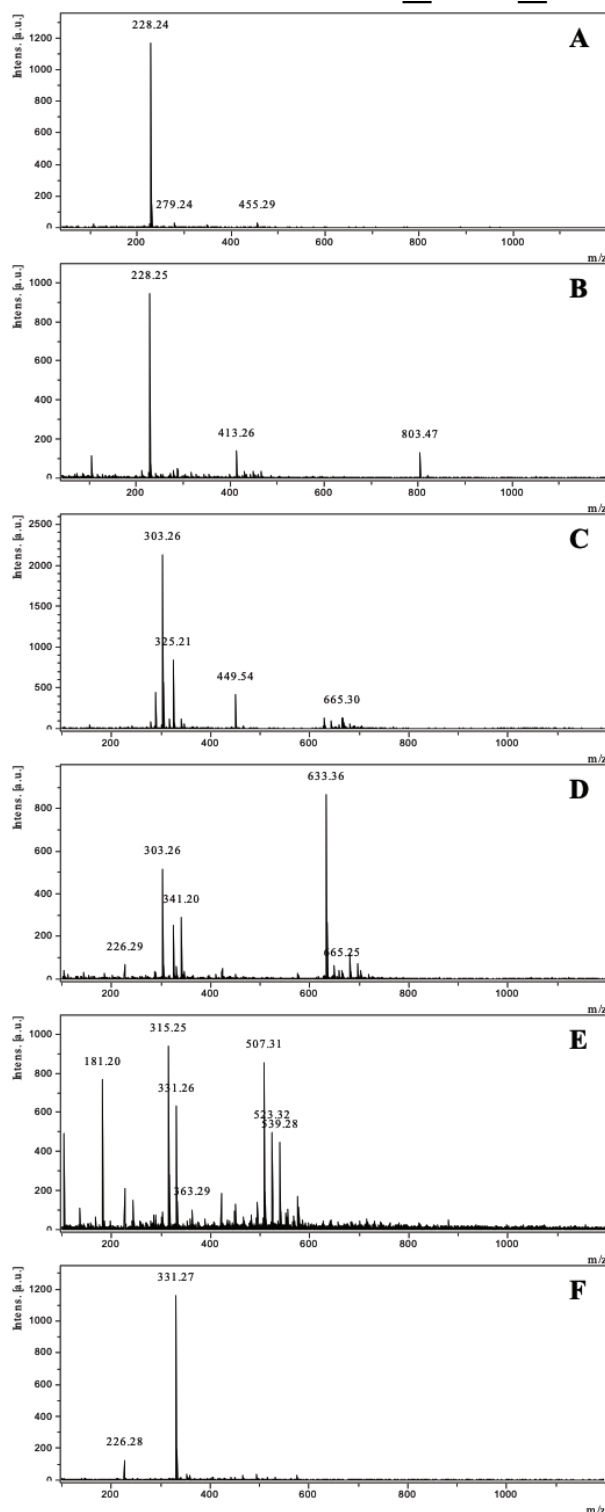
A polifenolos vegyületek a természetben előforduló másodlagos növényi anyagcseretermékek, amelyek a szőlő bogyóiban, leveleiben, magvaiban és növényi szöveteiben találhatók, és az UV- és mikrobiális stressz hatására szintetizálódnak [204, 205]. Az egyszerű fenolos vegyületek egy aromás gyűrűt tartalmaznak, ezek a mono-, di- és trifenolok, mint például a galluszsav, a kávéssav, a ferulasav, míg az összetettebb polifenolok két vagy több aromás gyűrűt tartalmaznak, mint a rezveratrol, a flavonolok és az antocianinok [206]. A növényekben betöltött biológiai funkciójuk mellett a fenolos anyagok hozzájárulnak a gyümölcsök és az azokból készült termékek, például a bor színéhez, ízéhez és táplálkozási tulajdonságaihoz [207, 208]. A fenolos vegyületek az emberi táplálkozás alapvető összetevői is, amelyek döntő szerepet játszanak egyes betegségek megelőzésében. Az emberi szervezetbe nagyrészt élelmiszerekkel, táplálék kiegészítőkkel kerülhetnek be, szerepük itt is sokrétű, epidemiológia jelentőségük nehezen vitatható. Csökkentik a vérlemezke aggregációt, jelátviteli folyamatokon keresztül hatnak az apoptózisra és a proliferációra [209], antioxidáns [210] és antikarcinogén [211] hatással rendelkeznek, valamint kardioprotektív szerepük is bizonyított [212, XLII]. Ez utóbbi tulajdonság különösen figyelemreméltó a WHO halálozási statisztikáinak ismeretében, ugyanis napjainkban a szív és érrendszeri megbetegedések szerepelnek vezető halállokként a fejlett országokban, a halálozások egyharmadát okozva.

Az elmúlt évtizedekben számos módszert fejlesztettek ki a polifenolok elemzésére. A leggyakrabban használt technikák a folyadékkromatográfia és az elektroporlasztásos, illetve az atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) tömegspektrometria, de folyamatos áramlású gyors atombombázásos (continuous-flow fast atom bombardment, CF FAB) és újabban MALDI TOF MS módszert is alkalmaztak [206, 213-221, I, XLII, XLIII].

Munkánk során megvizsgáltuk a mátrix mentes LDI alkalmazásának lehetőségét a vörösbör polifenolok detektálására és PSD fragmentációjára, valamint teszteltük a hagyományos mátrixok (CHCA, SA, 2,5-DHBA, THAP) és a C₇₀ fullerén-segített lézerdeszorpció/ionizáció alkalmazását.

Az LDI módszer segítségével vizsgált polifenolok a *transz*-rezveratrol, kvercetin-dihidrát, rutin-trihidrát, piceid, malvidin-klorid, malvidin-3-galaktozid-klorid voltak. A standard oldatok előállításához metanolt és frissen bidesztillált vizet használtunk. Az oldatok készítésénél 0,2 mg polifenol standardhoz 200 µl metanolt, majd 200 µl vizet adtunk. A mintákat a vizsgálatig 4°C-on tároltuk. A standard oldatokból és a bormintákból 1-1 µl-t cseppentettünk egy polírozott rozsdamentes acél mintatartóra. A kristályosítás után 1 µl 0,1%-os (V/V) trifluorecetsav oldatot adtunk a mintákhoz, amelyet 30 másodperc múlva eltávolítottunk. Az ionokat késleltetett extrakciós körülmények között (80 ns) gyorsítottuk pozitív ion módban, 17,05 kV gyorsítófeszültséggel és 20,00 kV reflektorfeszültséggel. A mért vegyületek fragmentálására a forrás utáni bomlást (post source decay, PSD) alkalmaztuk. A tömegspektrometriás vizsgálatoknál a célvegyületről, mint prekursor ionról 150, míg a TOF/TOF MS analíziseknél a fragmensek esetében 500 egyedi lézerimpulzust összesítettünk. Minden mérést pozitív ion módban, azonos körülmények között végeztünk. A *transz*-rezveratrol LDI MS spektrumát a 24.A ábra mutatja. Ez a vegyület tudott a leghatékonyabban ionizálódni mátrix mentes lézer ablációs körülmények között. A molekulaiont $[M]^+$ m/z 228,24-nél, míg a dimerjét m/z 455,3-nél detektáltuk. A *transz*-piceid esetében ugyancsak az m/z 228,25 értéknél detektáltuk a legintenzívebb csúcsot, ami egy glükóz egység elvesztésének $[M-Glu]^+$ felel meg, ami egy *transz*-rezveratrol molekulaiont eredményez. Az m/z 803,47-nél lévő csúcsot a *piceid* dimerjének nátriummal képződő adduktja $[M+M+Na]^+$, míg a m/z 413,25-nél lévő csúcs valószínűleg magának a *transz*-piceid nátriummal képzett kvázimolekulaionjának felel meg $[M+Na]^+$ (24.B ábra). A kvercetin-dihidrát hatékonyan ionizálódott egy kvercetin-kvázimolekulaionná két víz molekula elvesztésével $[M+H-2H_2O]^+$ m/z 303,26-nél és egy kvázimolekulaionná, amely nátriummal $[M-2H_2O+Na]^+$ m/z 325,21-nél képzett adduktot. A két másik detektált érték az m/z 449,54 és 665,3, a kvercetin standard rutin-szenyeződésének fragmentumainak felelhet meg, mivel mindkettő jelen van a rutin MS-spektrumában, bár kevésbé intenzív (24.C ábra).

A rutin-trihidrát detektálható volt vízvesztéses nátriumion adduktként $[M-3H_2O+Na]^+$ az m/z 633,36 értéknél. A 303,26 m/z -nél detektált fragmentumot a kvercetin protonált kvázimolekula $[M+H]^+$ ionjaként határoztuk meg, amely a rutin molekulából a két glükóz egység elvesztése után jelenik meg (24.D ábra)



24. ábra: Pozitív módban elvégzett LDI MS vizsgálatok spektrumjai a vizsgált polifenolok vonatkozásában. **(A)** *transz*-rezveratrol, **(B)** piceid, **(C)** kvercetin-dihidrát, **(D)** rutin-trihidrát, **(E)** malvidin-klorid, **(F)** malvidin-galaktozid-klorid.

A malvidin-klorid m/z 331,27-nél megfigyelhető csúcsa az egyik klorid $[M-Cl]^+$ elvesztésének köszönhető. A további jelentős csúcsok figyelhetők meg az m/z 315,26, az m/z 181,2 és az m/z 507,31 és 539,29 között. Feltételezzük, hogy ez a klaszter a malvidin di- tri- vagy polimerjeinek fragmentációiból származik (24.E ábra).

A malvidin-galaktozid-klorid MS-analízise során a legintenzívebb csúcs a malvidinhez hasonlóan m/z 331,27-nél mutatkozott, ami a $[M-Glu-Cl]^+$ ionnak felel meg (24.F ábra).

mark.laszlo_314_25

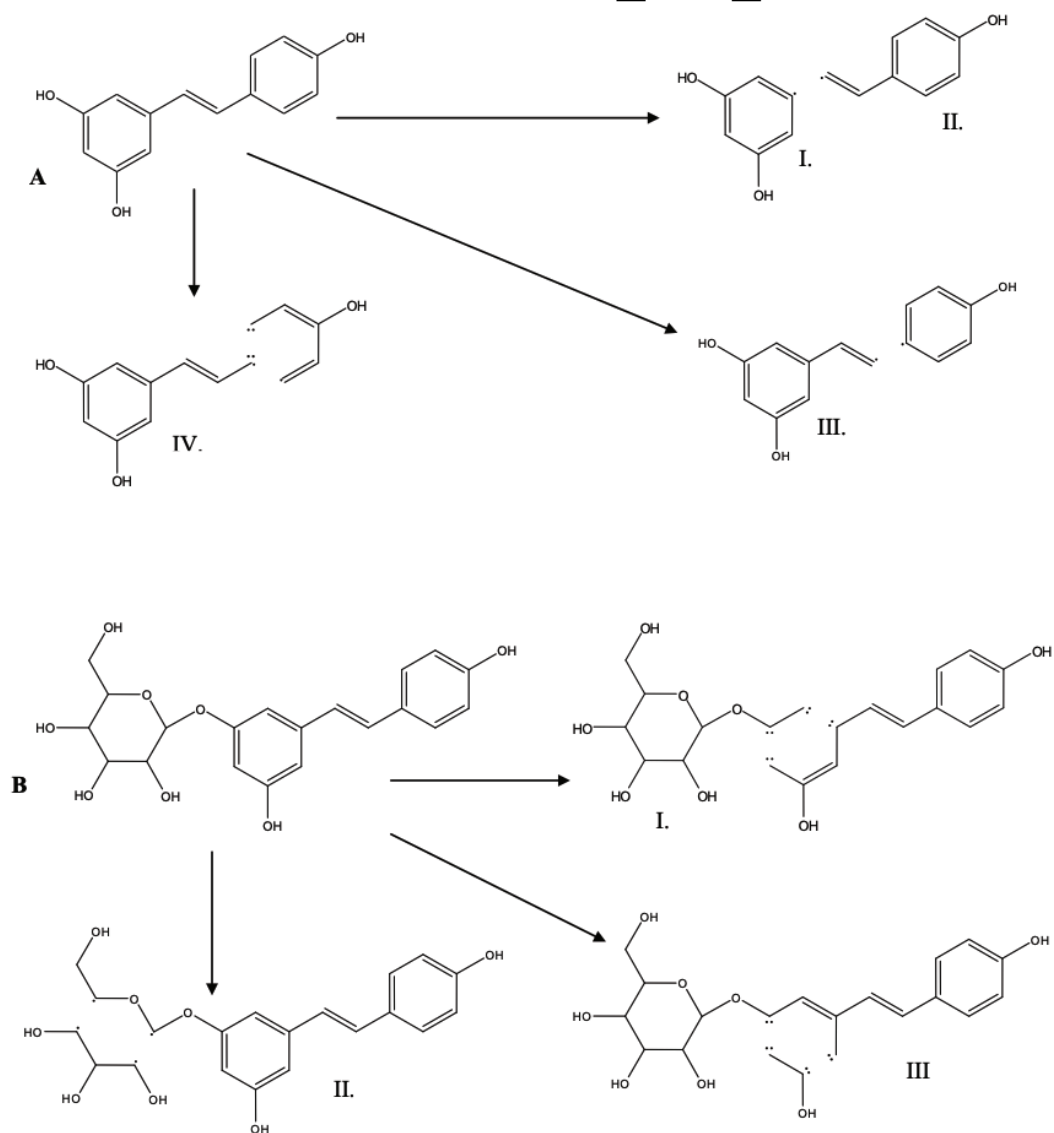
A vizsgált vegyületek kimutatási határait a 4. táblázat, míg a tandem tömegspektrometriás vizsgálatok összefoglaló eredményeit az 5. táblázat tartalmazza. A vegyületek fragmentációs folyamatainak összefoglalása a 25-27. ábrákon látható.

4. táblázat: A vizsgált polifenolok kimutatási határai mátrix mentes LDI MS (pozitív mód) alkalmazása esetén.

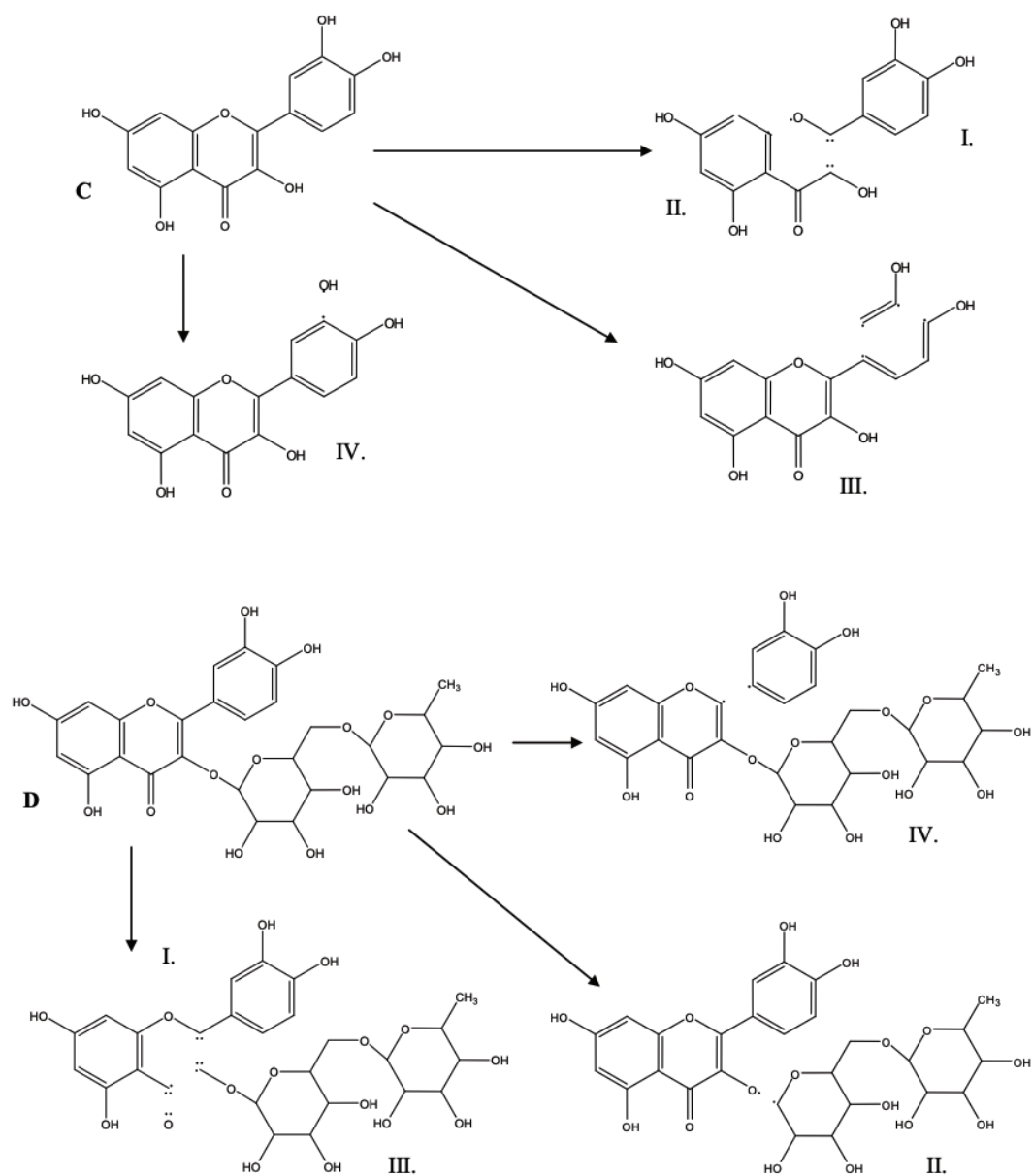
kimutatási határ (LOD)	
rezveratrol	0,40 pmol
piceid	0,26 pmol
malvidin-klorid	0,27 pmol
malvidin-3-galaktozid-klorid	0,19 pmol
rutin-trihidrát	0,15 pmol
kvercetin-dihidrát	0,30 pmol

5. táblázat: Az LDI TOF/TOF tandem tömegspektrometriás vizsgálat (PSD) eredményei az egyes polifenolok vonatkozásában, zárójelben a 25-27. ábrákon szereplő fragmentumokra történő utalás található.

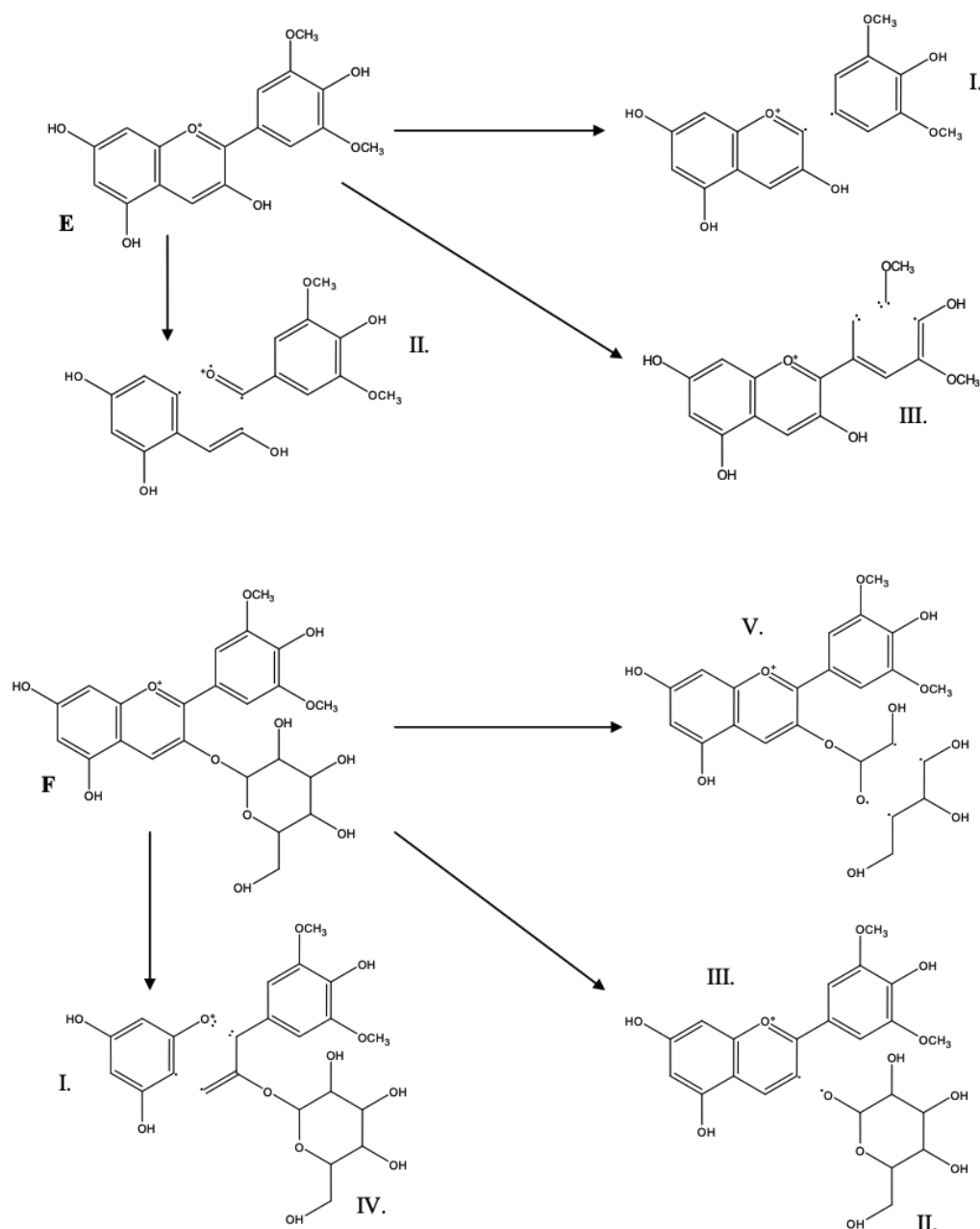
PSD fragmensek (m/z)	
rezveratrol	110,88 (A/I.), 119,05 (A/II.), 136,65 (A/III.) 148,89 (A/IV.)
piceid	203,27 (B/I.), 299,69 (B/II.), 348,9 (B/III.)
kvercetin-dihidrát	138,73 (C/I.), 166,65 (C/II.), 260,35 (C/III.) 285,98 (C/IV.)
rutin-trihidrát	258,15 (D/I.), 309,52 (D/II.), 339,54 (D/III.) 501,24 m/z (D/IV.)
malvidin-klorid	153,36 (E/I.), 181,52 (E/II.), 288,38 (E/III.)
malvidin-3-galaktozid-klorid	124,49 (F/I.), 180,13 (F/II.), 314,04 (F/III.) 370,42 (F/IV.), 389,63 (F/V.)



25. ábra: Az LDI TOF/TOF MS vizsgálatok során detektált lehetséges fragmentációs folyamatok **(A)** *transz-rezveratrol*, **(B)** *piceid*.



26. ábra: Az LDI TOF/TOF MS vizsgálatok során detektált lehetséges fragmentációs folyamatok **(C)** kvercetin-dihidrát, **(D)** rutin-trihidrát.



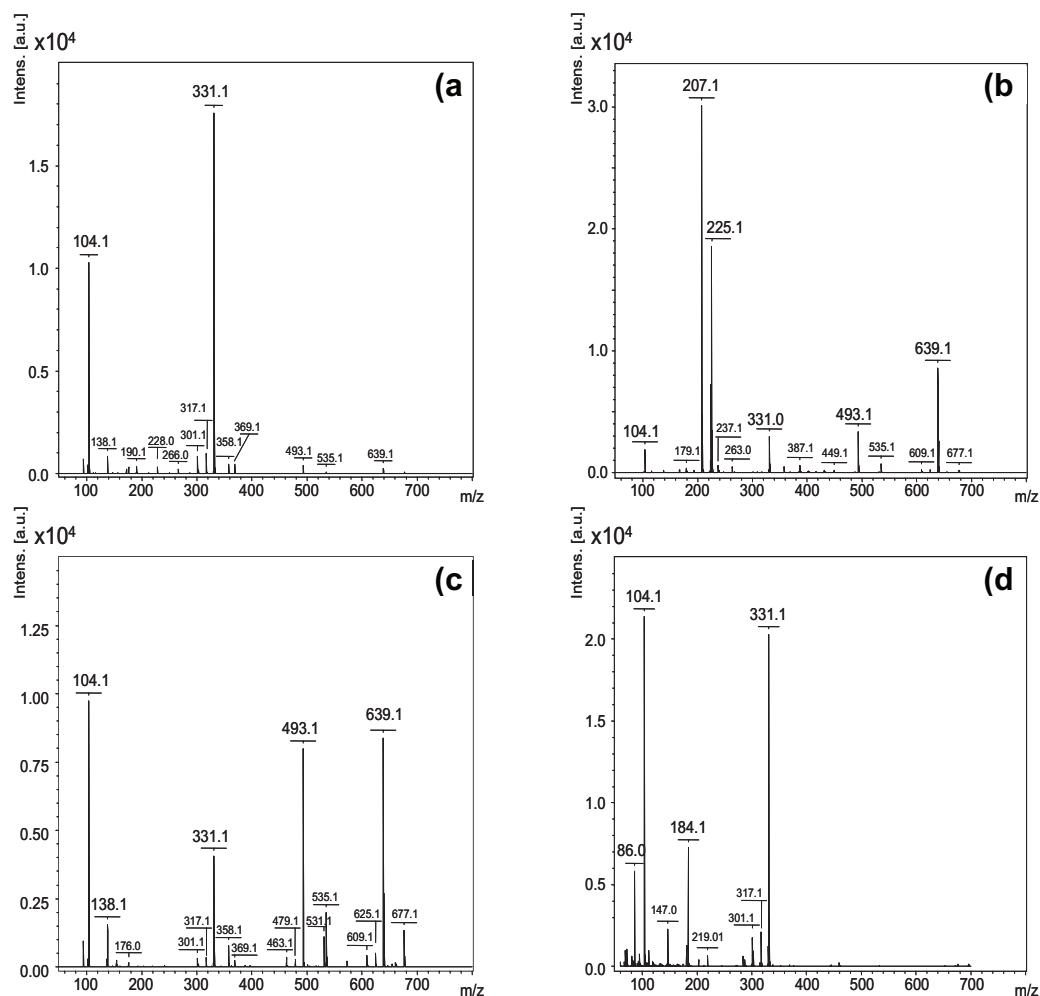
27. ábra: Az LDI TOF/TOF MS vizsgálatok során detektált lehetséges fragmentációs folyamatok **(E)** malvidin-klorid, **(F)** malvidin-galaktózid-klorid.

A fenti eredményekből jól megfigyelhető, hogy a polifenolok mátrix mentes körülmények között elvégzett LDI MS vizsgálataik során többnyire jelentős fragmentáció következik be. Ez arra vezethető vissza, hogy a hatékony foton abszorpció és ionizáció csak magasabb lézerfluenciánál következett be, termikus instabilitást és az anyavegyület bomlását idézve elő.

Az anyavegyületek fragmentációjának csökkentése érdekében további MALDI TOF MS vizsgálatokat végeztünk el, hagyományos (CHCA, SA, 2,5-DHBA) és C₇₀ fullerén mátrix alkalmazásával. Tanulmányunkban antocianin standardokat (cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin), szőlőhéj extraktumot és borokat analizáltunk [IX]. A

szőlőbogyókat a szkopjei Mezőgazdasági Intézet (Institute of Agriculture, Skopje) szőlőültetvényein termesztették.

A MALDI TOF MS elemzéseket pozitív ionizációs módban a borok 3 hónapos, a borászat pincéjében történő tárolása után végeztük el. A mátrixoldatokból 1-1 μl -t vittünk fel a rozsdamentes mintatartóra, annyi módosítással, hogy a C_{70} oldatból a minta felcseppentése és beszáradása után is felvittünk 1 μl -t („szendvics” technika). A 28. ábra mutatja a Vranec szőlőhéj extraktumból különböző mátrixokkal (CHCA, SA, 2,5-DHBA, C_{70}) készített reprezentatív MALDI TOF MS spektrumokat, míg vizsgálataink szemikvantitatív eredményeit a 6. táblázatban foglaltuk össze.



28. ábra: A Vranec szőlőhéj kivonat különböző mátrix alkalmazásával elvégzett MALDI TOF MS vizsgálatainak eredményei **(a)** CHCA, **(b)** SA, **(c)** 2,5-DHBA, **(d)** C_{70} fullerén „szendvics”.

6. táblázat: A különböző mátrix vegyülettel (CHCA, SA, 2,5-DHBA, C₇₀) elvégzett MALDI TOF MS vizsgálatok során detektált antocianin csúcsok relatív intenzitása (%) a Vrancea szőlőhéj- és bormintákban.

Antocianin Matrix	Rel. I%	Cy	Pn	Dp aglycon ^c	Pt	Mv	Cy	Pn	Dp 3-Glu ^d	Pt	Mv	Cy	Pn	Dp 3-GluAc ^e	Pt	Mv	Cy	Pn	Dp 3-GluCoul ^f	Pt	Mv
<i>héj extrakt</i>																					
CHCA		<1	4	<1	5	100	–	–	–	–	2	–	–	–	–	<1	–	<1	–	<1	1
SA		–	<1	<1	<1	10	1	<1	–	<1	11	–	–	–	–	2	–	1	–	1	27
2,5-DHBA		<1	3	<1	3	41	–	3	–	2	78	–	<1	–	<1	19	–	4	–	5	83
C ₇₀ “szendvics”		2	8	3	9	90	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bor (M30-6d)^a</i>																					
CHCA		<1	5	1	4	72	–	<1	–	–	9	–	–	–	–	1	–	–	–	–	<1
SA		–	<1	<1	<1	8	–	–	–	–	19	–	–	–	–	3	–	<1	–	<1	14
2,5-DHBA		–	1	1	1	14	–	2	–	1	30	–	<1	–	–	6	<1	1	–	<1	10
C ₇₀ “szendvics”		<1	2	<1	1	35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bor (M30-10d)^b</i>																					
CHCA		–	2	<1	1	43	–	<1	–	–	4	–	–	–	–	<1	–	–	–	–	<1
SA		–	1	1	1	25	–	<1	–	<1	20	–	–	–	–	4	–	<1	–	<1	18
2,5-DHBA		–	<1	1	<1	5	–	1	<1	<1	13	–	<1	–	–	2	–	<1	–	<1	4
C ₇₀ “szendvics”		<1	5	1	2	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

^a 6 nap macerálás után

^b 10 nap macerálás után

^c Cy: Cyanidin (m/z 287), Pn: Peonidin (m/z 301), Dp: Delphinidin (m/z 303), Pt: Petunidin (m/z 317), Mv: Malvidin (m/z 331)

^d Cy-3-Glu: Cyanidin-3-glükózid (m/z 449), Pn-3-Glu: Peonidin-3-glükózid (m/z 463), Dp-3-Glu: Delphinidin-3-glükózid (m/z 465), Pt-3-Glu: Petunidin-3-glükózid (m/z 479), Mv-3-Glu: Malvidin-3-glükózid (m/z 493)

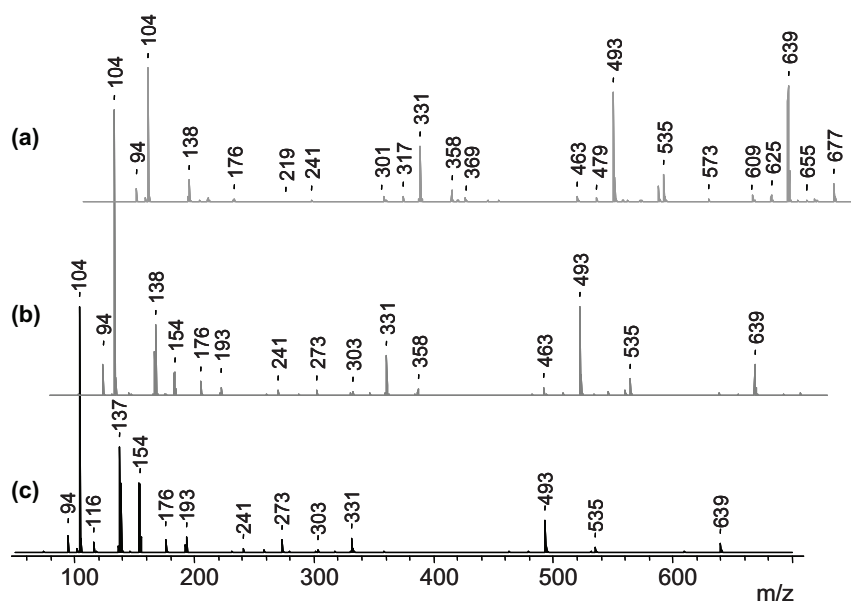
^e Cy-3-GluAc: Cyanidin-3-acetilglükózid (m/z 491 m/z), Pn-3-GluAc: Peonidin-3-acetilglükózid (m/z 505), Dp-3-GluAc: Delphinidin-3-acetilglükózid (m/z 507), Pt-3-GluAc: Petunidin-3-acetilglükózid (m/z 521), Mv-3-GluAc: Malvidin-3-acetilglükózid (m/z 535)

^f Cy-3-GluCoul: Cyanidin-3-p-kumaroilglükózid (595 m/z), Pn-3-GluCoul: Peonidin-3-p-kumaroilglükózid (m/z 609), Dp-3-GluCoul: Delphinidin-3-p-kumaroilglükózid (m/z 611), Pt-3-GluCoul: Petunidin-3-p-kumaroilglükózid (m/z 625), Mv-3-GluCoul: Malvidin-3-p-kumaroilglükózid (m/z 639)

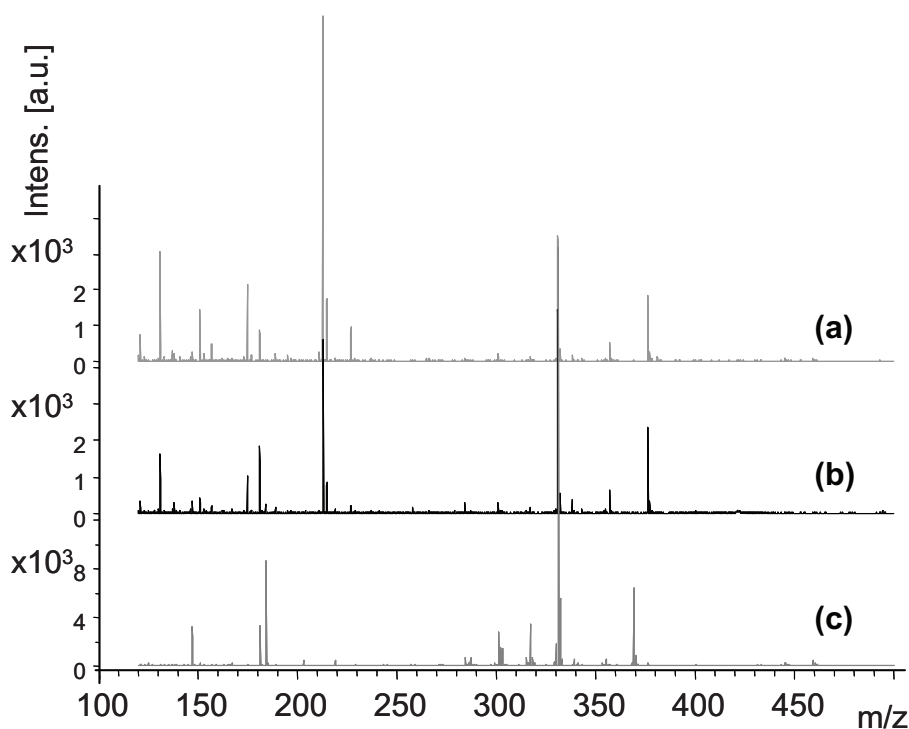
Ahogy eredményeinkből kitűnik a legjobb eredményeket a 2,5-DHBA jelenlétében kaptuk, de az aglikonok esetében a C₇₀ „szendvics” technika is hatékonyak bizonyult. A legintenzívebb csúcsokat a malvidin és származékai esetében detektáltuk. A malvidin pozitív töltésű flavilium-kationját (m/z 331) minden mintában kimutattuk minden kísérleti feltétel mellett. A tömegspektrum egyéb csúcsai, az m/z 493, az m/z 535 és az m/z 639 rendre a malvidin-3-glükózidnak, a malvidin-3-acetilglükózidnak, illetve a malvidin-3-p-kumaroilglükózidnak felelnek meg. A 2,5-DHBA mátrix jelenlétében a Vrancea-szőlőhéj kivonat MALDI TOF MS analízisei során a petunidin, petunidin-3-glükózid és petunidin-3-p-kumaroilglükózid csúcsokat mutattuk az m/z 317, m/z 479 és m/z 625 értékeknél. Az m/z 301, m/z 463 és m/z 609 csúcsok a peonidint, a peonidin-3-glükózidot és a peonidin-3-p-kumaroilglükózidot, míg az m/z 303 és m/z 287 csúcsok a bormintákban megfigyelt delphinidin- és cianidin-kationok voltak.

A 2,5-DHBA alkalmazásával kapott eredményeink jó egyezést mutatnak a szakirodalomban publikált LC MS fragmentációs profilokkal (29. ábra) [222–224]. A C₇₀ fullerén mátrixként történő alkalmazása az antocianin aglikon formáinak kimutatására kiválóan alkalmasnak bizonyult, azonban a glükózid, acetilglükózid és kumaroilglükózid konjugátumok fragmentációt szenvedtek az ionizációjukhoz szükséges magas lézerfluencia hatására. Jól érzékelhető módon a fullerén csökkentette a hagyományos mátrix vegyületek okozta háttér mértékét és az aglikon formák hatékony detektálásával

lehetőséget nyújt a különböző komplex összetételű minták ujjlenyomat elemzésére (30. ábra).



29. ábra: Vranec szőlőhéj és vörösbor minták pozitív ion módban 2,5-DHBA mátrix jelenlétében felvett MALDI TOF MS spektrumai **(a)** szőlőhéj extraktum, **(b)** bor 6 nap macerálás után, **(c)** bor 10 nap macerálás után.



30. ábra: A vizsgált minták C_{70} fullerén-segített LDI TOF MS ujjlenyomat spektrumai **(a)** Vranec bor 6 nap, **(b)** Vranec bor 10 nap, **(c)** Vranec szőlőhéj extraktum

2014-ben publikált tanulmányunkban [XVII] tovább fejlesztettük a módszert új mátrix, 2',4',6'-trihidroxiacetofenon (THAP) alkalmazásával, illetve fordított fázisú C_{18} szilárd-folyadék extrakciós mintaelőkészítéssel kiegészítve azt. Összesen három *Vitis vinifera* fajtából (Vranec, Merlot és Cabernet Sauvignon) és három különböző évjáratból (2006,

2007 és 2008) származó kilenc vörösborminta volt a vizsgálat tárgya. Minden bormintát a Tikveš Pincészet (Kavadarci, Macedónia) biztosított.

7. táblázat: A vizsgált vörösborkokban (Vranec, Merlot, C. Sauvignon) MALDI TOF és MALDI TOF/TOF tömegspektrometriával azonosított fenolos vegyületek molekulaionjai $[M]^+$ és PSD fraktionjai.

Phenolics	MS (m/z) M^+	MS/MS (m/z) Fragment ions
Anthocyanins		
Non-acylated glucosides		
Dp-3-glc	465	303
Pt-3-glc	479	317
Pn-3-glc	463	301
Mv-3-glc	493	331
Acetylglucosides		
Mv-3-acetylglc	535	331
<i>p</i> -Coumaroylglucosides		
Dp-3- <i>p</i> -coumglc	611	303
Cy-3- <i>p</i> -coumglc	595	287
Pt-3- <i>p</i> -coumglc	625	317
Pn-3- <i>p</i> -coumglc	609	301
Mv-3- <i>p</i> -coumglc	639	331
Ethyl-bridged flavan-3-ol-anthocyanin adducts		
(Epi)cat-ethyl-Mv-3- <i>p</i> -coumglc	955	665, 357
Pyrananthocyanins		
Vitisin A	561	399
<i>p</i> -Cm-vitisin A	707	399
Vitisin B	517	355
Ac-vitisin B	559	355
<i>p</i> -Cm-vitisin B	663	355
A-type vitisin of Pt-3- <i>p</i> -coumglc	677	369
10-DHP-pymv-3-glc (pinotin A)	625	463
10-MHP-pymv-3-cmglc	755	447
10-(Epi)Cat-pymv-3-glc	805	643, 491
10-(Procyanidin dimer)-pymv-3-glc	1,093	931, 803
10-(Procyanidin dimer)-pymv-3-acglc	1,135	931, 845

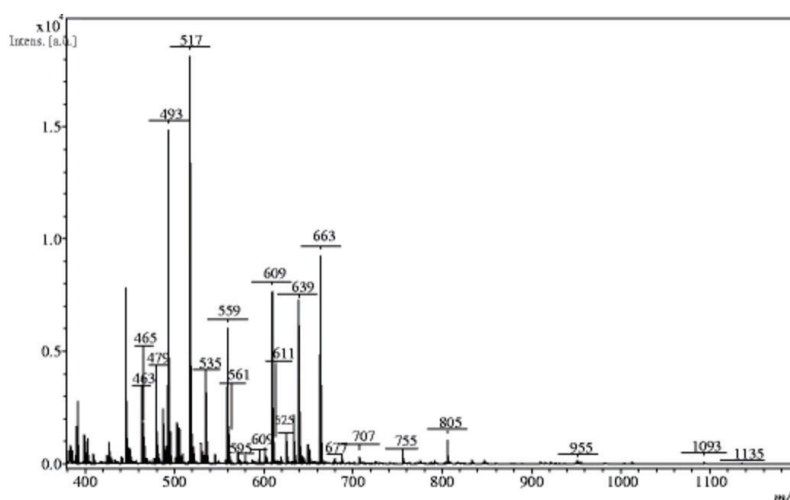
Dp: delphinidin, Cy: cianidin, Pt: petunidin, Pn: peonidin, Mv: malvidin, Cat: catechin, EpiCat: epicatechin

A borpigmentek, antocianinok kivonásához szilárd fázisú extrakciós eljárást alkalmaztunk fordított fázisú Zip-Tip C18 pipettahegyekkel. A hegyeket 1 μ l 0,1% (V/V) acetonitril és 0,1% (V/V) trifluor-ecetsav (TFA) 1/1 térfogatarányú keverékével mostuk, valamint 1 μ l 0,1% (V/V) TFA oldattal kondicionáltuk. Ezután a bormintát (1 μ l) felszívtuk, majd 1 μ l 0,1%-os (V/V) TFA oldattal mostuk a cukrok és savak eltávolítására. Az állófázisból a pigmentek eluálását 1 μ l acetonitril/0,1 % TFA 1/1 térfogatarányú keverékével végeztük el.

A mátrixoldatot elkészítéséhez 10 mg 2',4',6'-trihidroxi-acetofenont (THAP) 1 ml acetonitril/víz (1/1 V/V) elegyben oldottunk. A MALDI TOF MS vizsgálatokhoz azonos mennyiségű 1-1 μ l mátrixot és eluált mintát kevertünk össze a rozsdamentes mintatartó tálcán. A tömegspektrumokat a m/z 350-1400 vagy m/z 750-1800 tartományokban vettük fel, és 300 egymást követő lézerimpulzus összegét rögzítettük. Az PSD MS/MS kísérletekben a prekursorion izolálási ablakát a prekursor ion tömegének $\pm 1\%$ -ára állítottuk be.

A THAP mátrixot eredményesen alkalmazták Wang és munkatársai élelmiszerminták oligoszacharidjeinek és polifenoljainak vizsgálatára, illetve Kussmann és munkatársai peptidek és oligonukleotidok analízisére [222, 225, 226].

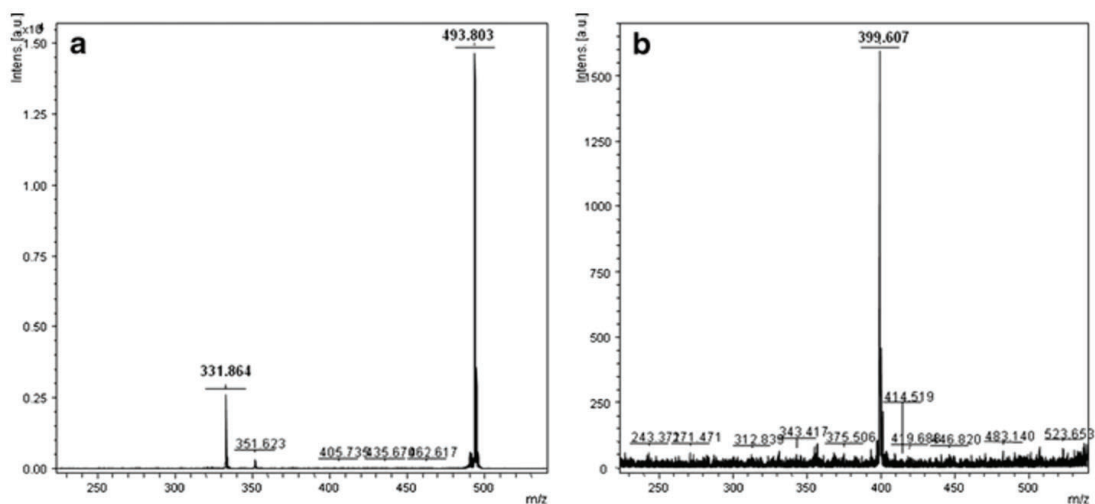
A borok tisztítására alkalmazott szilárd fázisú extrakciós módszer segítségével összesen 22 vegyületet azonosítottunk MALDI TOF MS technikával. A 7. táblázat és a 31. ábra az azonosított vegyületeket mutatja be, amelyek öt csoportba tartoznak: antociánok, vitizin típusú piranoantociánok, hidroxifenil-piranoantociánok, flavanil-piranoantociánok és acetaldehyd-mediált flavanol-antocián adduktok. Az azonosítás a flavilium-kationok monoizotópos molekulatömege $[M]^+$ vagy a protonált kvázimolekula ionok $[M + H]^+$ alapján történt pozitív ionizációs módban. A vegyületek azonosítása PSD TOF/TOF fragmentációval, illetve az azonos kísérleti körülmények között elemzett malvidin-3-glükózid standarddal és/vagy a már publikált adatokkal való összehasonlítással történt.



31. ábra: A vörösbor extraktumból (Vranec 2008) THAP mátrix jelenlétében pozitív ionizációs módban elvégzett MALDI TOF tömegspektrometriával azonosított vegyületek reprezentatív spektruma.

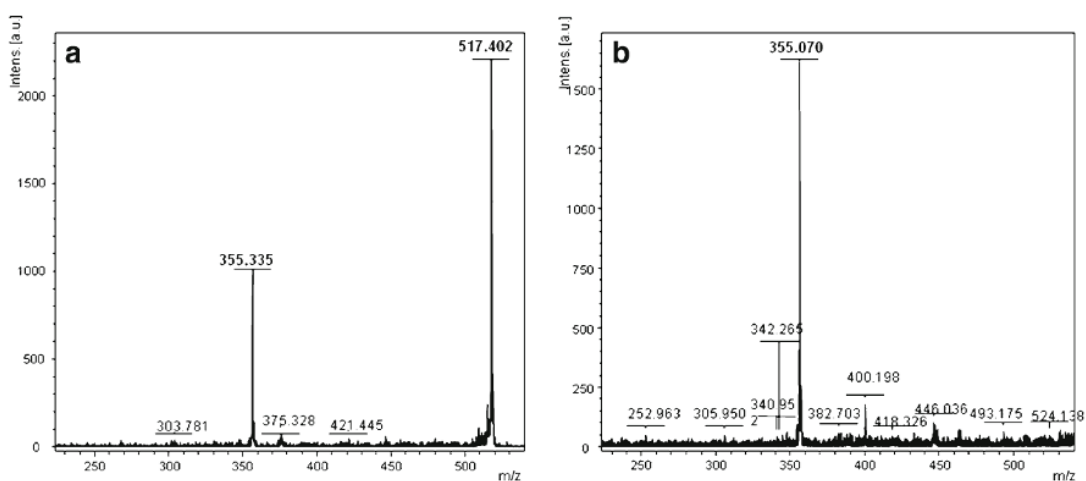
Így a malvidin-3-glükózid $[M]^+$ kationját (m/z 493) minden mintában kimutattuk, a tömegspektrumban m/z 535 és 639-nél megjelenő molekulaion-csúcsok a malvidin-3-acetilglükózidnak, illetve a malvidin-3-p-koumaroilglükózidnak felelnek meg. E három ion (m/z 493, 535 és 639) fragmentációja során a glükóz, az acetyl-glükózid és a p-koumaroilglükózid részek eliminációjának eredményeként m/z 331-nél lévő fragmension keletkezett.

A borextraktum MALDI TOF MS spektrumában az m/z 465, m/z 479 és m/z 463 csúcsokat a delfinidin, petunidin és peonidin 3-glükózidjaiként azonosítottuk. A 10-karboxi-pyranoantocianinokat vagy A-típusú vitizineket (vitizin A és p-koumaroil-vitizin A) az m/z 561 és m/z 707 $[M]^+$ molekulaionok alapján mutattuk ki, amelyek m/z 399-nél adtak fragmentumot, ami a glükóz (162 Da) és a p-koumaroilglükózid (308 Da) részek elvesztésének felel meg. Az m/z 677-nél lévő molekulaion-csúcsot és az m/z 369-nél lévő fragmension a petunidin-3-p-koumaroilglükózid A-típusú vitizinjeként azonosítottuk [227]. A malvidin-3-glükózid (m/z 493) és a p-koumaroil-vitizin A (m/z 707) MALDI PSD TOF/TOF fragmentációját a 32. ábra mutatja be.



32. ábra: A malvidin-3-glükozid (a) és a p-kumaroil-vitizin A (b) MALDI PSD TOF/TOF fragmentációja során keletkező leányionok spektrumjai.

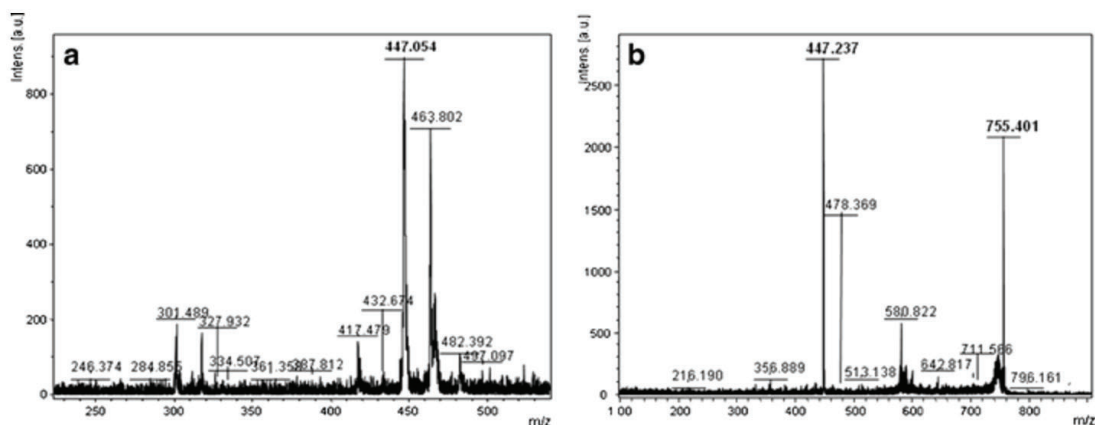
A borból származó pigmentek egy másik csoportját ugyancsak azonosítottuk, amely a 10-H-piranoantociánok (B-típusú vitizinek, piranoantociánok) csoportjába tartozik. Az m/z 517, 559 és 663 molekulaion-csúcsokat piranomalvidin-3-glükozidként (vitizin B), piranomalvidin-3-acetilglükozidként (acetilvitizin B) és piranomalvidin-3-p-koumaroilglükozidként (p-koumaroilvitizin B) azonosítottuk, mindegyike a glükozid (162 Da), acetyl-glükozid (204 Da) és p-koumaroilglükozid (308 Da) csoportok eliminációjának eredményeként m/z 355-nél lévő fragsiont eredményezett [227]. A vitizin B (m/z 517) és az acetilvitizin B (m/z 559) MALDI-MS/MS fragmentációját a 33. ábra mutatja be.



33. ábra: A vitizin B (a) és az acetilvitizin B (b) MALDI-MS/MS fragmentációja.

Ezenkívül három 10-flavanil-piranoantociánin pigmentet mutattunk ki a borokban, amelyek m/z 805 (fragmensek m/z 643 és 491), m/z 1093 (fragmensek m/z 931 és 803) és m/z 1135 (fragmensek m/z 931 és 845) értékeknél jelentek meg. Ezek a pigmentek rendre a 10-(epi)katechin-piranomalvidin-3-glükozid, a 10-(procianidin dimer)-piranomalvidin-3-glükozid, illetve a 10-(procianidin dimer)-piranomalvidin-3-p-

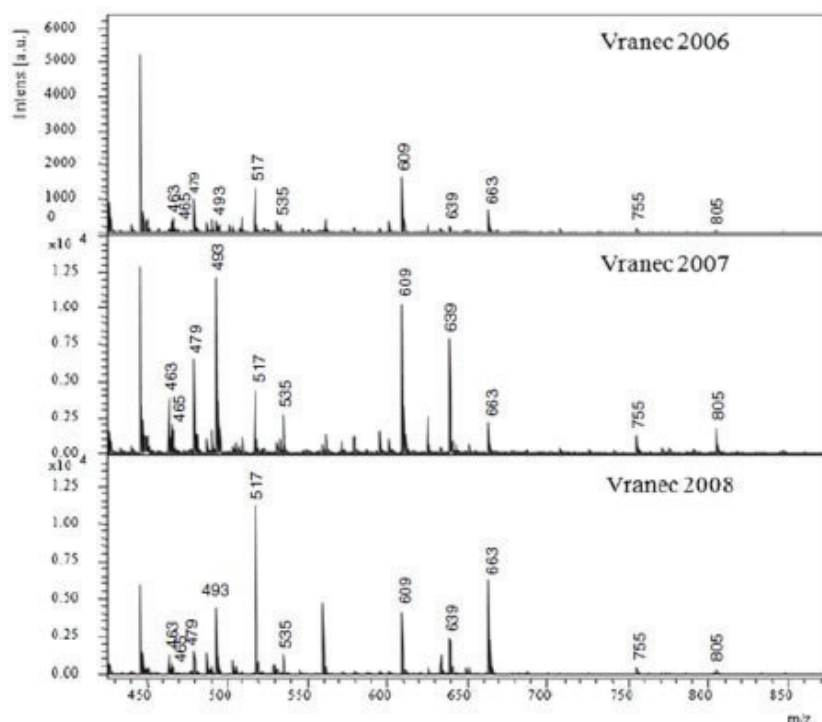
acetilglükózid. Az első molekulaion (m/z 805) fragmentációja a glükózidvesztés következtében m/z 643-nál aglikon-kationt, az m/z 1093 és 1135-nél lévő molekulaionok pedig az acetilglükózid-csoportok eliminációjának eredményeként m/z 931-nél lévő kationokat eredményeztek. Az m/z 491-nél lévő fragmentumion a (+)-katechin-rész Retro-Diels-Alder hasadásának felelt meg (152 Da). Az m/z 803 és 845 fragmentumok mindkét komponens esetében a procianidin-dimerek interflavonoid kötésének hasadásával keletkeztek, ami a flavan-3-ol monomerion elvesztését eredményezte, majd flavanil-karboxi-piranomalvidin-3-glükózid és flavanil-karboxi-piranomalvidin-3-acetilglükózid ionok keletkeztek.



34. ábra: Két hidroxifenil-piranoantociánok csoportjába tartozó vegyület **(a)** 10-(3'',4''-dihidroxifenil)-piranomalvidin-3-glükózid (pinotin A) és **(b)** 10-(4''-monohidroxifenil)-piranomalvidin-3-p-kumaroilglükózid MALDI PSD TOF/TOF fragmentációja.

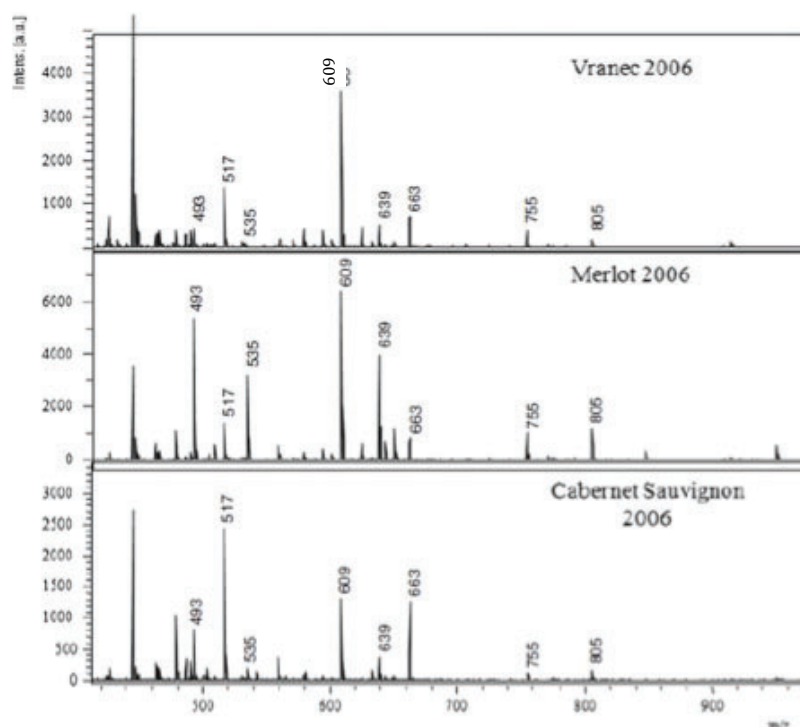
Egy acetaldehyd-mediált flavanol-antocián kondenzátumot is kimutattunk a vizsgált borokban. Ezt a vegyületet (epi)katechin-etil-malvidin-3-p-kumaroilglükózidként azonosítottuk, amely a MALDI TOF MS spektrumban m/z 955 molekulaionként jelentkezett. A molekulaion tandem tömegspektrometriás vizsgálata m/z 665 és 357 fragmensionokat eredményezett. Az első fragmentum (m/z 665) egy (epi)katechin molekula (m/z 290) eliminációjának felel meg, a második fragmentum pedig a p-kumaroilglükózid csoport elvesztésének eredménye.

A borokban két, a hidroxifenil-piranoantociánok csoportjába tartozó vegyületet mutattunk ki: az m/z 625 molekulaionnal és m/z 463 fragmenttel rendelkező vegyületet 10-(3'',4''-dihidroxifenil)-piranomalvidin-3-glükózidként (pinotin A), míg az m/z 755 molekulaionnal (fragmension m/z 447) rendelkező vegyületet 10-(4''-monohidroxifenil)-piranomalvidin-3-p-kumaroilglükózidként azonosítottuk. A 34. ábra a vegyületek MALDI PSD TOF/TOF fragmentációját mutatja az m/z 625 és m/z 755 prekursorionok esetében.

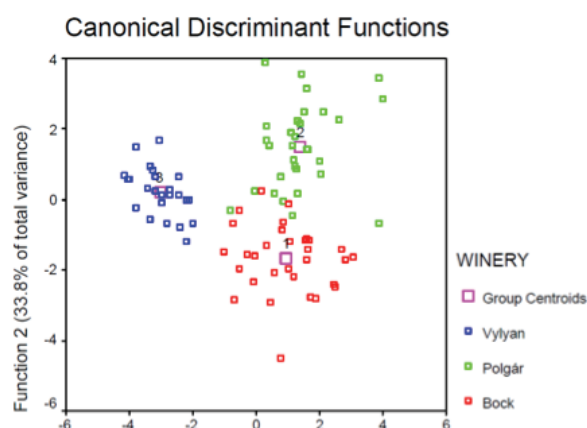


35. ábra: Különböző évjáratokból származó Vranec borok MALDI TOF MS (THAP mátrix, pozitív mód) vizsgálatainak eredménye.

A 35. ábra a különböző évjáratokból származó Vranec borok MALDI TOF MS „ujjlenyomat” tömegspektrumait mutatja be. A fő antocián, a malvidin-3-glükózid tömegjelének relatív intenzitása az m/z 493 értéknél egyértelműen különbözik mindhárom mintában, a legnagyobb intenzitás a 2007-ben készült borban figyelhető meg. Hasonlóképpen, az m/z 535, m/z 609 és m/z 639 ioncsúcsok relatív intenzitás értékei, amelyeket a malvidin-3-acetilglükózidnak, a peonidin-3-p-koumaroilglükózidnak, illetve a malvidin-3-p-koumaroilglükózidnak tulajdonítunk, melyek ugyancsak a 2007-es Vranec borban voltak a legmagasabbak. Ez azt jelenti, hogy nemcsak az érlelési körülmények, hanem a borkészítés során alkalmazott borászati eljárások is befolyásolják a bor antocián-tartalmát. Ez mellett jelentős befolyással vannak a szőlőültetvények mikroklimatikus viszonyai és az alkalmazott művelési eljárások. A 36. ábra az azonos évjáratú (2006) Vranec, Merlot és Cabernet Sauvignon borok MALDI tömegspektrumát mutatja. Jól látható, hogy az antociánok és más pigmentek a Merlot borban voltak a legnagyobb mennyiségben jelen. A kapott eredmények jó összhangban vannak a korábbi villányi vörösborok vizsgálatával kapott analitikai eredményeinkkel. A Merlot fajta kiemelkedő *transz*-rezveratrol, össz-polifenol és antocianin koncentrációkat mutatott a Polgár, Vylyan és Bock pincészetek esetében. Kimutattuk, hogy a szőlőfajta, az évjárat és az éghajlat mellett a mezőgazdasági művelés és a borkészítés technológiája határozza meg a borok polifenolos komponenseit. Statisztikai eredményeink alapján a vizsgált pincészetek egyértelműen elkülöníthetők voltak boraik kémiai összetétele alapján [XLIII, XLIV] (37. ábra).



36. ábra: Azonos évszázadú (2006) különböző típusú vörösborok (Vranec, Merlot, C. Sauvignon) MALDI TOF MS (THAP mátrix, pozitív mód) vizsgálatának eredménye.



37. ábra: A borászati technológia hatása a polifenol és antocianin tartalomra három villányi borászat (Vylyan, Polgár, Bock) mintái alapján [XLIV].

Összefoglalva, a Zip-Tip pipettahegyekkel végzett szilárd fázisú extrakció egy gyors, alacsony oldószerigényű módszer, amely alkalmas borminták MALDI TOF MS vizsgálatok előtti tisztítására. A THAP mátrix alkalmazása a borextraktumok MALDI TOF tömegspektrometriás elemzésére hatékonynak bizonyult MS és MS/MS módban egyaránt.

5.2. Bioaktív peptidek és fehérjék vizsgálata

Napjainkban a peptidomikai, proteomikai tandem tömegspektrometriás vizsgálatok főként a HPLC-vel vagy nanoLC-vel kapcsolt ESI MS/MS vagy MSⁿ módszerekre épülnek, amelyek kiváló kvalitatív és kvantitatív lehetőséget biztosítanak. Ennek ellenére a MALDI technika nem szorult ki teljes mértékben az „omikai” területről, köszönhetően az egyszerű mintaelőkészítéssel párosuló nagy áteresztőképességnek és változatos tandem analizátoros lehetőségeknek. A szakirodalomban jól nyomon követhető, hogy az utóbbi időszakban a MALDI alkalmazásának nemzetközi trendje főként a mikrobiológiai és a képalkotási alkalmazások felé tolódik el [228-235].

A lézerdeszorpciós ionizációs módszerek, elsősorban a MALDI technika kiváló lehetőséget nyújt peptidek, oligopeptidek detektálására, azonosítására összetett biológiai és klinikai mintákból. Az m/z 600-10000 tartományban a vegyületek könnyen és nagy spektrális felbontással detektálhatóak reflektrom módban, az ionizáció hatékonysága és a jel/zaj arány ideálisnak mondható, valamint a mátrix ionok zavaró interferenciája nem számottevő. A MALDI nem különösen érzékeny a mintában jelenlévő esetleges szennyezőkre, sókra, pufferekre, precipitálódó, koagulálódó komponensekre, ami jelentős előnyt jelent a kromatográfiával kapcsolt technikákkal szemben. Ez mellett, off-line, tetszőlegesen kombinálható elválasztástechnikai műveletekkel, HPLC-vel, gélelektroforézissel, kapilláris elektroforézissel, vékonyréteg kromatográfiával. Mindezek alapján a MALDI TOF MS nem csupán triptikus peptidek detektálására, de natív peptidek, oligopeptidek, fehérjék kimutatására és szerkezetük azonosítására is kiváló módszer.

Munkánk során neuropeptidek, patológiás biomarkerek analitikai vizsgálatait dolgoztuk ki, főként klinikai diagnosztikai és terápiás célokat szolgálva.

5.2.1. Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid tömegspektrometriás vizsgálata [III, V, VII, VIII, XX]

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; PACAP) 1989-ben izolálták először birka hipotalamuszból, nevét a hipofízisben kifejtett adenilát cikláz enzim aktivációs hatásáról kapta. Az emlős szervezetben előforduló PACAP közel 90%-át a 38 aminosavból (PACAP-38) álló neuropeptid teszi ki, a 27 aminosavas (PACAP-27) forma csak kisebb mennyiségben van jelen [236]. Néhány tanulmány szerint PACAP-27 nagyobb mennyiségben fordul elő a gerinctelen élővilágban [237, 238]. A két polipeptid aminosavszekvenciáit a 38. ábra szemlélteti.

(a) HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL

(b) HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK

38. ábra: A PACAP-27 (a), és a PACAP-38 (b) aminosav szekvenciái

mark.laszlo_314_25

Az ennél rövidebb fragmensek általában antagonistá hatással rendelkeznek (PACAP 3-38, PACAP 6-38), bár bizonyos szövetekben agonista hatást is leírtak [239]. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális peptid (VIP) peptidcsalád tagja, szerkezetét tekintve nagyon konzervált polipeptid: szekvenciája minden emlősben azonos, és egyéb gerincesekben is csak pár aminosavval eltérő formában található. Legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben, valamint az endokrin szervekben fordul elő. A perifériás idegrendszerben a vegetatív pre- és posztganglionáris neuronok, valamint a spinális ganglionok tartalmazzák PACAP-ot [240]. A PACAP számos, részben egymással konvergáló jelátviteli úton keresztül fejti ki védő hatásait. A PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázt és a foszfolipáz C-t, melynek hatására cAMP-függő, és attól független útvonalak aktiválódnak. A protein kináz A (protein kinase A, PKA) aktiváció hatására általában a védő hatású MAPK (mitogen-activated protein kinase), és az ERK (extracellular signal-regulated kinase) foszforilációja figyelhető meg, ezzel szemben a neuronpusztulást elősegítő JNK (C-jun N-terminal kinase) és p38 MAPK foszforiláció csökken. A PKA a Rap1 és Ras aktiváción keresztül is aktiválja az ERK-t, valamint növeli CREB (cAMP response element-binding protein) foszforilációt. Az apoptózis mitokondriális útvonalára is hatással van: a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg proapoptotikus tagjait inaktiválja (Bad, Bax). A PACAP jelentősen gátolja a kaspáz-függő és független apoptotikus folyamatokat is [241].

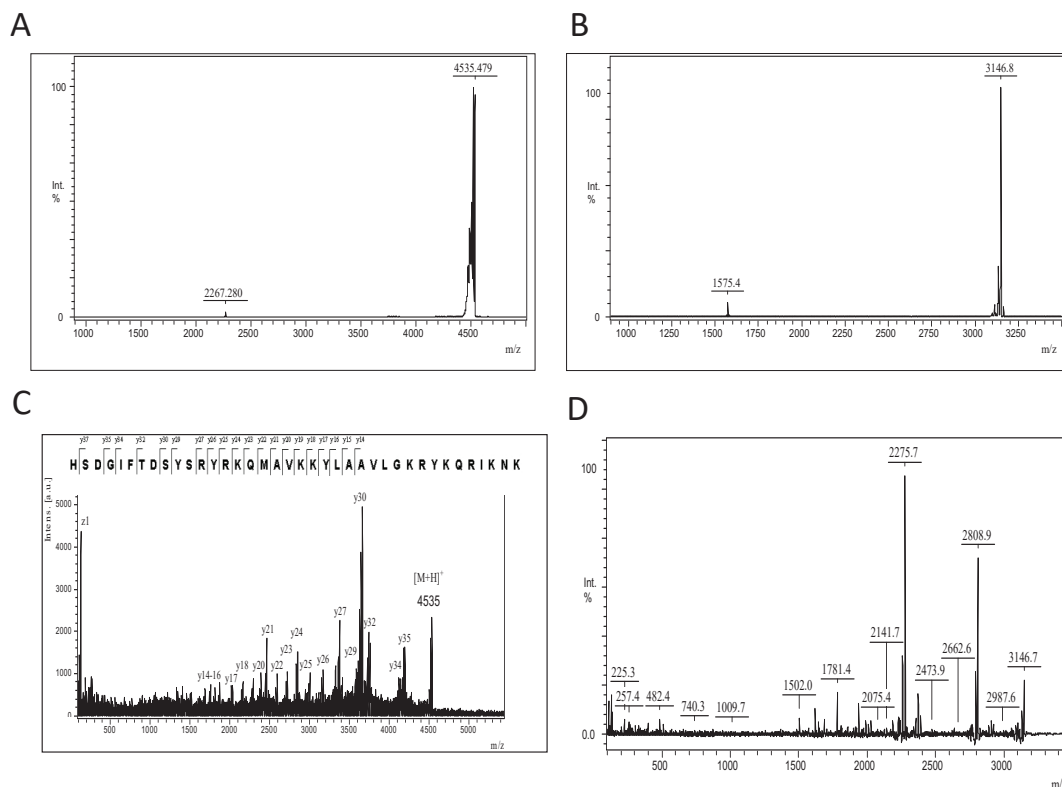
A PACAP jelenlétét több perifériás szövetben is igazolták már többek között ivarszervekben, a kardiovaszkuláris és a gastrointesztinális rendszerben.

8. táblázat: A PACAP-27 és PACAP-38 átlag és monoizotópos tömegei a jellemző kémiai módosításokat figyelembevéve (Peptide Mass Calculator)

molekulatömeg (Da)		módosítás
PACAP-27	3148,611 (átlag) 3146,622 (monoizotópos)	N-term szabad
		C-term szabad
		Cys redukált
PACAP-27	3147,626 (átlag) 3145,638 (monoizotópos)	N-term szabad
		C-term amid
		Cys redukált
PACAP-38	4535,274 (átlag) 4532,459 (monoizotópos)	N-term szabad
		C-term szabad
		Cys redukált
PACAP-38	4534,289 (átlag) 4531,475 (monoizotópos)	N-term szabad
		C-term amid
		Cys redukált

Az idegrendszeren kívül jelentős koncentrációban mutatható ki a herében, a mellékvese kromaffin-sejtjeiben és a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek sejtjeiben, valamint szinte az összes szervben (szív, tüdő, máj, vese, nyirokszervek) detektálták már [240]. Felfedezése óta a PACAP, illetve a VIP/PACAP családba tartozó peptidek kvalitatív és kvantitatív analitikája radioimmunoassay (RIA) módszerrel történt. A PACAP antitestek specificitásának ingadozása azonban azt eredményezte, hogy a vizsgálatok során a fals pozitív arány jelentősnek bizonyult. Például voltak olyan vizsgálati összeállítások, ahol a PACAP-génkiütött (PACAP KO) egérmodellben is megjelent a PACAP-38-szerű immunreaktivitás jelenléte RIA-val. Ez az analitikai bizonytalanság, illetve a gyorsabb és költséghatékonyabb vizsgálatok lehetősége teremtette meg az igényt a PACAP-38 és PACAP-27 MALDI TOF tömegspektrometriával történő meghatározására.

A PACAP-38 és 27 aminosavból felépülő változatainak molekulatömegei 4,5, illetve 3,1 kDa (8. táblázat), amely ideálisnak mondható a nagy érzékenységű és felbontású tömegspektrometriás detektáláshoz, azonban a módszerfejlesztés során számos nehezítő tényezővel kellett szembenéznünk a biológiai és klinikai minták elemzése kapcsán. A PACAP-38 polipeptid fiziológiás életideje ca. 3-5 perc, amely főként a dipeptidyl peptidáz IV (DPP IV) enzim hatásának tudható be, ez mellett empirikus tapasztalataink alapján a peptid hajlamos az üveg- és nem kezelt műanyagfelületekhez irreverzibilis módon kikötödni.



39. ábra A PACAP-38 és PACAP-27 standardok MALDI TOF, illetve MALDI PSD TOF/TOF tömegspektrometriás vizsgálata **(A)** PACAP-38, **(B)** PACAP-27, **(C)** PACAP-38 PSD fragmentáció, **(D)** PACAP-27 PSD fragmentáció.

A nehézségek ellenére munkacsoportomnak elsőként sikerült a PACAP-38 és PACAP-27 kvalitatív MALDI TOF tömegspektrometriás analitikáját kidolgozni biológiai és klinikai mintákból (39. ábra).

9. táblázat: Munkacsoportom által végzett MALDI TOF tömegspektrometriás PACAP analízisek áttekintése a mintaelőkészítés és a vizsgálat speciális paramétereinek és eredményének rövid összefoglalása.

minta megnevezése	speciális paraméterek	PACAP	hivatkozás
vérplazma (patkány)	200 ns, off-line HPLC, on-plate tripszines emésztés	P38 P38 Na ⁺	XLVI
CNS (éti csiga)	140 ns, PSD	P38szerű P27szerű	XLVII
hemolimfa (éti csiga)	140 ns, PSD	P38szerű P27szerű	XLVII
vérszérum (humán)	200 ns, 10 kDa MWCO, ZipTipC18, PSD	P38	III
tej (humán)	200 ns, lipidmentesítés fagyasztással, ZipTipC18, PSD	P38	III, LX
nyál (humán)	200 ns	n.d.	VIII
orrváladék (humán)	200 ns	n.d.	VIII
csarnokvíz (humán)	200 ns	n.d.	VIII
tüszőfolyadék (humán)	200 ns, fehérjementesítés TCA, ZipTipC18,	P38	VIII, LVII
méhnyakváladék (humán)	200 ns	n.d.	VIII
magzatvíz (humán)	200 ns	n.d.	VIII
CNS (nagy mocsáricsiga)	140 ns, ZipTipC18, tripszines emésztés (oldatban)	P27szerű P38szerű	VII
vese (vad és PACAP KO egér)	200 ns, 10 kDa MWCO, ZipTipC18	P38	V
vese (patkány)	200 ns, 10 kDa MWCO, ZipTipC18	P38	LV
agy-gerincvelői folyadék (patkány)	200 ns, ZipTipC18	P38	LVIII
szeminális plazma (humán)	200 ns	n.d.	LVI
könny (egér)	140 ns, CID, nanoDESI MS/MS	P38	XX
könny (humán)	140 ns, CID, nanoDESI MS/MS	P38	XX

P38: PACAP-38, P27: PACAP-27, PSD: post source decay, CID: collision-induced decay, MWCO: molecular weight cut-off, n.d.: nem detektálható

A könnyebb áttekinthetőség érdekében és a teljesség igénye nélkül, néhány jelentősebb biológiai és klinikai minta vizsgálati paraméterét, a PACAP analízis eredményét és a

releváns saját közleményeket a 9. táblázatban foglaltam össze. A módszert számos kollaborációs vizsgálatban alkalmaztuk a polipeptid jelenlétének igazolására biológiai és klinikai mintákon [III, V, VII, VIII, XV, XX, XXIX, XXX, XLVI, XLVII, LV, LVI, LVII, LVIII, LX]. Munkánk jelentős mérföldkövét a 2016-ban közölt *Nature Communications* [XX] folyóiratban megjelent közleményünk jelentette, amelyben meghatározó szerepe van az általunk kifejlesztett MALDI TOF MS és nanoDESI MS/MS módszernek, ugyanis eredményeink bizonyították a PACAP-38 endogén jelenlétét az egér és humán könnymintákban, amelynek jelentős klinikai vonatkozásait tártuk fel a japán kollaboráció során.

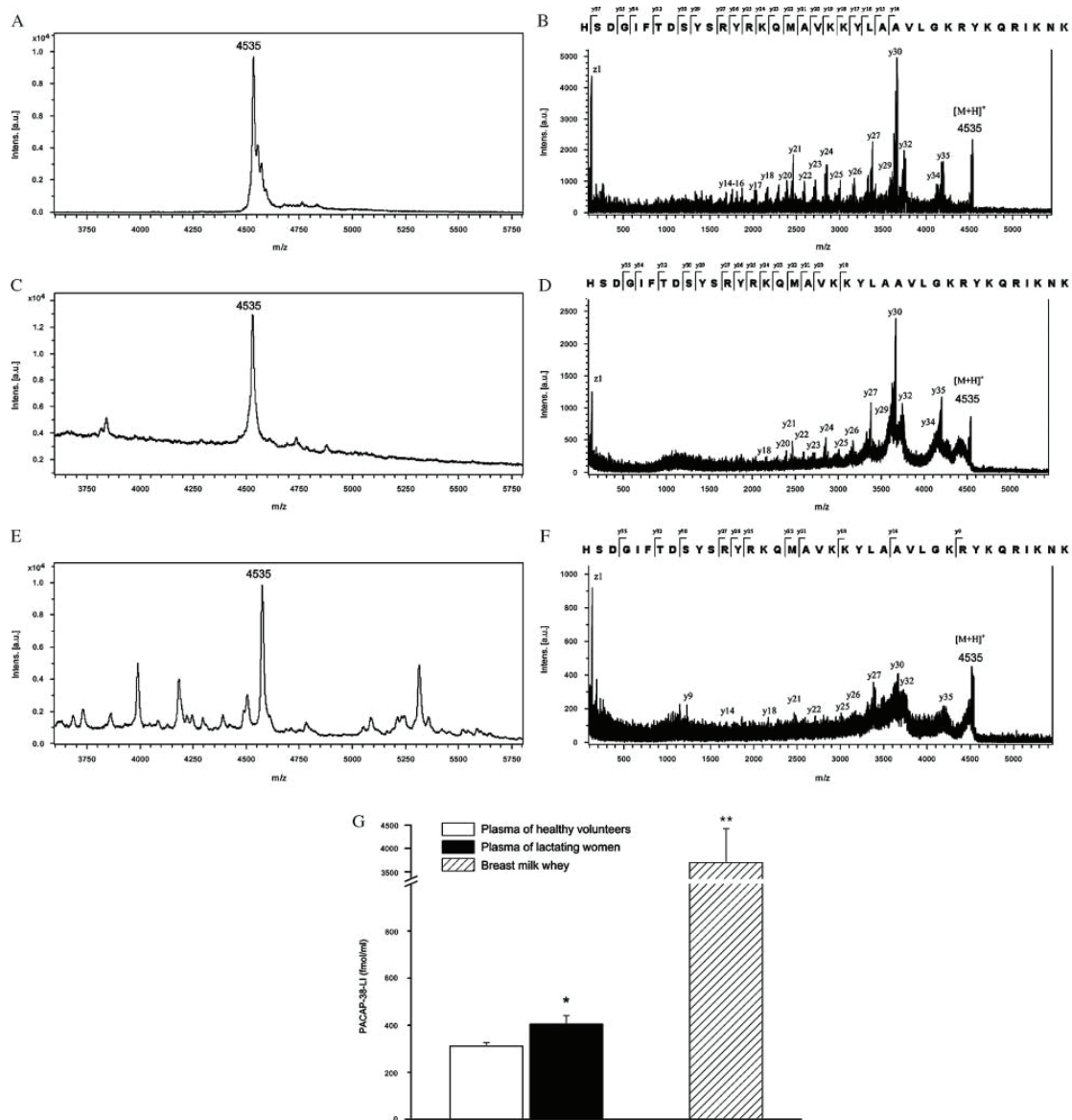
Összességében a MALDI vizsgálatokat CHCA mátrix jelenlétében pozitív ionmódban végeztük el, a késleltett extrakció időtartama többnyire 200 ns volt (néhány mintánál 140 ns, lásd 9. táblázat) 20,00 kV gyorsító feszültség mellett. Lineáris detektálást alkalmaztunk a natív polipeptidek kimutatásánál, míg az enzimatiszta emésztmények és a tandem TOF/TOF vizsgálatoknál reflektron detektorral dolgoztunk.

2009-ben publikált tanulmányunkban egészséges 20-40 éves nők és férfiak (n=19), illetve 1-6 hónapos csecsemőjüket szoptató kismamák (n=31) vérmintáit vizsgáltuk [III]. A kismamák esetében 5-5 ml anyatejet is gyűjtöttünk MALDI TOF MS elemzések céljára. A vérmintákat jégén tartott EDTA (18 mg) tartalmú csövekbe vettük le és a mintákhoz azonnal peptidáz inhibitor (aprotinin) (1200 U) adagoltunk. A centrifugálást követően a vérplazma minták 1-1 ml-ét ultraszűrővel (Amicon Ultra-4 10 kDa MWCO) tisztítottuk. A 10 kDa -nál kisebb vegyületeket tartalmazó szűrletet fordított fázisú szilárd fázisú extrakció (ZipTipC18) segítségével sómentesítettük és acetonitril/0,1% TFA (1/1 V/V) eleggyel közvetlenül a rozsdamentes acél MALDI mintatartó tálcára eluáltuk. Az anyatej minták lipidmentesítését 4°C-on végeztük el, majd közvetlenül a mintatartóra csepegtettük. 1-1 µl plazma és tej mintához azonos mennyiségű CHCA mátrixot adagoltunk, majd a teljes kristályosodást követően Bruker Autoflex MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel mértük. A tömegspektrométert MS módban lineáris detektálással 1000-10000 m/z tartományban, míg tandem TOF/TOF azonosításnál LIFT módban PSD fragmentációt alkalmazva használtuk. A PACAP standardok esetében 200, míg a plazma és tej minták esetében 1000-1000 egyedi lézerlövés eredményét összesítettük.

Eredményeink alapján mind a humán plazmában, mind az anyatejben megtalálható a PACAP-38, amelynek kvantitatív vizsgálatát PACAP-szerű immunreaktivitás alapján RIA eljárással határoztuk meg. A mintákból sikeresen detektáltuk a polipeptidre jellemző m/z 4535 értéknél megjelenő molekulaion csúcsot, valamint az aminosav szekvenciájára utaló diagnosztikus fragmentációs profilt. A MALDI TOF és PSD TOF/TOF spektrumokat, illetve a PACAP-38 koncentrációját a vizsgált vérplazma és anyatej mintákban a 40. ábra mutatja. A PACAP standard és a mintákból származó tömegspektrometriás eredmények jó egyezést mutatnak. A kontroll vérplazmák PACAP-38 koncentrációja ca. 300 fmol/ml-nek adódott, ahol a nőktől és a férfiaktól származó minták között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. Vizsgálataink alapján a laktáció időszakában lévő édesanyákra szignifikánsan magasabb ca. 400 fmol/ml plazma érték volt jellemző. Ehhez képest az anyatej minták PACAP-szerű immunaktivitása, tehát

megközelítő PACAP-38 koncentrációja átlagosan tízszeres (5-20X) növekedést mutatott, értéke ca. 3500 fmol/ml-nek adódott (40.G ábra).

Az anyatej rendkívüli PACAP-38 koncentrációja a csecsemőkori táplálás fontosságára és a polipeptid korai neurális fejlődésben betöltött szerepére utalhat [241-244].



40. ábra: A PACAP-38 MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálatainak eredményei (A) PACAP-38 standard, (C) humán vérplazma, (E) humán anyatej tömegspektrumai.

MALDI PSD TOF/TOF tandem tömegspektrometriás eredmények (B) PACAP-38 standard, (D) humán vérplazma, (F) humán anyatej. (G) RIA eredmények PACAP-szerű immunreaktivitás kvantitatív meghatározásáról a plazma és anyatej minták vonatkozásában.

Jól ismert a PACAP meghatározó szerepe a fertilitás és receptivitás kialakulásában, az implantációban, valamint a korai embrionális és neonatális fejlődésben [244-247]. A PACAP reprodukciós folyamatokban betöltött biokémiai funkciójának és lokális megjelenésének felderítése érdekében nőgyógyászati és andrológiai minták MALDI tömegspektrometriás vizsgálatát végeztük el. Az analízisek során tüszőfolyadékot,

méhnyak váladékot, magzatvizet [VIII, LVII], szemínális plazmát és spermiumokat vizsgáltunk meg [LVI].

A tüszőfolyadék mintákat (n=40) 20 és 35 év közötti mesterséges megtermékenyítést (*in-vitro* fertilization, IVF) megelőző hormonális kezeléssel kiváltott petefészek stimulációt, illetve szuperoovuláció indukciót követően gyűjtöttük. A magzatvíz minták (n=25) a 16. magzati héten egyéb diagnosztikai célból amniocentézisen átesett 35. évnél idősebb édesanyáktól származnak. A méhnyakváladék mintákat (n=10) a ciklusuk luteális fázisában tartó 25-35 év közötti nőktől steril Schirmer papír segítségével gyűjtöttük.

Vizsgálatok előtt a tüszőfolyadékokat centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 5 perc), majd a felső fázis 90 µl-éhez 10 µl 72% (V/V) triklórecetsav (TCA) oldatot és 100 µl H₂O₂-ot adtunk. Ezután a keletkező csapadékot centrifugálással elválasztottuk (13000 fordulat/perc, 10 perc) és a felső fázis 1 µl -ét ZipTip C18 szilárd fázisú extrakcióval sómentesítve vittük fel a MALDI mintatartóra.

A magzatvíz minták 200 µl-ét 5 percig 10000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd savanyítás után (100 µl 1% TFA) újra leválasztottuk a keletkezett csapadékot (13000 fordulat/perc, 10 perc) és ZipTip C18 segítségével sómentesítve és tisztítva pipettáztuk a mintatartóra. Az elúció minkét esetben 3 µl acetonitril-0,1% TFA (50/50, V/V%) eleggyel történt.

A méhnyakváladék minták esetében (100 µl) azonos térfogatú acetonitril-0,1% TFA (5/95, V/V%) eleggyel ultrahang segítségével oldottuk fel a mintákat és így pipettáztuk a mintatartóra.

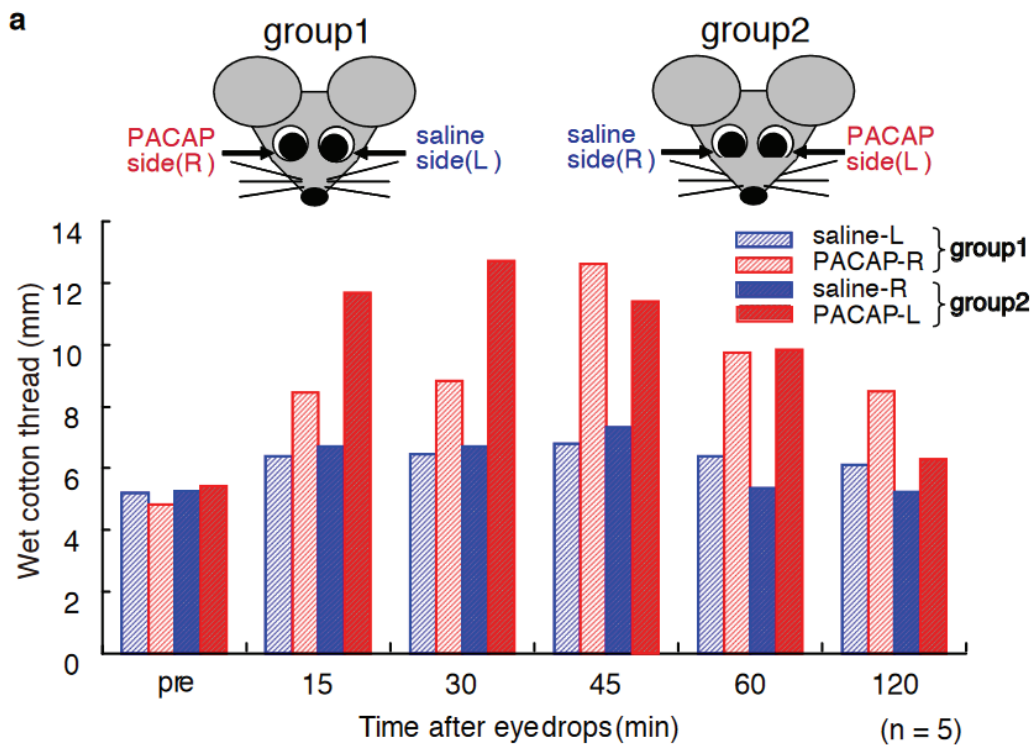
Mindegyik mintához 1-1 µl frissen készített szobahőmérsékleten telített CHCA mátrixoldatot pipettáztunk, majd a teljes kristályosodás után elvégeztük a MALDI TOF MS méréseket. Vizsgálataink a tüszőfolyadékokban detektálták a PACAP-38 megjelenését, a többi nőgyógyászati és andrológiai mintában nem volt kimutatható mennyiségben. Méréseink alapján a tüszőfolyadék PACAP-szerű immunreaktivitás alapján becsülhető RIA-val mért PACAP-38 koncentrációja 161,1±20,3 fmol/ml.

Tanulmányunk az első tömegspektrometriás bizonyítéka volt annak, hogy a PACAP-38 előfordul a petefészek tüszőfolyadékban és a vizsgálati körülmények között nem található meg a magzatvízben és méhnyakváladékban. Vizsgálataink mind a 40 stimulált női alany mintáiból kimutatta a PACAP jelenlétét. A tüszőfolyadék a fejlődő petesejt táptalajaként szolgál, és fontos a csírasejtek fejlődésének morfológiai és funkcionális integritása szempontjából. A PACAP-nak több funkciója is bizonyított a tüszőmirigy fejlődésében. A PACAP stádiumspecifikusan expresszálódik a nagy, érett tüszők granulózasejtjeiben az ovuláció előtt, de gyengébb expresszióját kimutattak az éretlen antrális és a preantrális tüszők falában is [248-250]. Megjelenik a fejlődő tüszőkben [251-253] és a sárgatestben [254]. A tüszőfolyadékban található PACAP a granulózasejtekből és/vagy a theca sejtekből származhat. Az, hogy a PACAP-38 valamennyi petefészek tüszőfolyadék mintában előfordul, a PACAP fontos fiziológias szerepére utal a fejlődő petesejtek metabolizmusában [VIII].

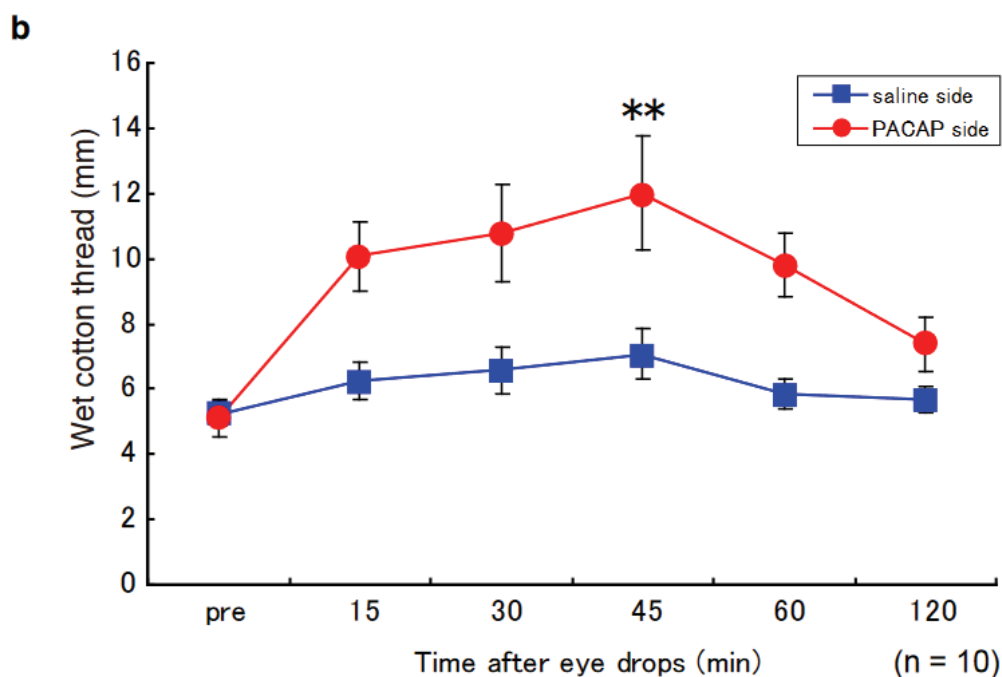
Az idegrendszeren kívül a PACAP jelentős mennyiségben jelenik meg a herékben [236], azonban az andrológiai mintákban (szemínális plazma, spermium) nem volt detektálható mennyiségben a PACAP-38. Kimutattuk, hogy PACAP^{-/-} KO egereknél a spermiumok

motilitása károsodott, illetve, hogy hozzáadott szintetikus PACAP-38 hatására a motilitási funkció javítható volt [LVI].

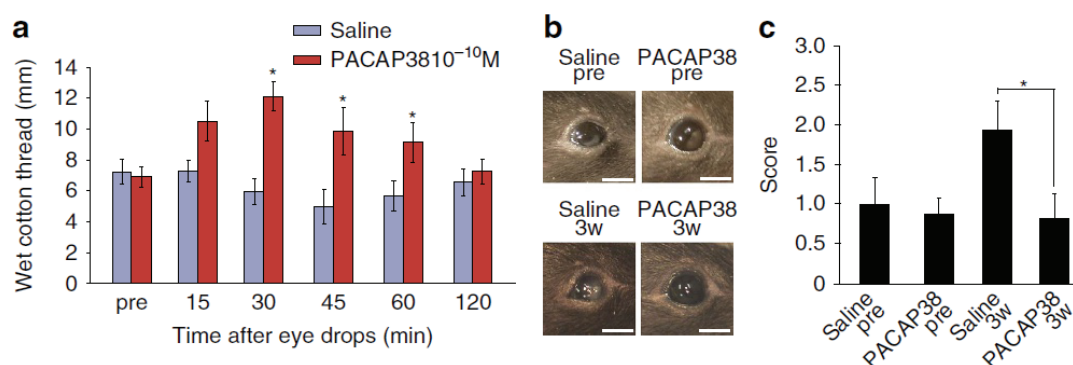
Kutatásaink során tanulmányoztuk a PACAP könny szekrécióra való hatását és az igen gyakori szárazszem szindróma (keratoconjunctivitis sicca) betegségre gyakorolt terápiás lehetőségeit. Kísérleteink bizonyították, hogy PACAP KO egerekben a szárazszem szindrómához hasonló tünetek alakulnak ki, úgy, mint a szaruhártya keratinizációja és a termelt könny mennyiségének csökkenése. Vizsgálataink alkalmával PACAP-38 standard, vad és PACAP^{-/-} KO egerek könny mintáit elemeztük MALDI TOF MS és nano-DESI Orbitrap MS segítségével. Munkánk eredményeként elsőként sikerült bizonyítanunk, hogy a könny endogén formában is tartalmaz PACAP-38-at, amely a génkiűtött állatoknál nem volt detektálható. A kísérleti állatok egyik szemét PACAP-38 tartalmú szemcseppel kezelve a patológiás elváltozások visszaszoríthatók voltak, a könnytermelés stimulálható volt (41a, 41b. és 42. ábrák) [XX].



41.a ábra: Egyoldalú PACAP szemcsepp-teszt hím vad típusú egereken. 1. csoport: PACAP38-kezelt jobb oldal és sóoldattal kezelt bal oldal; 2. csoport: sóoldattal kezelt jobb oldal és PACAP38-kezelt bal oldal (n=5 csoportonként).



41.b ábra: Összefoglaló mindkét kezelt csoport könny szekrécióját illetően (n=10 oldalanként, egyirányú ANOVA). A PACAP csak a kezelt oldalon indukálta a könny termelődését.

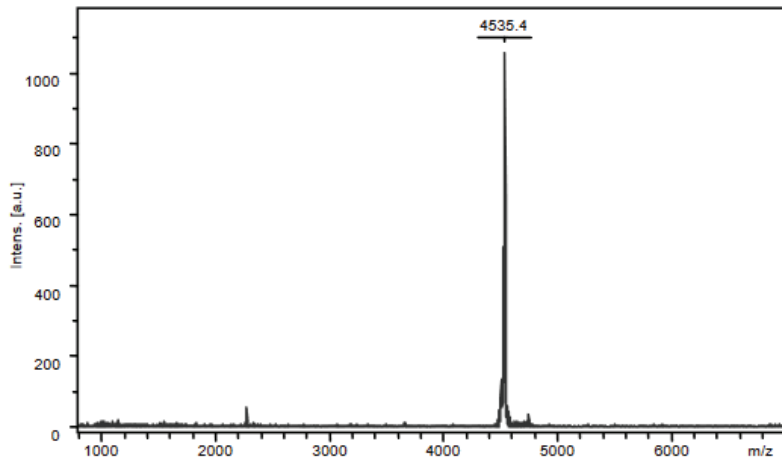


42. ábra: A PACAP-38 tartalmú szemcsepp hatása a PACAP^{-/-} KO nőstény egerek könny szekréciójára. **(a)** a könny szekréció mértéke sóoldat és 10⁻¹⁰ M PACAP-38 szemcsepp alkalmazása után (n=9 csoportonként). *P<0,05 a sóoldattal kezelt csoporthoz képest, **(b)** reprezentatív képek a szaruhártya felszínéről a szemcsepp alkalmazása előtt és után, **(c)** szaruhártya értékelése PACAP^{-/-} KO egerek PACAP szemcseppjének 3 héten keresztül történő alkalmazása előtt és után

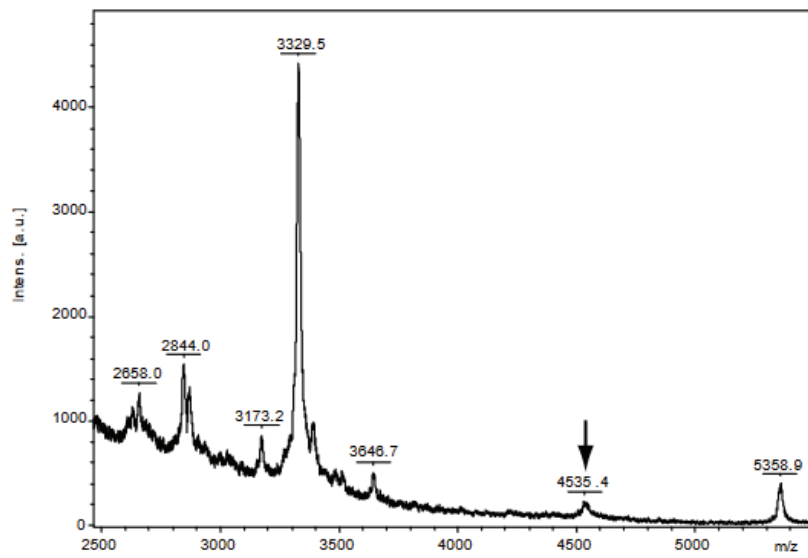
Méretskála: 2 mm. *P<0.05.

A könny mintákat tartalmazó Schirmer papírokat (n=5) peptidáz inhibitor jelenlétében (aprotinin) 100 µl acetonitril-0,1% TFA (5/95, V/V%) elegyben 5 percig ultrahangos fürdőben áztattuk. Az extrakciót követően a minták 1-1 µl-ét azonos térfogatú 23°C-on telített CHCA mátrix oldat jelenlétében a polírozott rozsdamentes mintatartóra pipettáztuk.

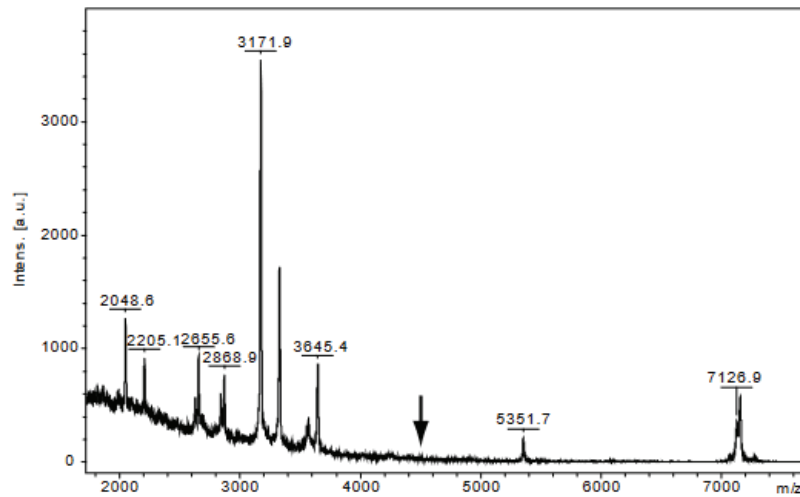
a



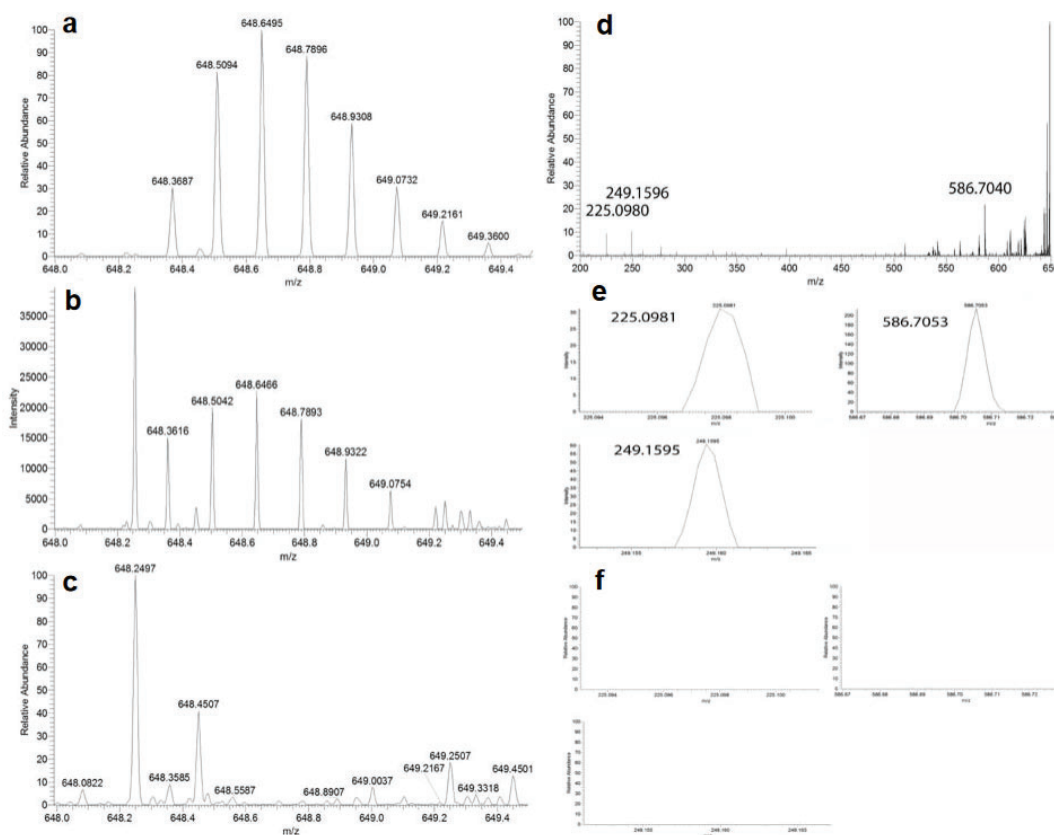
b



c



43. ábra: Egérkönyvek MALDI TOF MS vizsgálatainak reprezentatív eredményei. (a) A PACAP-38 standard (m/z 4535,4), (b) vad típusú és (c) PACAP^{-/-} KO egerek.



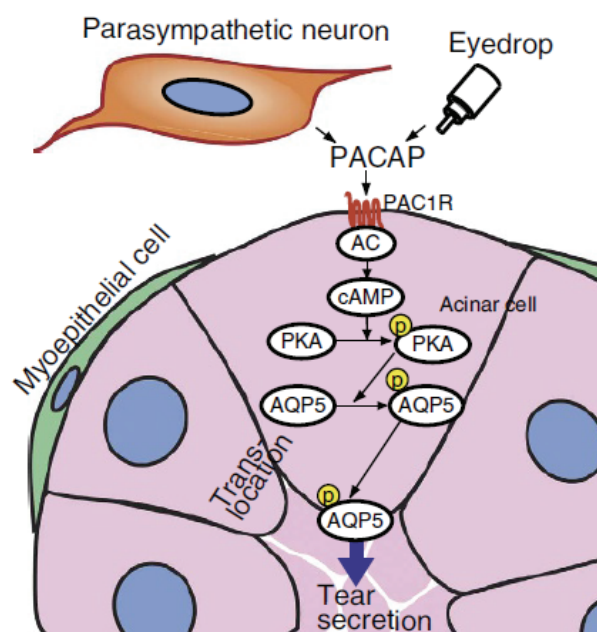
44. ábra: Az m/z $648,5 \pm 2$ nano-DESI SIM spektrum reprezentatív adatai **(a)** PACAP38 standard ($z=7$), **(b)** vad típusú egér minta, amely a PACAP-38 diagnosztikus csúcsokat mutatja, és **(c)** PACAP^{-/-} KO egér minta, amely nem tartalmaz PACAP-38-nak megfelelő csúcsokat. A 100%-os relatív ionintenzitás a standard esetében $2,8 \times 10^6$, a PACAP^{-/-} KO egérminta esetében pedig $1,1 \times 10^5$. Nano-DESI MS/MS spektrumok m/z $648,5 \pm 1$ prekursorion kiválasztása esetén **(d)** PACAP-38 standard esetében a három legintenzívebb fragmens m/z értékével, **(e)** három tömegspektrum nagyítva a vad típusú egérmintából származó három fragmension bemutatására, és **(f)** három tömegspektrum a **(b)** panelen szereplővel megegyező m/z tartományban, a PACAP^{-/-} KO egérmintából származó fragmensek nélkül.

A MALDI TOF MS vizsgálatokat az előbbieken ismertetett módon, lineáris detektorral pozitív módban végeztük el. Eredményeink igazolták a PACAP-38 molekulatömegére jellemző m/z 4535,4 tömegspektrometriás csúcs jelenlétét a referencia oldatok és a vad típusú állatok könnymintái esetében, míg a génkiütött (PACAP^{-/-} KO) mintákban a PACAP nem volt detektálható (43. ábra).

Nanoporlasztásos deszorpciós elektroporlasztásos ionizációt (nano-DESI) használtunk az MS/MS spektrumok felvételére közvetlenül a könnyeket tartalmazó Schirmer papírokról ($n=6$). A nano-DESI szonda két olvasztott szilícium-dioxid kapillárisból (ID 50 μm , OD 150 μm , Polymicro Technologies, Molex, Lisle, IL) állt, amelyek egymással 45°-os szöget zártak be. Az elsődleges és másodlagos kapillárisok között 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ áramlási sebességgel 2% (V/V) hangyasav tartalmú metanol-víz (9/1, V/V) elegyet áramoltattunk. A másodlagos kapillárison keresztül a mintával érintkező oldószer a tömegspektrométer

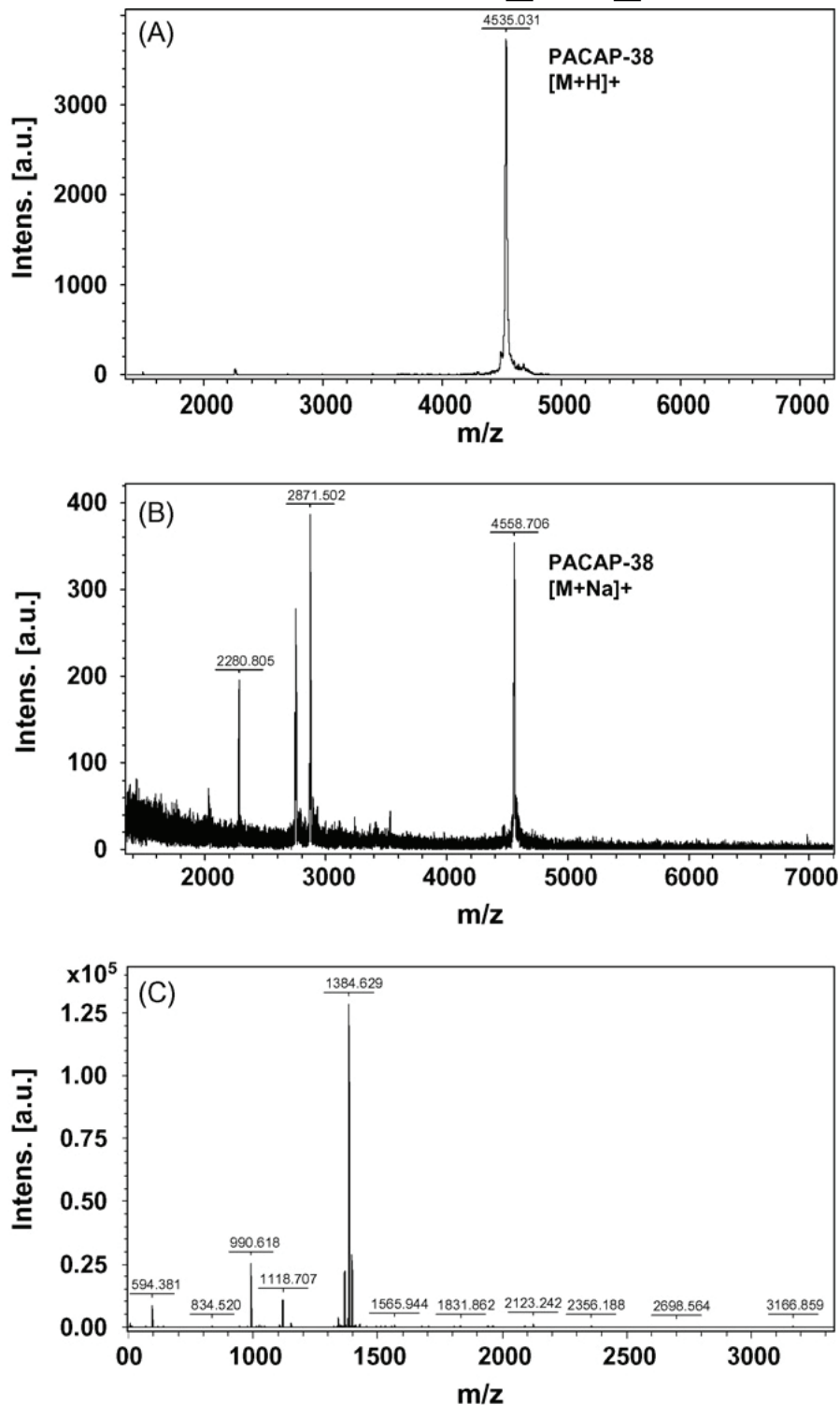
ESI forrásába jutott. A mintákat tartalmazó Schirmer papír felületét 10 µl 0,1%-os (V/V) TFA-val egy mikroszkóp tárgylemezen áztattuk, majd az üveglemezt motorizált mintamozgató asztalra helyeztük (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) és a nano-DESI szonda alá irányítottuk. Az anyagot nano-DESI szondával extraháltuk a Schirmer papír nedves felületéről, és QExactive Plus Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) elemeztük. A műszer spektrális felbontását 70000-re ($m/\Delta m$) állítottuk be és a vizsgálatok során 3 kV-os primer kapilláris feszültséget alkalmaztunk. A szelektív ionmonitorozást (SIM) m/z 648,5±2-re állítottuk, ami megfelel az általunk korábban nanoESI-vel detektált 7-szeresen töltött PACAP-38 ionnak ($z=7$). A CID tandem tömegspektrometriás vizsgálatoknál prekursorionként az m/z 648,5±1 értéket állítottuk be (44. ábra).

Eredményeink alapján a 45. ábrán sematikusan felvázolt PACAP, illetve PAC1 receptor függő könny szekréciós mechanizmust tartjuk valószínűnek.



45. ábra: A PACAP által kiváltott könnyelválasztás javasolt mechanizmusainak sémája [XX].

A könnyhöz hasonlóan steril Schirmer papíron gyűjtöttünk orrváladék ($n=10$) és nyál mintákat ($n=10$) 20 és 40 év közötti egészséges résztvevőktől, míg a csarnokvíz minták 60 és 85 év közötti betegek szürkehályog műtétje közben kerültek levételre. A mintákat peptidáz inhibitor jelenlétében (aprotinin) 100 µl acetonitril-0,1% TFA (5/95, V/V%) elegyben 5 percig ultrahangos fürdőben áztattuk. Az extrakciót követően a minták 1-1 µl-ét azonos térfogatú 23°C-on telített CHCA mátrix oldat jelenlétében a polírozott rozsdamentes mintatartóra pipettáztuk. A csarnokvíz minták és a mátrixoldat 1-1 µl-ét előkészítés nélkül vittük fel a rozsdamentes MALDI tálcára [VIII]. Ezekben a mintákban a PACAP-38 detektálására optimalizált körülmények között, nem volt detektálható a peptid jelenléte.



46. ábra: A PACAP-38 jelenlétének kimutatása patkány plazma mintában.

(A) PACAP-38 standard, (B) vérplazma a PACAP Na⁺ adduktjának kvázimolekulaionjával, (C) a vérplazma „on-plate” enzimatis emésztésből származó diagnosztikus PACAP triptikus peptidek MALDI TOF tömegspektruma.

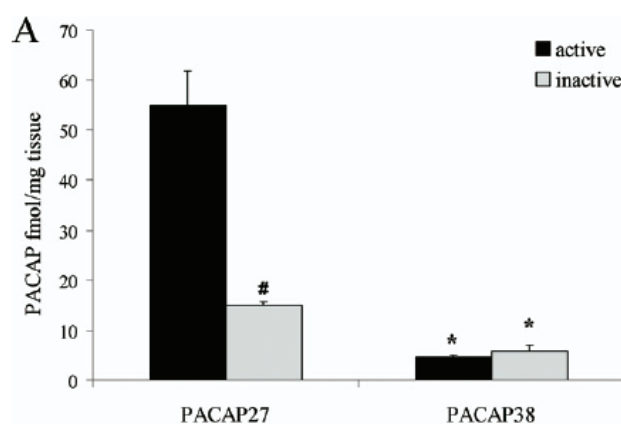
Patkány vérplazma mintában sikeresen detektáltuk a PACAP-38 molekulaionját (m/z 4535), azonban nagy mennyiségben mutattuk ki a PACAP-38 Na⁺ ionhoz kötődő adduktját is (m/z 4558). A PACAP-38 szérumban való jelenlétének további igazolásához mintáinkon „on-plate” triptikus emésztést végeztünk, majd a triptikus peptideket MALDI TOF/TOF vizsgálatokkal azonosítottuk (46. ábra). Ennek során a vérplazma mintákat

HPLC-t követő frakciógyűjtéssel tisztítottuk és a PACAP-38-at tartalmazó részletet a MALDI mintatartóra cseppentve ott 1 µl 5ng/µl-es tripszin (Promega, sequencing grade) oldattal emésztettük. Az emésztményt tartalmazó mintát CHCA mátrix jelenlétében m/z 500-5000 tartományon belül MALDI PSD TOF/TOF MS alkalmazásával elemeztük. Az azonosított triptikus peptideket a 10. táblázat foglalja össze. Vizsgálataink segítségével egyértelműen sikerült igazolnunk, hogy a PACAP 38 natív és Na⁺ addukt formában is jelen van a szérumban [XLVI].

10. táblázat: A vérplazma HPLC frakciógyűjtéssel kapott részletének „on-plate” triptikus emésztése után detektált peptidek és a PACAP-38 szekvenciájának in-silico (számítógép asszisztált) emésztéséből származó peptidek jellemző adatai.

tartomány	elméleti monoizotópos tömeg (Da)	detektált monoizotópos tömeg (Da)	szekvencia
31-34	594,336	594,381	YKQR
22-29	834,508	834,520	YLA AVL GK
22-30	990,610	990,618	YLA AVL GK R
21-30	1118,704	1118,707	KYLA AVL GK R
1-12	1384,613	1384,629	HSDGIFTDSYSR
1-14	1703,777	1703,779	HSDGIFTDSYSRYR
1-15	1831,872	1831,862	HSDGIFTDSYSRYRK

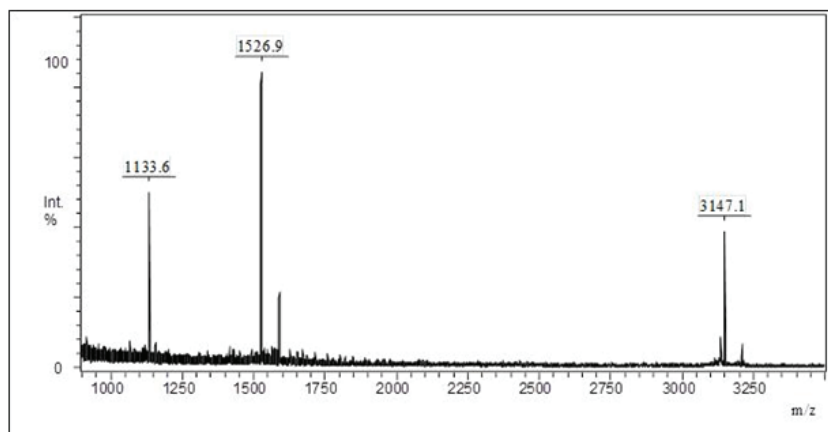
További vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a gerinctelen élőlények szervezetében a PACAP-27 detektálható nagyobb mennyiségben. Éti csiga (*Helix pomatia*) hemolimfájának és központi idegrendszerének MALDI MS és RIA vizsgálataival kimutattuk a PACAP aktivitás függő változását, amelyet a 47. ábra szemléltet [XLVII].



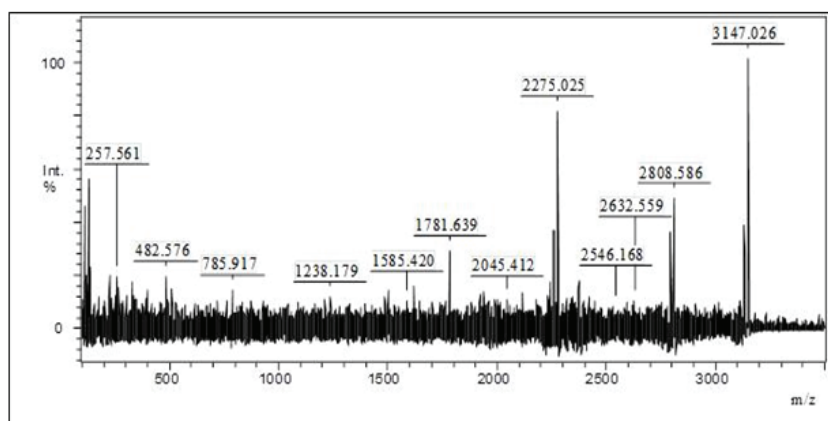
47. ábra: A PACAP mennyiségének változása az éti csiga évszakfüggő aktivitásának függvényében.

A vizsgálatok során a szívet tüvel átszúrtuk, miután eltávolítottuk az állat héját, és egyedenként körülbelül 1 ml hemolimfát (n=6) gyűjtöttünk egy előhűtött csőben, amit a felhasználásig jégen tároltunk. A központi idegrendszert (n=6) kimetszettük, hideg fiziológiás sóoldatot tartalmazó edénybe gyűjtöttük, majd SDS pufferben homogenizáltuk. A homogenizátumokat centrifugálással 13000 g-vel 10 percig 4°C-on tisztítottuk. A hemolimfa és CNS mintákat közvetlenül a MALDI mintatartóra pipettáztuk azonos térfogatú (1 µl) telített CHCA mátrix oldat jelenlétében (48. ábra).

A



B



48. ábra A PACAP-27 jelenlétének igazolása éti csiga hemolimfájából végzett MALDI TOF MS (A) és MALDI PSD TOF/TOF MS (B) vizsgálatok segítségével.

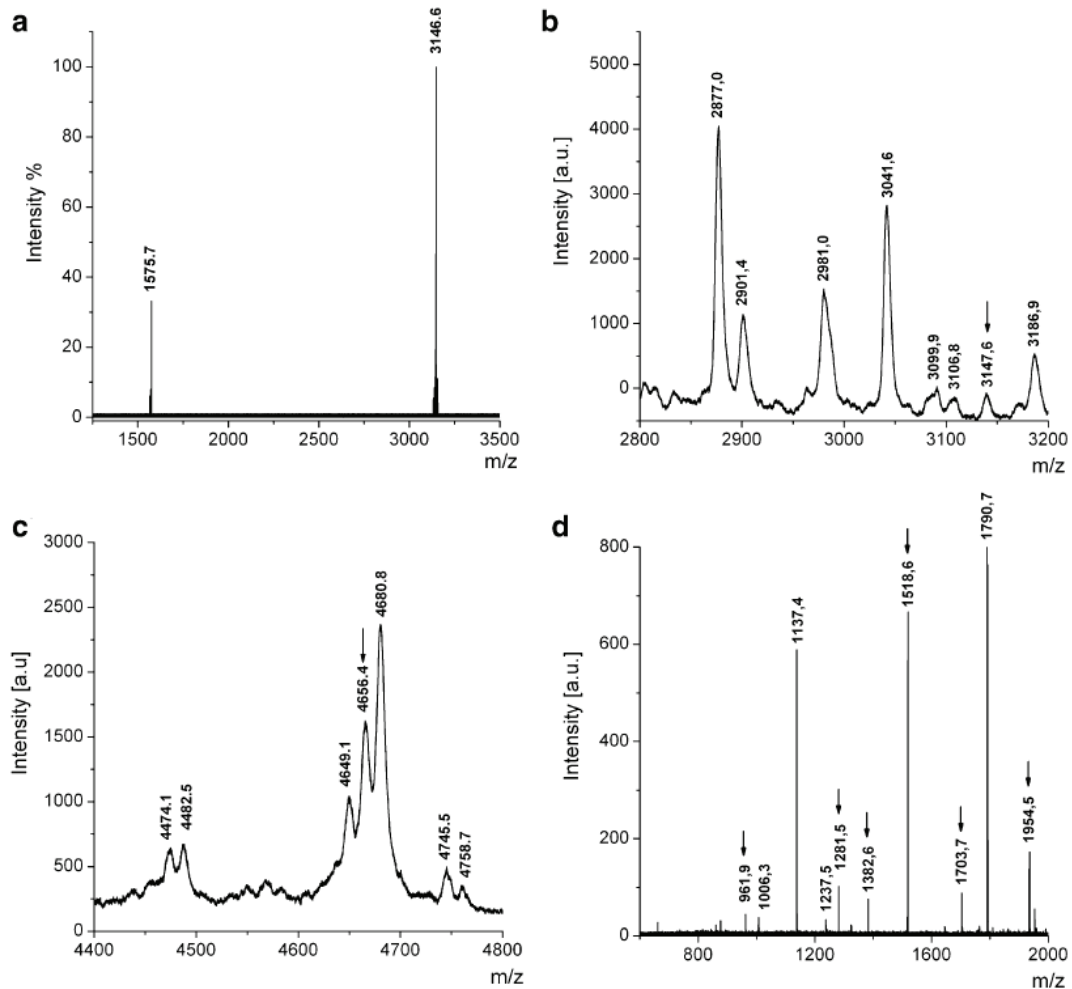
Az éti csiga mellett nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerét is vizsgáltuk annak érdekében, hogy feltárjuk a PACAP szerepét a tanulás és a memória kialakulásának molekuláris kaszkádszisztémájában [VII]. A *Lymnaea stagnalis* tócsiga értékes kísérleti modelleket szolgáltat a klasszikus kondicionálás top-down elemzéséhez, lehetővé téve számunkra, hogy új betekintést nyerjünk az asszociatív hosszú távú memória (long term memory, LTM) sejt és molekuláris mechanizmusaiába [255]. Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a PACAP jelen van-e a *Lymnaea* agyi ganglionjában (CG), az ajakidegekben és az ajakérzékelő területeken, a táplálék-megjutalmazás kondicionálásában részt vevő fő struktúrákban. Továbbá megvizsgáltuk, hogy a PACAP képes-e stimulálni az adenilát ciklázt (AC) és a cAMP-t a *Lymnaea* cerebrális ganglion mintákban, és hogy ez a hatás blokkolható-e a PACAP 6-38, általános PACAP-receptor inhibitorral és egy maxadilan antagonistával, a PAC1 receptor specifikus blokkolójával.

Az állatokat az angliai Sussex Egyetemen és a Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Kutatóintézetében tenyésztették. A csigákat Cu^{2+} -mentes vízzel töltött tárolótartályokban 18-20°C-on és 12 órás világos-sötét ciklussal tartottuk, *ad libitum* salátával és zöldség alapú haleledellel etettük (TETRA Werke, Melle, Németország). A kondicionálási vizsgálatok megkezdése előtt az állatok táplálék nélkül voltak 2 napig.

mark.laszlo_314_25

A tömegspektrometriás méréseket felnőtt példányok agyi ganglionjain végeztük. Öt agyi gangliont (cerebrális ganglion, CG) feldaraboltunk és hideg fiziológiás sóoldatot tartalmazó edénybe gyűjtöttünk, majd 1 ml 10 mM ammónium-foszfátban (Sigma) homogenizáltuk Polytron (PT-10) segítségével. A homogenizátumokat centrifugálással tisztítottuk 13000 g-vel 5 percig 4°C-on, és a felülúszót (500 µl) Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük. A mintákból 50 µl-t megsavanyítottunk 50 µl 1%-os (V/V) trifluor-ecetsavval, majd centrifugálás (8000 g) után a felülúszót ZipTipC18 pipettahegyekkel tisztítottuk.

A minták enzimatisz emésztésénél a tripszin-oldattal (100 ng/µL 25 mM Tris-HCL-ben) 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Emésztés után a peptideket ZipTipC18 pipettahegyekkel extraháltuk, 0,1%-os (V/V) hangyasavas mosással sóalanítottuk, majd 50%-os (V/V) acetonitril-0,1%-os (V/V) hangyasavval a MALDI mintatartóra eluáltuk. Vizsgálataink eredményeként elsőként mutattuk ki PACAP-szerű peptid jelenlétét *L. stagnalis* idegrendszerében, illetve az AC/cAMP/PKA aktivációban való lehetséges szerepét a klasszikus kondicionálás során. A tintahal központi idegrendszerének PACAP38-szerű molekulájának szekvenciája alapján PACAP-38-szerű molekulát tudtunk azonosítani m/z 4656,4-nél a *Lymnaea* CG-mintákban (49. ábra). A protonált kvázimolekuláris ioncsúcs mért átlagos tömege m/z 4656,4 közel volt a többi gerinctelen PACAP38-szerű molekulaszekvenciára számított 4656,3 Da értékhez (Q8IU38 NCBI GeneBank és ExPASy). A PACAP-szerű peptid azonosítása mellett biokémiai bizonyítékokat találtunk az AC-aktiváló hatására a *Lymnaea* központi idegrendszerében. A biokémiai kísérletekben *Lymnaea* CG homogenizátumait PACAP-38-cal inkubáltuk. Megközelítőleg 82%-os növekedést értünk el cAMP-szintjében, ami arra utal, hogy a PACAP hasonló hatást fejt ki *Lymnaeában*, mint gerincesekben. A PACAP hatásához hasonlóan a maxadilan, egy specifikus PAC1-R agonista, valamint a VIP, a VPAC1 és VPAC2 receptorok agonistája, amely szintén köti a PACAP-ot, szintén fokozhatja a cAMP szintézist 47%-kal, illetve 79%-kal. A PACAP cAMP-stimuláló hatása megközelítőleg 50%-ban blokkolható a PACAP 6-38 vagy egy maxadilan antagonistá alkalmazásával. A biokémiai eredmények megerősítették, hogy a PACAP-szerű peptidek a PACAP receptorokon keresztül növelhetik a cAMP szintjét az agyi ganglionok neuronjaiban. Összefoglalva, a PACAP, VIP és maxadilan aktiválhatja az AC-t és jelentősen növelheti a cAMP szintet. A PACAP-ra adott válasz fokozódását a PACAP 6-38 általános PACAP-receptor-blokkoló és egy specifikus PAC1 antagonistá egyaránt blokkolhatja. Ezek alapján a PACAP-szerű peptidek a *Lymnaea* agyi ganglionokban expresszált PAC1 és VPAC receptorokon keresztül egyaránt hatnak.



49. ábra: PACAP-szerű peptidek azonosítása MALDI-TOF tömegspektrometriával a *Lymnaea stagnalis* cerebrális ganglionokban. **(a)** szintetikus PACAP-27 spektrumja, **(b)** a PACAP-27 jelenlétének igazolása az agyi ganglion homogenizátumban, **(c)** a feltételezett PACAP-szerű peptid m/z 4656,4 ioncsúcsa, **(d)** PACAP triptikus peptidjeinek diagnosztikus tömegspektrometriás csúcsai.

5.2.2. Fehérje expresszió vizsgálata PACAP-hiányos (PACAP KO) egérmodellben [XV]

Az endogén PACAP-ot nem tartalmazó egerekkel kapcsolatos tudásanyag még hiányosnak mondható, de úgy tűnik agyi morfológiai különbségek csak kis mértékben figyelhetők meg mind makroszkópos, mind mikroszkópos szinten [256]. Azonban, ha ezeket az egereket valamilyen káros behatás éri, például hipoxia/ischémia, trauma vagy valamilyen toxikus behatás, a PACAP génkiűtött állatok szignifikánsan nagyobb sérülést szenvednek el. Ez bebizonyosodott több kísérletes modellben is, például autoimmun encephalomyelitis [257], agyi ischémia [258], retina ischémia, és retina excitotoxicitás [259, 260]. Ezenkívül az endogén PACAP-ot nem tartalmazó egerekben csökkent regenerációs képességet figyeltek meg a gerincvelő és perifériás idegek sérülésekor [261, 262]. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a háttérben olyan biokémiai változások állnak, amelyek képesek kompenzálni e hatásokat PACAP hiányában, abban az esetben, ha nem éri különösebb stresszhatás az állatokat. Azonban, e kompenzáló hatások nem elegendőek

a stresszhatások, sérülések által kiváltott folyamatok kivédésére és a celluláris védelem fenntartására.

A CD-1 PACAP KO egértörzs kialakítását a PTE ÁOK Anatómia Intézetében végeztük, tíz generációra visszamenőleg keresztezve a CD-1 KO egér populációkat. Az agyi fehérjeprofíl meghatározásához vad típusú (PACAP^{+/+}, n=5) és homozigóta KO (PACAP^{-/-}, n=5) egereket használtunk fel. *Ad libitum* táplálkozhattak, 12 óránként váltakozó nappali és az éjszakai körülményeket biztosítottunk számukra.

Munkánk során a vad típusú és a PACAP KO állatok agyát izoflurán anesztéziában távolítottuk el. Az agymintákból a következő 6 régiót preparáltuk ki: frontális kortikális régió, temporális lebeny–diencephalon komplex, mesencephalon, az agytörzs többi része (pons és medulla), valamint kisagy. 50 mg preparált agyrégióhoz 200 µl lízispuffert adtunk (2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7,5). Az agymintákat szöveti homogenizátorral homogenizáltuk, majd 6x10 másodperces sejtfeltárást végeztünk nagy energiájú ultrahangos feltárával (UIS250V-Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Németország). A 10 másodperces ciklusok között jeges hűtést alkalmaztunk. A feltárt mintákat 10000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A tiszta felülúszókat új csőbe pipettáztuk át, majd 100 µl -30°C-os kloroformot adtunk a mintákhoz. A kloroformot a fehérjék kicsapásához, ill. a nagy mennyiségben jelenlévő lipidek eltávolítására alkalmaztuk. A kloroformos kétfázisú rendszert néhány másodpercig nagy sebességgel kevertettük egy emulziós rendszer eléréséig, hogy megfelelő érintkezési határfelület alakuljon ki a kellő minőségű fehérjekicsapás eléréséhez. 3 percig folytattuk a fehérje kicsapást kis energiájú ultrahangos fürdőn, ami biztosította az emulziós rendszer fennállását. A vizes és a szerves fázist 4000 g-n 5 percig történő centrifugálással szeparáltuk. A teljes minta-előkészítési folyamat alatt LoRetention pipettahegyet és LoBind Eppendorf csöveket (Eppendorf, Wien, Ausztria) használtunk, hogy elkerüljük a fehérjevesztést. Mindkét fázist kipipettáztuk, majd a kloroform maradványokat Speed Vac koncentrátor (Concentrator Plus, Eppendorf) segítségével eltávolítottuk. A fehérjekicsapás eredményességét a vizes és szerves fázisok esetében MALDI TOF tömegspektrometriás (lineáris mód, pozitív ionizáció, 10 mg/ml SA, acetonitril/0.1 % TFA, 1/2 v/v%) vizsgálatával ellenőriztük. Amennyiben az ellenőrző vizsgálat során nem találtunk oldatban lévő fehérjét, a kloroform mentes fehérjét - 80°C-on tároltuk a további feldolgozásig.

Az Agilent 2200 TapeStation rendszerhez (Kromat Kft., Budapest, Magyarország) tartozó minta feldolgozási protokollt követve P200-as puffer oldatokat készítettünk a minta-előkészítéshez. Két-két µl P200-as festő és jelölő oldathoz 2-2 µl mintát vagy molekulatömeg standardot adtunk, majd 7 percig 75°C tartottuk az oldatokat. A keverékeket P200-as redukáló oldattal 5 percig 75°C-ra történő melegítésével denaturáltuk, majd 2 µl P200 nem redukáló oldatot adtunk az összes mintához és a tömegstandardhoz. Az oldatokat kevertettük, centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszókat a 2200 TapeStation rendszerbe vittük át. A vezérlést és a szemikvantitatív kiértékelést a 2200 TapeStation rendszerhez tartozó szoftverrel végeztük el.

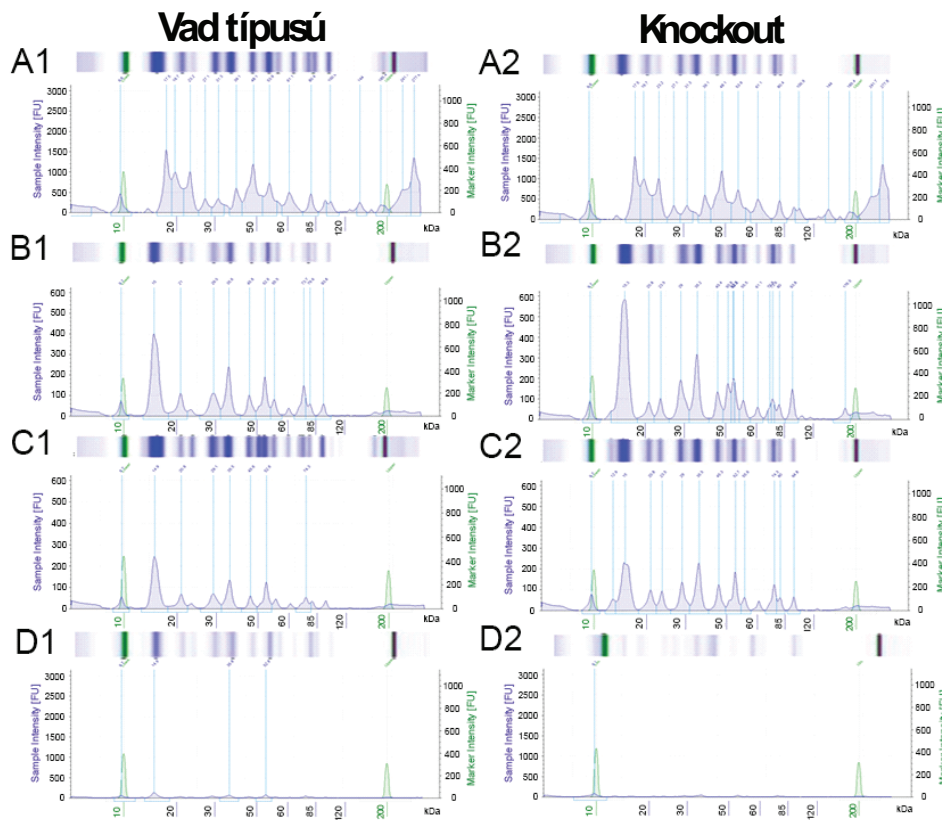
A 1D gélelektroforézishez az agymintákat 1 M Tris/HCl pufferben homogenizáltuk, (pH: 8,0), ami 0,5 mM EDTA-t, 0,7 mM beta-merkaptóetanolt és 10% (V/V) SDS-t is tartalmazott. Homogenizálás után a mintákat 5 percig főztük, majd 8000 g-n 10 percig centrifugáltuk. 12%-os (m/V) poliakrilamid gélben Laemmli módszere szerint SDS

mark.laszlo_314_25

jelenlétében gélelektroforézist (PAGE) végeztünk. Molekulasúly standardként ProSieve™ QadColor™ fehérjemarkert alkalmaztunk 4,6–300 kDa közötti tartományban. A gélek festéséhez R-250 Coomassie Brilliant Blue oldatot használtunk, amely 5% (V/V) ecetsavat és 16,5% (V/V) metanolt tartalmazott. A géleket Quantity One (Bio-Rad, Budapest) szoftverrel értékeltük ki. Az érdekes fehérje sávokat szikepengével kimetszettük a gélből, majd háromszor tíz percig mostuk 200 µL 50 mM ammóniumbikarbonát (pH: 8,3) tartalmazó 50% (V/V) acetonitril oldattal. A fehérjéket 50 µL 10 mM DDT-vel (50 mM ammóniumbikarbonát pufferben) 1 órán keresztül 55°C-on redukáltuk, majd ezt követően 50 µL 55 mM jódacetamid oldattal (50 mM ammóniumbikarbonát pufferben) alkiláltuk. A gél darabokat Speed Vac koncentrátorral szobahőmérsékleten megszárítottuk, majd a fehérjéket módosított tripszinnel (Promega, Madison, WI, USA) 37°C-on egy éjszakán át tartó inkubálással megemésztettük (tripszin koncentráció: 5 ng/µl 50 mM-os ammóniumbikarbonát oldatban, pH=8,3). A keletkezett triptikus peptideket 50 µl vizes acetonitriles hangyasavas oldattal (44/50/6 V/V/V%) eluáltuk, majd liofilizáltuk az oldatokat és a további feldolgozásig -80°C-on tartottuk a mintákat.

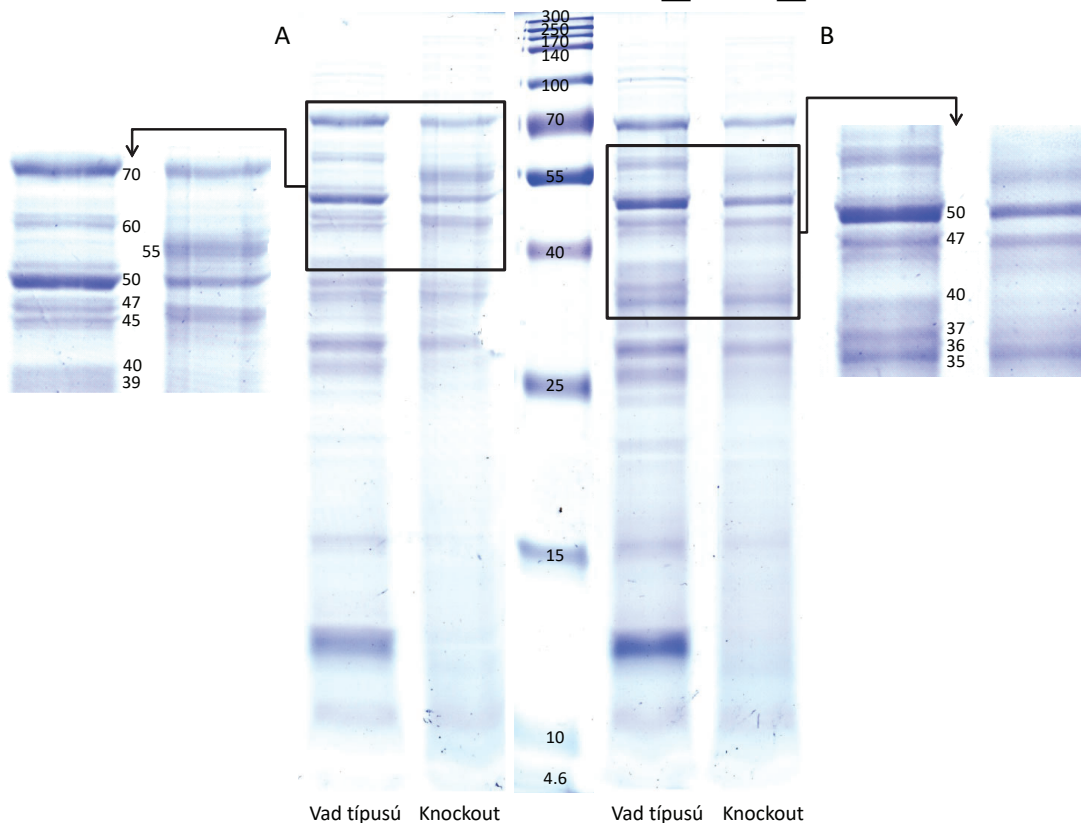
A 2D gélelektroforézishez az agymintákat 8 M urea, 50 mM DTT, 4% (V/V) CHAPS, 0,2% (V/V) amfolit és 0,0002% (V/V) brómfenol kék feltáró pufferben homogenizáltuk, amely oldatot az IPG csík rehidrálásához is használtuk. A mintákat kevertettük, majd 10 percig 10000 g-n centrifugáltuk, hogy elkülönítsük a szövettörmeléket. Rehidratált IPG csíkon (7 cm, lineáris gradiens pH 4–7 között) elvégeztük a felülúszók izoelektromos fókuszálását, PROTEAN IEF rendszer (Bio-Rad, Budapest) használatával. A következő beállításokat használtuk: 250 V 20 percig, 4000 V 2 órán keresztül és 2,5 óra alatt 4000 V-ról 10000 V-ra emeltük a feszültség értéket. Az átfolyó áram 50 µA/csík volt. Az izoelektromos fókuszálás után a gél csíkokat -80°C-n tároltuk. A második dimenzióhoz a gél csíkokat 10 percig egyensúlyi pufferben (6 M urea, 2% (V/V) SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20% (V/V) glicerín nagy tisztaságú desztillált vízben), inkubáltuk, amely 2% (m/V) DTT-t tartalmazott. A következő inkubáció azonos összetételű pufferben történt 10 percig, amely 2,5% (m/V) jódacetamidot tartalmazott. A gél-csíkokat SDS futtató pufferrel mostuk és Laemmli módszere szerint 12%-os (m/V) poliakrilamid gélben futtattuk. A géleket PharosFX™ (Bio-Rad, Budapest) kép szkennel segítségével rögzítettük és PDQuest™ 2-D analízis szoftverrel elemeztük. Minden futtatást háromszor végeztünk el. A gélek festését és az érdekes fehérjék kivágását, emésztését a bemutatott egy dimenziós fehérje elválasztás protokolljai szerint végeztük.

A különböző agyrégiók (frontális kortikális régió, temporális lebeny–diencephalon komplex, mesencephalon, az agytörzs többi része [pons és medulla], valamint kisagy) proteomikai profiljának eredményeit az 50. ábra mutatja. A frontális kéreg (50. ábra A1, A2) és a híd-medulla komplex (50. ábra B1, B2) agyi régiók nem mutattak jelentős fehérje expressziós különbségeket a vad típusú és a KO egyedek között. Ellenben a mesencephalon (50. ábra C1, C2) és a temporális lebeny–diencephalon komplex (50. ábra D1, D2) fehérjemintázatában detektálható különbségek voltak kimutathatók.



50. ábra: A vad típusú (1) és a PACAP KO (2) egér agy minták fehérje térképe az Agilent 2200 TapeStation rendszer használatával. (A) cortex, (B) hídmedulla komplex, (C) mesencephalon, (D) temporális lebeny-diencephalon komplex.

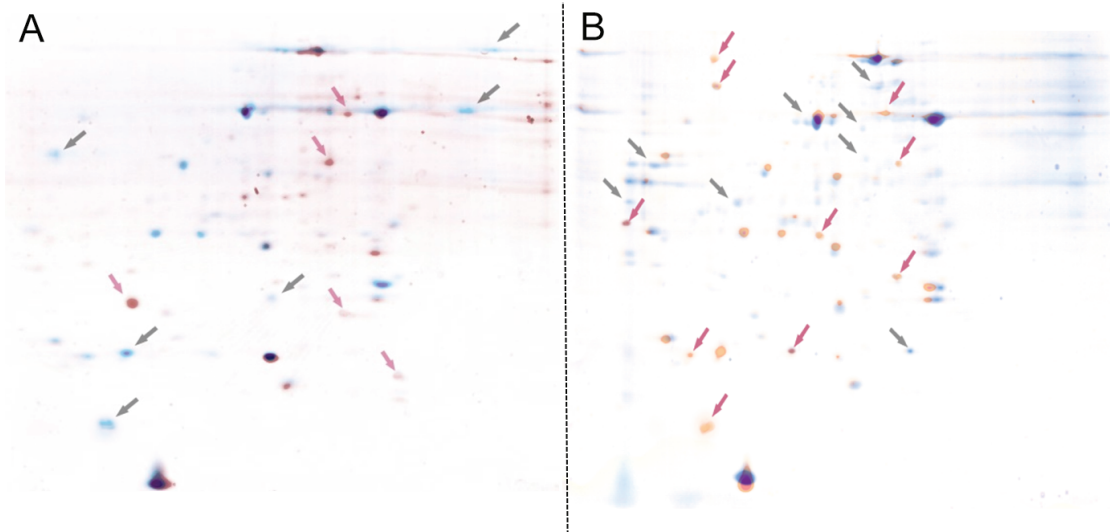
Fehérjeanalitikai eredményeinkből kiderült, hogy határozott különbség figyelhető meg a PACAP-hiányos egerek és a vad típus fehérjekészletét tekintve (51. és 52. ábrák). Vizsgálataink rávilágítottak a PACAP-hiányos egerek növekedett sebezhetőségére és az öregedés fokozott mértékére. A fehérjék egy csoportja, amelyekben különbségeket találtunk a két populáció között, szerepet játszik az oxidatív stressz kivédésében és az antioxidáns kapacitás fenntartásában. E fehérjéknek csökkent szintjét detektáltuk a PACAP KO egerekben.



51. ábra: Mesencephalon (A) és a temporális lebeny-diencephalon komplex (B) régiók egydimenziós SDS-PAGE képe. Az inzertek a legnagyobb különbségeket mutató gélrégiókat mutatják. Az A és a B panelek esetében is a bal oldali gél mutatja a vad típusú minta gélképét, míg a jobb oldali a PACAP KO mintáét.

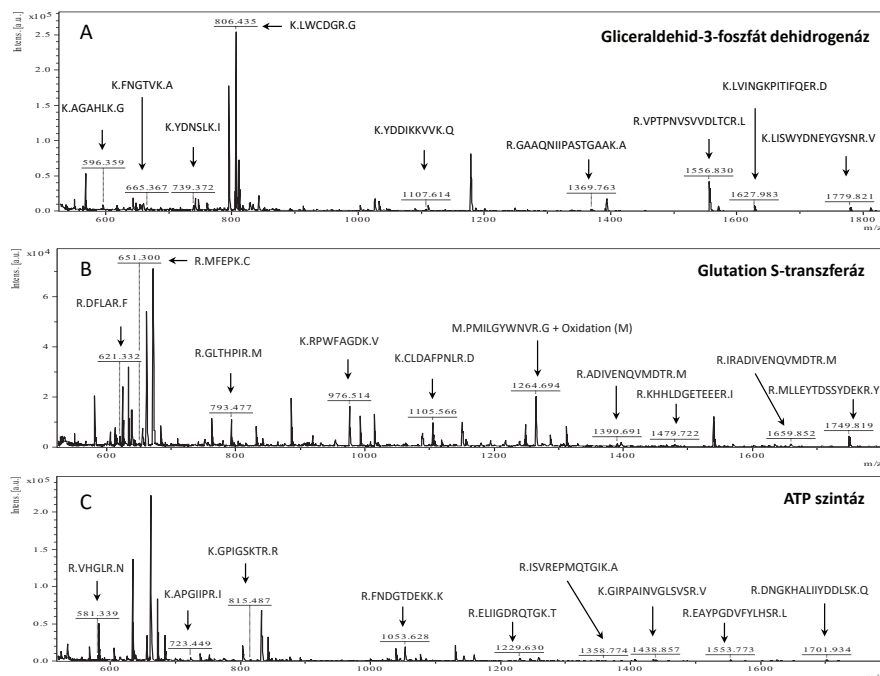
A peptidilprolil izomeráz A (PPIase), például kulcsszerepet játszik a hő-sokk fehérjék által indukálta stressz válaszban. A glutation S-transzferáz fontos a detoxifikációban és a már említett antioxidáns kapacitás fenntartásában.

Eredményeink összhangban vannak azon korábbi megfigyelésekkel, amelyek azt mutatták, hogy a PACAP-hiányos egerekben fokozott oxidatív stressz hatásra emelkedett malondialdehid-, illetve csökkent glutation és szuperoxid-dizmutáz szint figyelhető meg [263, 264]. Továbbá, míg a fiatal korban a PACAP KO és a vad típusú egérpopulációk szérum antioxidáns kapacitása és a szérum reaktív szabadgyök szintje között nem figyelhető meg különbség, idős egerek összehasonlításánál csökkent antioxidáns kapacitás és fokozott reaktív szabadgyök termelődés figyelhető meg a génhiányos állatokban [265]. Egy 2012-ben publikált tanulmányban megvizsgálták a PACAP indukálta változásokat agyi ischémiában [266]. A kutatók az antioxidáns hatású molekulák szintjének emelkedését figyelték meg PACAP kezelés hatására. Egy korábbi tanulmányban PACAP kezelés alkalmazását követően a hő-sokk fehérje-27 expressziójának emelkedését, míg a neurotoxikus hő-sokk fehérjék expressziójának csökkenését figyelték meg [267].



52. ábra: 2D gélelektroforézis eredményei a mesencephalon régió **(A)**, és a temporális lebelny-diencephalon komplex régió **(B)** mintáiból. A vad típusú és a PACAP KO minták 2D gélképeit egymásra vetítettük. A piros nyilak mutatják a vad mintákból, míg a kék nyilak reprezentálják a KO mintákból származó fehérje különbségeket.

Mindezek, az említett korábbi eredmények, megfigyelések összhangban állnak eredményeinkkel és következtetéseinkkel, hogy mind az endogén, mind az exogén PACAP jelenléte egy fontos molekuláris faktor az oxidatív stressz kivédésére szolgáló mechanizmusok megfelelő működéséhez.



53. ábra: Néhány azonosított fehérje triptikus peptidjeinek MALDI TOF MS reprezentatív tömegspektrumai. **(A)** glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz, **(B)** glutathion S-transzferáz, **(C)** ATP szintáz.

11. táblázat: A vad típusú és PACAP KO állatok agyi mintáiból azonosított fehérjék és azok expressziós változásai és biológiai funkciói.

NCBI Kód	Fehérje Neve	Vad	KO	Biológiai funkció	MW [kDa]	Mascot Score	SC [%]
gi 498752597	hemoglobin beta-1 alegység	+	-	oxigén transzport	15,8	111,0	88,4
gi 6679439	peptidilprolin izomeráz A	+	+↓	katalitikus enzim, interakció HSP-kkel	18,0	95,3	66,5
gi 6754084	glutathion S-transzferáz Mu 1	+	+↓	detoxifikáció	26,0	91,1	63,3
gi 407261468	citokrom c oxidáz alegység 1	+	+	mitochondriális légzési lánc	28,9	67,5	50,0
gi 74224797	malát dehidrogenáz 1, NAD izoforma	+	+↓	katalitikus enzim	36,5	70,5	43,7
gi 55153885	Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz	+	+	glikolitikus enzim	35,8	89,1	42,9
gi 148677501	ATP szintáz, izoforma	-	+	ATP szintézis	54,6	96,4	39,2
gi 7305027	enoláz 2, gamma neuron	+	+↓	glikolitikus enzim	47,3	105,0	38,9
gi 6671539	aldoláz 1, A izoforma	+	+↓	glikolitikus enzim	39,3	74,3	31,6
gi 387106	aspartát aminosztransferáz	+	+↓	aminosav metabolizáló enzim	46,2	81,7	31,0
gi 148704587	leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó 9 izoforma	+	+↓	fehérje szerkezeti motívum	81,7	63,4	25,1
gi 42561824	MITF fehérje	+	+	transzkripció faktor	38,6	83,7	33,8
gi 114326546	foszfoglicerát mutáz 1	+	+↓	glikolitikus enzim	28,8	61,0	43,7
gi 13097483	Tub2 fehérje	-	+	szerkezeti fehérje	34,0	61,3	26,2
gi 359807367	piruvát kináz, izom izoforma M1	+	+↓	glikolitikus enzim	57,9	135,0	36,2
gi 26340966	albumin 1	+	+↓	vér kolloid ozmotikus nyomásszabályzás	68,7	106,0	34,5
gi 914317	neurofascin	+	+	sejt adhéziós molekula	9,5	60,9	33,7
gi 74189848	spektrin alfa lánc	-	+	eritrocita szerkezeti fehérje	97,8	76,8	25,5
gi 51313	Hisztón (H1) domén	+	+↓	Hisztón fehérje	20,8	65,7	64,9
gi 74188189	akonitáz 2	+	+↓	katalitikus enzim	85,3	114,0	33,2
gi 148669535	vinculin, izoforma	-	+	citoszkeletális fehérje	123,8	68,0	18,7
gi 81882894	Szecretin receptor	+	+↓	G-fehérje kapcsolt receptor	50,9	62,1	15,0

A fehérjék egy másik csoportja, amelyben jelentős különbségeket találtunk a két populáció agyi fehérje összetételében, a glikolitikus enzimek csoportjába tartozik. A vizsgálatok során azonosított fehérjéket és azok jellemző paramétereit a 11. táblázat mutatja. Malát-dehidrogenáz 1, enoláz 2, aldoláz 1, foszfoglicerát-mutáz 1 (PGM) és piruvát-kináz (PK) szintjének csökkenését, míg az ATP szintáz szintjének emelkedését figyeltük meg (53. ábra). Hasonlóan az oxidatív stresszmarkerekhez, a glikolitikus enzimek változásai is összhangban állnak a Hori munkacsoportja általi megfigyelésekkel [266], hogy az exogén PACAP befolyásolja a glikolízisben szerepet játszó enzimeket és a PACAP kezelés pozitívan hathat az energia homeosztázis fenntartására és védelmet biztosíthat az ischémiás sérülésekben. Ezen eredmények megerősítik, hogy az endogén PACAP szükséges a megfelelő energiaháztartás fenntartásához. Ezen szabályozási mechanizmusnak hiányában zavar áll fenn az energiaegyensúlyban és így sebezhetővé válik a szervezet az ártalmas ingerekre (hipoxia, ischémia, öregedés, toxinok, neurodegeneratív kórképek). Ezek az eredmények összhangban állnak azzal a tanulmánnyal, amelyben arról számoltak be, hogy ennek az enzimatisz gőpezetnek a stimulálása neuroprotektív hatással van a hipoxia állapotában [268].

Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP-hiányos állatokban az ATP-szintáz szint emelkedése egy kompenzációs mechanizmus eredménye lehet, mely a sérült

energiaegyensúly kompenzálására szolgál intakt vagy stresszmentes körülmények között. Ez korábbi tanulmányok megfigyeléseivel is összhangban áll [265], amelyekben már leírták, hogy ehhez hasonló kompenzáló mechanizmusokat találtak fiatal génkiűtött egerekben oxidatív stressz kiváltásakor, viszont ezt a mechanizmust időskorú egyedekben nem figyelték meg.

5.2.3. Évszakfüggő neuropeptidek azonosítása hibernáció során [IV]

A gerinces és gerinctelen faunában is megfigyelhető a hibernáció jelensége. A külső körülmények, mint például a környezeti hőmérséklet, páratartalom, illetve a táplálék mennyiségének csökkenése kiválthatja a metabolikus depressziót és a nyugalmi állapot kialakulását. Számos gerinctelen állatfaj, köztük a szárazföldi csigák az alacsony hőmérsékletre, a kedvezőtlen fényviszonyokra és az alacsony páratartalomra hetekig vagy akár hónapokig tartó nyugalmi időszakokkal reagálnak. A csigák téli inaktivitása során a leginkább vizsgált változások közé tartoznak az enzimek foszforilációjának hipometabolizmus okozta változásai [269] és a fehérjék foszforilációs mintázatának változásai [270]. Ramnanan és munkatársai a Na/K ATP-áz erősen csökkent aktivitását figyelték meg a represszált metabolikus állapot során különböző csigákban [271]. A hibernáció a neuronok elektromos aktivitásának csökkenését [272], az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} koncentráció növekedését [273] és különböző krioprotektív anyagok, például glicerín és glükóz felhalmozódását is okozza [274]. A neurotranszmitterek szintén fontos szerepet játszhatnak a metabolikus depresszió szabályozásában mind a gerinceseknél, mind a gerincteleneknél. Több bioaktív aminosav és metabolitja (szerotonin - 5HT, dopamin - DA, 5-hidroxi-indol-3-acetát - 5-HIAA) szerepét is vizsgálták téli álmat alvó csigákban. Kimutatták, hogy az 5HT és az 5-HIAA szintje az agyban és a szívben a hibernáció első két hónapjában megemelkedik, majd ezt követően jelentős csökkenést mutat. A dopamin, valamint annak metabolitja, a homovanillinsav és a GABA szintje nem változik jelentősen a hibernáció első két hónapja alatt, de a DA szintje ezt követően csökken [275-277]. Másrészt az 5HT-immunpozitivitás csökken a neuropilekben, és nő az agyi ganglionok neuronjaiban a hibernáló csigában [278]. Összességében úgy tűnik, hogy az 5HT egy kulcsfontosságú vegyület, amely felkészíti a csigákat a hibernációs állapotba kerülésre és annak fenntartására [277].

A kalmodulin, a citoszkeletális komponensek és a foszfatázok változásait is megfigyelték a téli álmat alvó csigákban, ami visszafogott neurotranszmisszióra és neuromodulációra utal [279]. Az anyagcsere általános csökkentése az állatok általános stratégiája a hibernáció során a szélsőséges környezeti stressz leküzdése érdekében. Az anyagcsereráta ilyen jelentős változása hosszabb időn keresztül az ATP termelés és felhasználás összehangolt csökkentését és újbóli kiegyensúlyozását igényli [280]. Feltételezhető tehát, hogy a peptid- és fehérjeszintézis depressziója, amely egy nagy energiaigényű folyamat, jelentősen hozzájárul a csiga hibernált állapotának kialakításához és fenntartásához [280, 281]. A PACAP mennyiségének évszakfüggő csökkenését saját eredményeink is alátámasztották (47. ábra) [XLVII]. A peptid- és fehérjeszintézis általános szuppressziójával párhuzamosan a hibernált állatokban a kiválasztott gének specifikus up-regulációjára és specifikus fehérjék és peptidek

szintézisére is megfigyeltek példákat [281]. A téli álmot alvó állatok központi neuronjaiban megfigyelték a VIP, a substance P, a kolecisztokinin, az endotelin, a calcitonin-génnel kapcsolatos peptid és a „hibernáció által indukált delta opioid peptid” mennyiségének növekedését, és ezzel párhuzamosan az immunpozitív rostok számának csökkenését a neuropilben [278, 282-284]. Téli álmot alvó földimókusokban és patkányokban párhuzamosan megfigyelték a TSKYR szívre ható peptid megnövekedett koncentrációját, amelyről azt feltételezik, hogy szabályozza a hibernációt [285, 286]. Megfigyelték továbbá a Cox1, α 2-macroglobulin, moesin, hasnyálmirigy lipáz, antioxidáns enzimek, hibernációval kapcsolatos fehérjék és stresszel kapcsolatos fehérjék mennyiségének növekedését hibernációs körülmények között [281, 287-291].

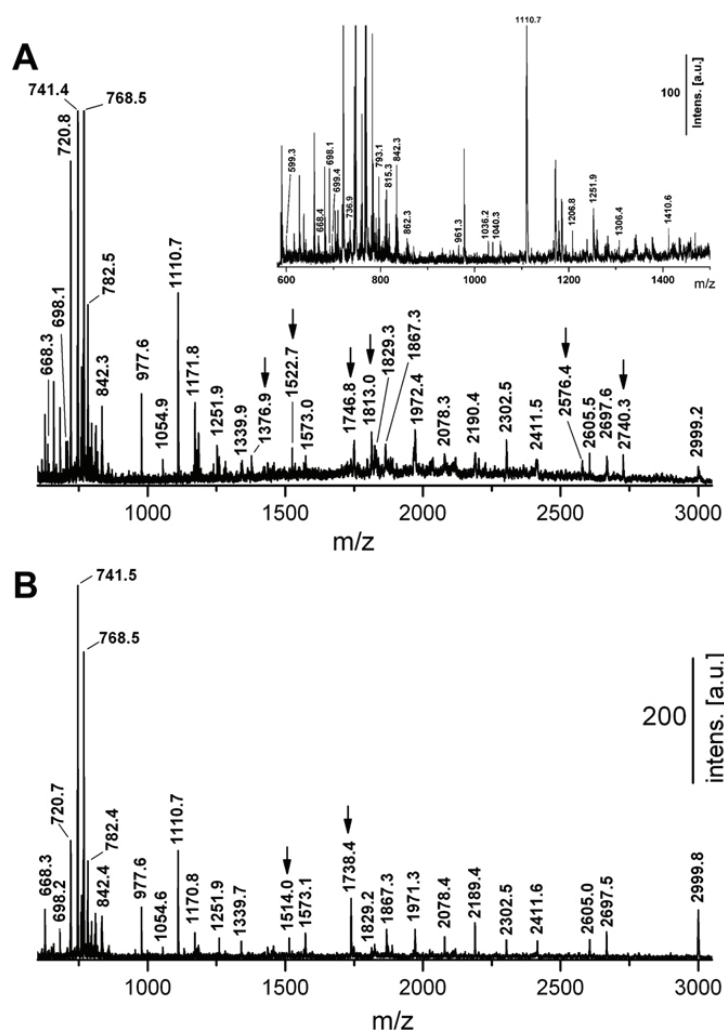
Kutatási munkánk során éti csiga hibernációjakor bekövetkező peptid változásokat kísértük figyelemmel. Az állatok egy csoportját ($n=30$) nedves körülmények között (páratartalom 95-98%), szobahőmérsékletű ($24\pm 2^\circ\text{C}$) terráriumban aktívan tartottuk, 12/12 órás nappali/éjszakai ciklusban, és az állatokat hetente kétszer salátával vagy uborkával etettük. Az állatok másik csoportját ($n=30$) a kísérletek előtt három hónapig $4\pm 2^\circ\text{C}$ -on tároltuk (relatív páratartalom 20-25%).

A központi idegrendszert (CNS) felboncoltuk és hideg fiziológiás sóoldatba helyeztük, amely 80 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 és 10 mM TRIS-HCl tartalmazott, NaOH-val beállított pH=7,4 pH-jú desztillált vízben oldva. A 3 állatból nyert izolált agyakat 100 μl , 0,1 M hideg foszfát pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk, amely 10% (V/V) proteáz/peptidáz inhibitor koktélt (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazott. Csigánként körülbelül 1 ml hemolimfát gyűjtöttünk úgy, hogy a csigaház eltávolítása után tüvel átszűrtük a szívet a köpenyen keresztül, és a mintát felhasználásig jégen tároltuk. A homogenizált CNS mintákat és a hemolimfát 13000 g-nél 4°C -on 10 percig tartó centrifugálással tisztítottuk. A MALDI TOF tömegspektrometriás elemzéseket ZipTipC4 és C18 tisztítás követően CHCA mátrix jelenlétében reflektor detektor (késleltetett extrakció 120 és 140 ns) alkalmazása mellett végeztük el. A peptidek célzott mennyiségi meghatározását szelektív ionmonitorozással ESI ionforrással egy Finnigan AQA (Thermoquest, San José, USA) egyszeres kvadrupol tömegspektrométerrel végeztük. A segéd- és porlasztógáz nitrogén volt 600 l/h áramlási sebességgel. Az ionforrás hőmérséklete 250°C volt, a kapilláris feszültséget 3,5 kV-ra állítottuk be. A spektrumokat pozitív ion módban vettük fel 1,2 scan/s sebességgel az m/z 400 és 1600 között. A kvadrupol analizátoron a pásztázási szűrőt 10, 30, 70 és 100 V-ra állítottuk be.

A vegyületek tömegspektrumainak feldolgozására a Finnigan Xcalibur szoftvert használtuk. A különböző peptidcsúcsok mennyiségi meghatározásához a kiindulási peptidminták azonos mennyiségű peptidet tartalmaztak. Az aktív és hibernált csigák agyának homogenátumaiban azonos intenzitású csúcsokat találtunk (m/z 502,9; 593,3; 686,1; 817,2; 918,7 és 1181,6), így ezeket a csúcsokat belső standardként használtuk a kvantitatív meghatározáshoz. Az intenzitás adatokat az OriginPro8 szoftverrel dolgoztuk fel, és párosítatlan t-tesztet alkalmaztunk az aktív és a hibernált állatok agymintái közötti különbségek elemzésére.

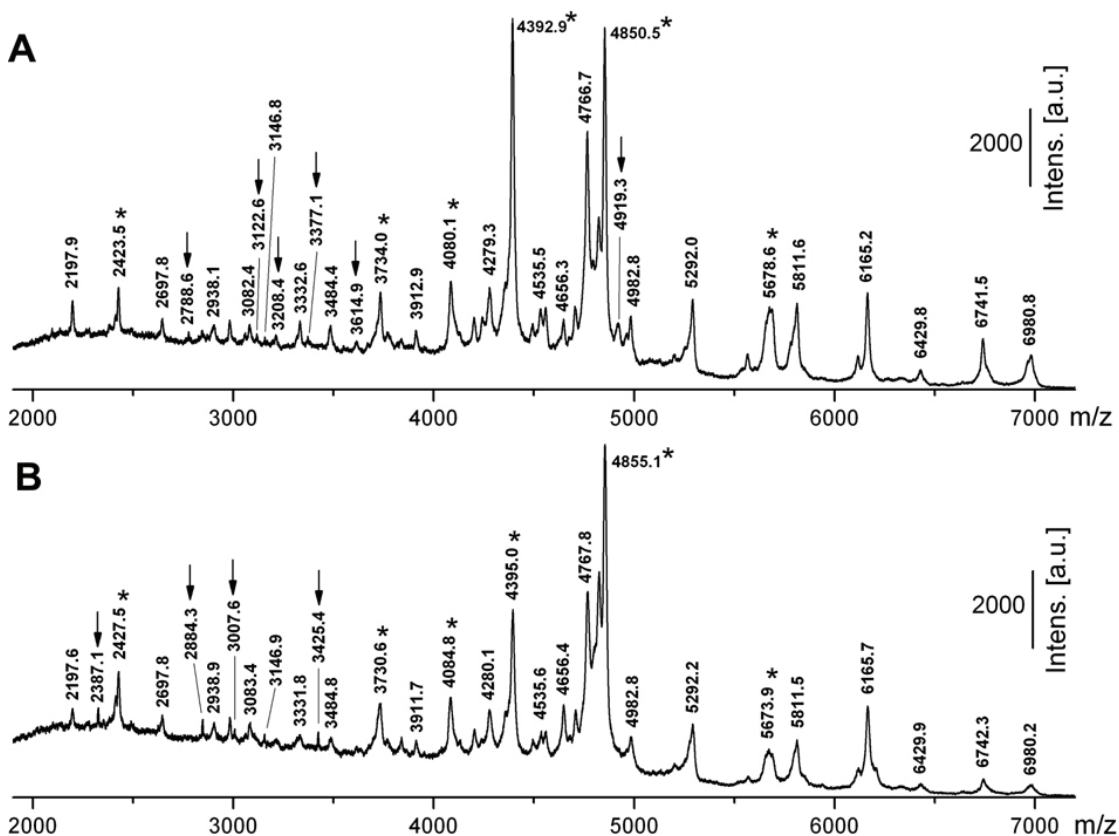
12. táblázat: A vizsgálatok során az aktív és a hibernált állatokban kimutatott peptidek jellemzői.

Sequence	Theoretical masses	Observed m/z (M + H) ⁺	Intensity (a.u.)	
			Active	Hibernating
FMRF _a	598.294	599.3	18.6 ± 5.78	80.3 ± 12.34
GSPYFV _a	667.322	668.3	2983 ± 113.4	4261 ± 157.8
FRTFQ _{OH}	697.355	698.1	7.3 ± 2.66	75.6 ± 20.41
FRTFE _{OH}	698.339	699.4	68.3 ± 24.83	102 ± 31.64
DPPYFV _a	735.348	736.9	49 ± 18.47	50 ± 20.37
DPFLRF _a	792.417	793.1	29.3 ± 5.08	121 ± 9.02
TSSFVR _l _a	807.449	808.3	52.6 ± 10.2	76.6 ± 24.01
GLNMLRL _a	814.474	815.3	15.6 ± 0.66	95.3 ± 22.31
pQLSMLRL _a	841.484	842.3	63.3 ± 12.07	23.3 ± 9.45
PMSMLRL _a	861.451	862.3	125.3 ± 10.8	96 ± 5.9
PRYGHSEFV _a	960.482	961.3	19.3 ± 8.33	7.3 ± 1.66
PIDISGSSFY _{OH}	1035.528	1036.2	95.4 ± 19.65	33.2 ± 11.56
SGYLAFPRM ₂	1039.516	1040.2	66.3 ± 34.04	15.3 ± 3.84
RLDRFGAGGI ₂	1206.651	1206.8	46.6 ± 15.07	90.8 ± 26.13
PFCSYGCYNS ₂	1252.453	1251.9	89.6 ± 17.45	13.2 ± 2.67
RFDSISGLSSFG _{OH}	1271.615	1306.4	26.6 ± 7.17	9.6 ± 1.2
pQGDTADNEYLR _a	1409.621	1410.6	57.6 ± 37.77	70.3 ± 46.33
PACAP1-27 ^a HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAALV _a	Average mass: 3148.611	Average mass: 3146.8	In active animals the level of PACAP27 increased app. fourfold	
PACAP1-38-like ^a HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAALVGLGKRYRQRYRNK	Average mass: 3147.626	Average mass: 4656.35	No significant difference	



54. ábra: Aktív (A) és hibernáló (B) állatokból nyert CNS minták peptid profiljának reprezentatív MALDI TOF MS vizsgálata (m/z 600-3000). (A) Az agyi homogenátum peptidprofilja az aktív állatokban. A jobb felső spektrum a szekvencia alapján azonosított peptideket mutatja (lásd az 12. táblázat). (B) A hibernált állatok agyi homogenátumának peptidprofilja a hibernált állatra jellemző peptideket. A mindkét aktivitási állapotban jelen lévő csúcsokat az m/z értékekkel jelöltük.

Vizsgálataink eredményei alapján a MALDI TOF MS figyelemreméltó különbségeket mutatott ki a hibernáló és az aktív állatok agyi homogenátumaiban. Az alacsony tömegtartományban (m/z 600-3000) számos csúcs, mint például az m/z 668,4; 698,4; 720,8; 741,4; 768,5; 782,5; 835,4; 977,6; 1054,9; 1110,7; 1171,8; 1251,9; 1339,9; 1573,1; 1829,3; 1867,3; 1972,4; 2078,3; 2190,4; 2302,5; 2411,5; 2605,5; 2697,6 és 2999,2 volt jelen mind az aktív, mind a téli álmodó állatokban (54. ábra A és B). Az m/z 1376,9; 1522,7; 1746,8; 1813,0; 2576,4 és 2740,3 csúcsok kizárólag az aktív állatok agyi homogenátumában voltak megfigyelhetők (54.A ábra nyilakkal jelölve) míg az m/z 1514,0 és 1738,4 csúcsok jellemzően a hibernáló állatok homogenátumában jelentek meg (nyilak az 54.B. ábrán) (12. táblázat).



55. ábra: A hibernált és aktív állatokból nyert agyi homogenátum peptidprofiljának reprezentatív lineáris MALDI TOF MS vizsgálata (m/z 2000-7000). Az aktív (**A**) és a hibernáló (**B**) állatok agyi homogenátumának peptidprofiljai.

A peptid- és polipeptidprofilban bekövetkező változások hasonló mintázata figyelhető meg a magasabb tömegtartományban is (m/z 2000-7000). A MALDI TOF MS vizsgálat eredményei hasonló (peptid/polipeptid) tömegeket mutattak mindkét mintában, például m/z : 2197,9; 2697,8; 2938,1; 3082,2; 3146,8; 3332,6; 3484,4; 3912,9; 4279,3; 4535,6; 4656,3; 4766,7; 4982,8; 5292,1; 5811,6; 6165,2; 6429,8; 6741,5; 6980,8 (55. ábra A és B). Ezek közül az m/z 3146,8 és m/z 4656,3 megfelelnek a PACAP-27 és a puhatestűekben található gerinctelen PACAP-38-szerű molekuláknak. Az aktív állatokban 6 peptidcsúcs (m/z 2788,6; 3122,6; 3208,4; 3377,1; 3614,9; és 4919,3), míg

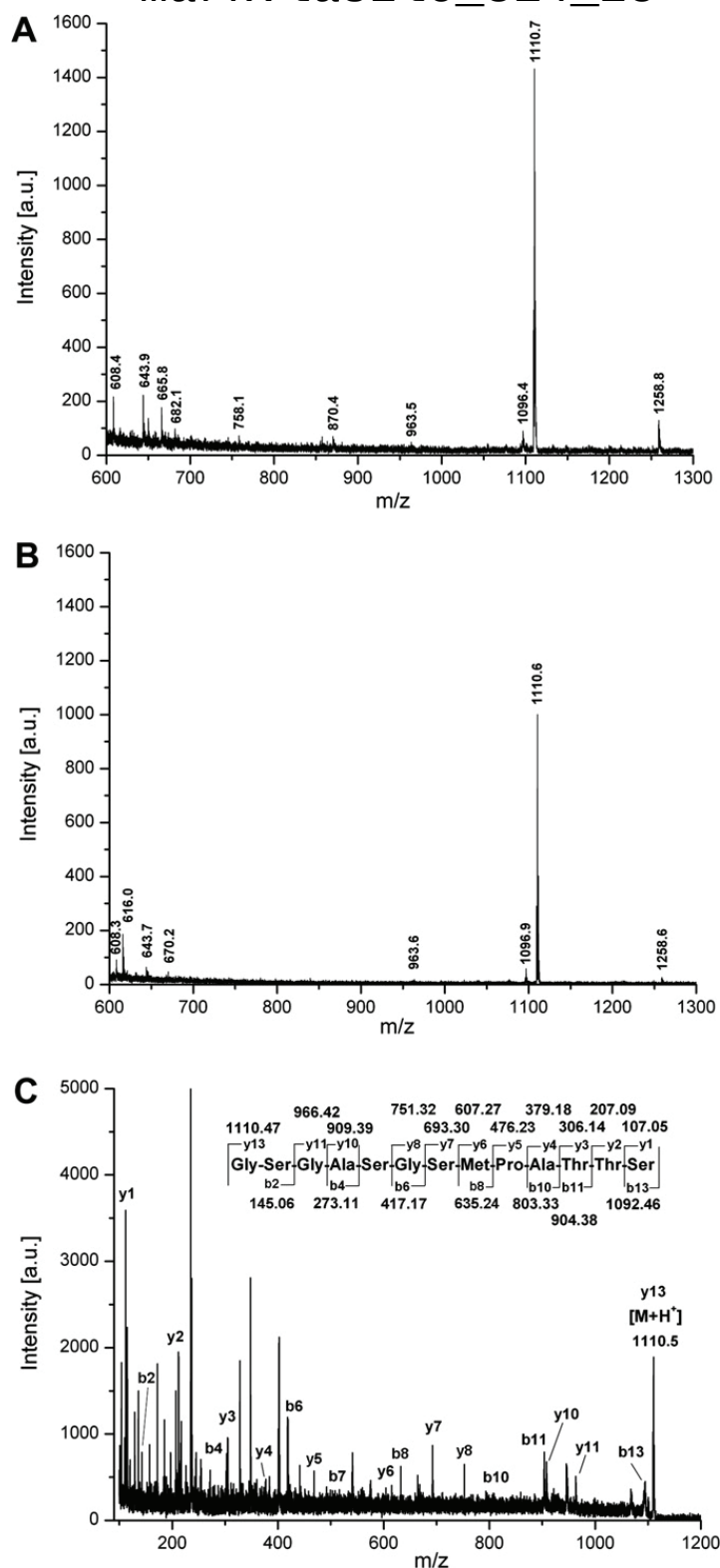
mark.laszlo_314_25

az m/z 2884,3; 3007,6; 3425,4 csúcsok jellemzően a téli álmot alvó állatok mintáiban jelentek meg (nyilak a 55. ábra A és B).

13. táblázat: A hibernált és aktív állatok hemolimfájában MALDI TOF MS segítségével kimutatható peptidek jellemzői.

Measured m/z monoisotopic masses (M + H) ⁺	Peptide sequence:	Active animals: n = 3	Hibernated animals: n = 4
793.1	DPFLRF _a	+	+
794.8	—	+	+
797.2	—	+	+
801.3	—	+	+
803.2	—	+	—
1036.2	PIDSIGSSFY _{OH}	+	+
1040.2	SGYLAFPRM _a	+	+
1070.7	—	+	+
1125.9	—	—	+
1182.7	—	—	+
1206.8	RLDRFGFAGGI _a	+	+
1251.9	PFCNSYGCYNS _a	+	+
1294.3	—	+	+
1306.4	RFDSISGLSSFG _{OH}	+	—
1350.4	—	+	+
1409.6	pQGDADNEYLRF _a	+	+
1518.6	—	—	+
1572.9	—	+	—
1636.9	—	—	+
1685.1	NYIQACYFQAISCY _{OH}	+	+
1746.8	VAPKFVGRDPPYFV _a	+	—
1797.7	—	+	+
1854.1	—	+	+
1912.5	—	—	+
2078.9	—	—	+
2301.4	SLEAALRAPPSIYSESLES _{OH}	+	—
2697.3	—	+	+
3142.1	—	+	—
3146.8	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA _{AVL} _a	+	+
3526.9	—	+	—
4104.2	—	+	+
4253.3	—	—	+
4456.7	—	—	+
4478.9	—	—	+
4857.3	—	—	+
6082.8	—	+	—
6430.7	—	+	—
6488.1	—	—	+
6699.2	—	—	+
6702.9	—	—	+
6819.9	—	+	—

mark.laszlo_314_25



56. ábra: Az m/z 1110,7 $[M+H]^+$ neuropeptid fragmentációs mintázata MALDI TOF/TOF MS segítségével. A kísérleti paramétereket 1110,7-re optimalizáltuk. Reprezentatív peptidprofil aktív (A) és hibernáló (B) állatokból, (C) az m/z 1110,7 prekursorion PSD fragmentációja és javasolt aminosav-szekvenciája: GSGASGSGSMPATTS.

Az aktív és a hibernált csigák peptid intenzitásainak átlagát összehasonlítva kiderült, hogy legalább négy peptid, az FRTFEOH, DPPYFVa, TSSFVRla, pQDTADNEYLRFa,

mark.laszlo_314_25

nem mutatott szignifikáns különbséget közöttük (12. táblázat). Az FMRFa, GSPYFVa, FRTFQOH, DPFLRFa, GLNMLRLa és RLDRFGFAGGIa peptidek intenzitása azonban jelentősen megnőtt a hibernáló állatokban. Másrészt az aktív állatok agyi homogenátumában a PQLSMLRLa, PMSMLRLa, PRYGHSFVa, PIDSIGSSFYOH, SGYLAFFPRMa, PFCNSYGCYNs és RFDSISGLSSFGOH peptidek intenzitásának jelentős növekedése volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy ezek a peptidek az aktív állapot fenntartásában játszhatnak szerepet.

A hemolimfa számos, az agyban szintetizált neuropeptidet tartalmaz. A MALDI TOF MS mérések jelentős különbségeket mutattak az aktív és a hibernáló állatok hemolimfájának peptid/polipeptid (m/z 700-7000) vagy fehérje ($>m/z$ 7000) profiljában, ami alátámasztja az agyból nyert adatokat. A legmarkánsabb különbségek az aktív állatok m/z 7500-9500 molekulatartományában voltak megfigyelhetők, ahol a hibernáló állatok hemolimfájából teljesen hiányoztak a megfelelő fehérjék. Ezzel szemben az m/z 4000-5500 tömegtartományban megfigyelt peptidcsúcsok csak a hibernáló állatokban voltak kimutathatók. Az aktív és hibernáló állatok hemolimfájából nyert peptidek (m/z 700 és 7000 között) kumulatív spektrumai azt mutatták, hogy számos peptid/polipeptid kizárólag az aktív (10 csúcs) vagy a hibernáló állatokban (13 csúcs) volt jelen, míg mások (18 csúcs) mindkét állapotban megjelent (13. táblázat).

A MALDI TOF MS m/z 1110,7 értéknél mindkét élettani állapotban kimutatható peptidcsúcsot detektált (56. ábra). A kvantitatív ESI adatok alapján statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) állapítottunk meg a peptid vagy peptidfragmens intenzitásában az aktív ($34,24 \pm 11,76$) és a hibernáló állatok agyi homogenátumai ($14,6 \pm 3,22$) között. Ezek az adatok arra utaltak, hogy a neuropeptid jelentősen hozzájárulhat az aktivált állapot kialakulásához. Az 1110,7 Da tömegű peptid további MALDI PSD TOF/TOF tandem tömegspektrometriás vizsgálatával az aminosav szekvenciája GSGASGSGSMPATTS-nak adódott (56.C ábra).

Tanulmányunkban az aktív és a hibernált *Helix pomatia* agyának és hemolimfájának neuropeptid profiljának minőségi és mennyiségi elemzése azt sugallta, hogy több peptid is részt vesz a különböző aktivitási állapotok kialakulásában és/vagy fenntartásában. Az agyi homogenátumokban 79 csúcsot figyeltünk meg, ami jó összhangban van a *Helix* agyában talált neuropeptidek számával [292, 293]. A tömegspektrometriás adatok alapján e peptidek/polipeptidek közül 11-et kizárólag vagy következetesen nagyobb intenzitással detektáltunk a hibernált állatok agyi homogenátumában. A szignifikánsan magasabb intenzitással rendelkező azonosított peptidek az ESI kvadrupolos adatok szerint a következők voltak: FMRFa; GSPYFVa; FRTFEOH; DPFLRFa; GLNMLRLa; RLDRFGFAGGIa. Ezenkívül 30 peptidet/polipeptidet mutattunk ki a hibernált állatok hemolimfájában, és ebből az állományból 13 csúcsot csak a hibernált állatokban figyeltünk meg. Több peptid és polipeptid megnövekedett intenzitása a hibernált állatokban arra utalt, hogy ezek a molekulák hozzájárulhatnak az állapot fenntartásához. A hemolimfában összesen 41 peptidnek/polipeptidnek megfelelő csúcsot találtunk, függetlenül az állatok állapotától. Az aktív állatok hemolimfája 10 olyan peptidet tartalmazott, amelyek a hibernált állat hemolimfájában nem detektálhatók, és ezek közül hatot az aktív állatok agyában is megfigyeltünk.

Az agyban talált 43 peptid/polipeptid és a hemolimfában talált 18 peptid/polipeptid valószínűleg nem vesz részt a hibernált állapot kialakulásában/fenntartásában, mivel hasonló intenzitást mutatnak az aktív és a hibernált állatokban. Közülük öt peptid (FRTFEOH; DPPYFVa; TSSFVRIa; pQGDTADNEYLRFa; NYIQACYFQAISCYOH) volt általánosan jelen mind az aktív, mind a hibernált csigák agyában és hemolimfájában a korábban azonosított 25 potenciális neuropeptid közül.

Az agyi homogenátumban egy új, aktivitásfüggő neuropeptidet vagy neuropeptid-töredéket azonosítottunk, amelynek javasolt aminosav-szekvenciája a következő: GSGASGSGSMPATTS. A peptidet szignifikánsan magasabb koncentrációban figyeltünk meg az aktív állatokban, ami arra utal, hogy a neuropeptid valószínűleg részt vesz az aktív állapot kialakulásában és fenntartásában. Hasonló szekvenciát nem találtunk az NCBI adatbázisában és az ExPASy Proteomics Serverben (<http://www.expasy.ch>), ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a peptid vagy egy új peptid, vagy egy polipeptid fragmentuma lehet [XXXIII].

5.2.4. Fej-nyaki és szájüregi tumorbiomarkerek MALDI TOF MS vizsgálata [XI, XII, XIV, XVIII, XXXV-XXXVII]

A fej-nyaki laphámsejtes karcinóma (HNSCC) a száj, torok, gége, melléküregek és nyálmirigyek érintettségét mutató daganatokat foglalja magába. A fej-nyaki régió laphámkarcinómája a 6. leggyakoribb daganatos megbetegedésnek számít világszerte, évente mintegy 887000 új esetet diagnosztizálnak [294, 295]. A diagnosztikus és terápiás lehetőségek fejlődésének ellenére az 5 éves túlélési arány az elmúlt 30 évben nem emelkedett számottevően, jelenleg is csupán 60%-ra tehető [296]. Ennek egyik fő oka, hogy az esetek 20-40%-ában jelentkezik recidíva még akkor is, ha a kimetszés szövettanilag a teljes neoplasztikus régiót érinti. A túlélési mutatókat tovább rontja az, hogy a betegség sokszor előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. Ilyen esetekben a sugár -, és/vagy kemoterápiával kombinált radikális kimetszés jelenti az egyetlen megoldást, mely sok esetben az életminőség kifejezett romlását vonja maga után.

A Nemzetközi Rákregiszter adatai alapján a fej-nyaki daganatok előfordulása 3-10-szeresére nőtt egy generációnyi idő alatt. Ez a növekedés az alkoholfogyasztás és dohányzás elterjedésével magyarázható. A fej-nyaki laphámrákos megbetegedések többnyire a 40. életév felettieknél jelentkeznek, azonban az utóbbi évek adatai szerint a fiatalabb korosztály is egyre nagyobb arányban érintett. A fej-nyaki laphámkarcinóma előfordulási aránya relatívan alacsonyabb a nőknél: a férfi/nő arány hozzávetőlegesen 10:1 [297]. A fej-nyaki daganatok mortalitása szignifikánsan megváltozott az elmúlt 50 évben, Európát tekintve megduplázódott. Amíg a magyarországi összes daganatos halálozás 2,8-szorosára nőtt az 1948 és 2000 közötti időszakban, addig a fej-nyaki daganatos halálozás 6-szorosára emelkedett. Az adatok azt mutatják, hogy a legdinamikusabban emelkedő halálozási arány Magyarországon a fej-nyaki daganatok esetében figyelhető meg, ez az arány Európán belül nálunk a legmagasabb. A gégetumor miatti halálozás Európát tekintve Magyarországon, Romániában, Lengyelországban és Szlovákiában a legmagasabb. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) adatai szerint a dohányzás okozza Európában a szájüregi daganatok 60%-át a férfi, 40%-át a

nőbetegeknél. Míg a dohányzás és rendszeres alkoholfogyasztás önmagában 2-3-szorosára, addig ezen két rizikófaktor együttes megléte mintegy 15-szörösére növeli a daganat kialakulásának kockázatát. A genetikai prediszpozíció és a mutációk iránti egyéni érzékenység is szerepet játszik a tumorok kialakulásában. A HPV infekció további lehetséges faktorként jön szóba, tekintve, hogy a HPV 16-os és 18-as típusa a fej-nyaki daganatok 70%-ából kimutatható [297-299].

A korai kimutatás döntő jelentőséggel bír a daganatok elleni küzdelemben. Azonban a fej-nyaki daganatok viszonylag sokáig rejtve maradhatnak nem specifikus tüneteik révén, úgymint a dysphagia, gombócérzés, rekedtség, szűrő érzés és ritkán a fájdalom. A nyaki metasztázis egy fontos prognosztikai tényező, azonban még klinikailag N0 nyak esetén is kb. 60-70% az áttétképzés lehetősége [300-301]. Amennyiben a diagnózis korai és nincs nyaki áttét, sebészi megoldás vagy sugárterápia általában kiváló hosszú távú eredményhez vezet, azonban a betegek többsége nem ebbe a csoportba tartozik. Késői diagnózis esetén a radikális kimetszést sugárterápia vagy kombinált kemo-, sugárterápia követi, illetve az ebből eredő életminőségromlás. Mindezen beavatkozások ellenére is magas a recidíva arány, az 5 éves túlélés is csupán 50-60%-ra tehető.

A molekuláris biomarkerekkel végzett tumorprofilozás ígéretes eredményeket mutat [302], a validált génexpressziós profil a betegek 89%-ánál pontosan megjósolta a csomóponti metasztázisok kialakulását. Tömegspektrometrián alapuló proteomikai módszerek hatékonyan alkalmazhatók a daganat agresszivitásával és metasztázisával kapcsolatos markerek azonosítására szájüregi rákban [303, 304]. Polachini és munkatársai 155 eltérően expresszálódó fehérjét találtak, amelyek elősegítik a metasztázisok kialakulását [305]. Harris és munkacsoportja proteomikai vizsgálatuk során 72 molekuláris faktort tárt fel, amelyek a betegség-specifikus halálához, metasztázishoz és kiújuláshoz kapcsolódnak [306]. Az utóbbi évtizedben a MALDI tömegspektrometria a proteomikai kutatásokban és így a biomarker elemzésben is háttérbe szorult, hiszen a nanoLC MS/MS technikák megbízhatóbb fehérjeazonosítást tesznek lehetővé. Ennek ellenére a lézer abláció képalkotási alkalmazása új perspektívákat nyitott meg a molekuláris tumordiagnosztika felé, így a napjainkban újra meghatározó technika lett a diagnosztikai módszerek fejlesztésében (lásd 5.3.1. fejezet). Munkánk során számos diagnosztikai közeget (pl. szérum, plazma, vizelet, nyál) vizsgáltunk, ezek közül a legeredményesebbnek a teljes, nem stimulált nyál bizonyult. A nyálminták gyorsan és rizikó nélkül akár nem-invazív módon is gyűjthetők, a benne jelenlévő komponensek meghatározott szekréció útján jelennek meg a közegben és kiegyensúlyozott dinamikus tartományuk és korlátozott számuk lehetővé teszi a csekély mintaelőkészítési igényű, nagy áteresztőképességű analitikai vizsgálatok alkalmazását.

A nyálminták gyűjtésére stimulálás nélkül került sor reggel 8 és délelőtt 10 óra között mind a tumoros, mind a kontroll csoportban. A résztvevőket megkértük, hogy a begyűjtés előtt öblítsék ki a szájüregüket háromszor csapvízzel; a nyálmintákat a nem-stimulált szájüregben, a bukkális redőből 5 ml-es fecskendővel vettük, majd Eppendorf csőben (Eppendorf Austria GmbH, Bécs, Ausztria) jégen tároltuk. Ezt követően a mintákat 2500/min fordulaton, 12 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A nyálminták felülúszóját további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk.

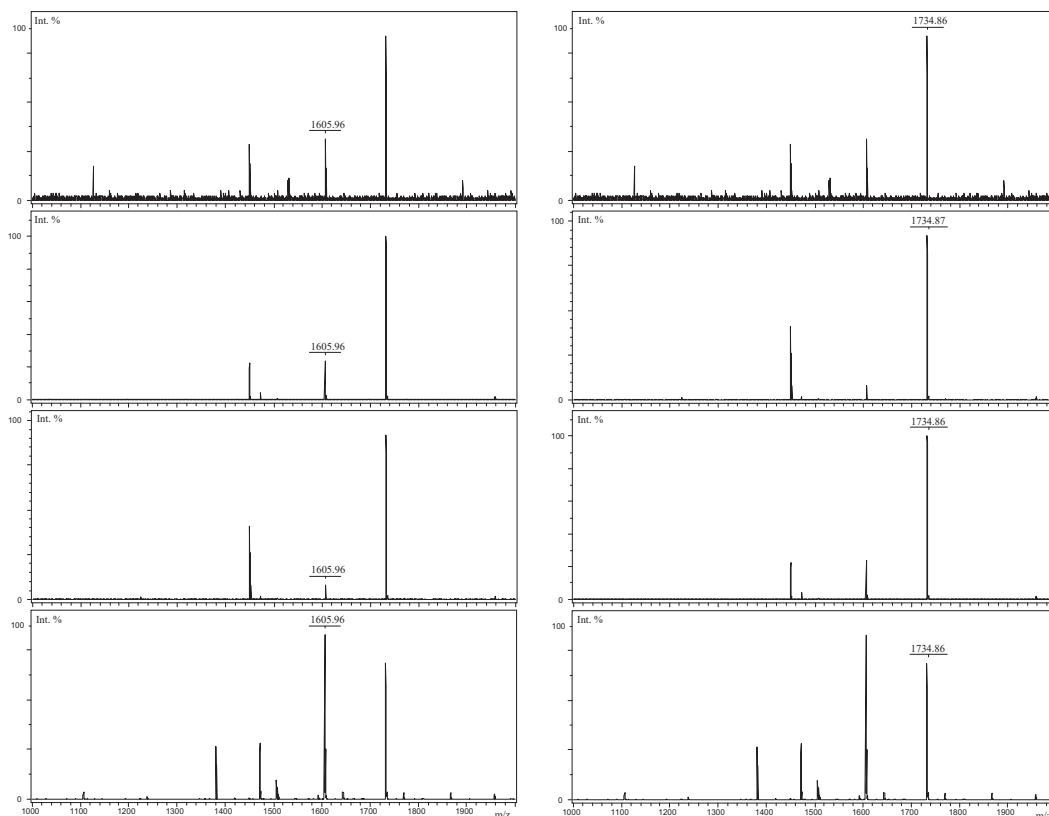
14. táblázat: Tumorraal diagnosztizált önkéntesek nyálproteomikai eredményei.

<i>Fehérje</i>	<i>Kód</i>	<i>Azonosított peptidek</i>	<i>Elméleti tömeg (Da)</i>	<i>Mascot érték</i>	<i>Szekvencia lefedettség (%)</i>
Annexin 1	gi 74756691	14	38690	164	50
Annexin 1	gi 442631	10	35018	114	37
Annexin 2	gi 113950	15	38552	137	42
Annexin A1	gi 113944	14	38559	163	50
Annexin A2	gi 113950	8	38449	87	26
Annexin A2	gi 73909156	16	40503	150	45
Cornulin Tumor related protein Squamous epithelial heat shock protein 53	gi 74761891	6	53502	89	30
Hypothetical protein (Annexin A2 homolog)	gi 34364597	16	40328	146	43
Keratin 1	gi 7331218	12	65978	80	29
Peroxiredoxin 1	gi 32455266	7	22096	80	27
Peroxiredoxin-2	gi 2507169	7	21747	84	28
Thioredoxin peroxidase	gi 9955007	7	21795	80	28
Neutrophil cytosolic factor 1	gi 115298672	6	44624	63	18
Adaptor-related protein complex 3	gi 5803000	7	46947	57	19
Serum albumin, chain A	gi 3212456	12	65695	129	21

Szájüregi léziókat nem mutató (kontroll) (46-74 év közötti 12 férfi, 8 nő) és szájüregi tumorraal diagnosztizált (46-76 év közötti, 14 férfi, 8 nő) önkéntesek nyálmintáinak fehérjeanalitikai vizsgálatai során a fehérjéket, a korábbi fejezetekben ismertetett paraméterek alapján, Laemmli szerint 12%-os (m/V) SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk és triptikus emésztést követően MALDI TOF MS, illetve MALDI TOF/TOF MS vizsgálatokkal azonosítottuk [XI, XII]. A vizsgálatok eredményeinek kivonatát a 14. táblázat szemlélteti. A detektált fehérjék közül az annexin 1 és a peroxiredoxin-2 kivétel nélkül minden tumoros nyálmintában detektálható volt, így ezeket választottuk ki a további célzott peptidanalízisre. Az elemzés során a nyálmintákat közvetlenül, oldatban történő tripszines emésztés után vizsgáltuk MALDI TOF tömegspektrometriával. A nyálminták 50 µl-ét 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ oldattal hígítottuk, majd tripszinnel emésztettük. A két fehérje 1-1 diagnosztikus triptikus peptidjét választottuk ki a detektálásra (15. táblázat).

15. táblázat: A célzott analízisre kiválasztott diagnosztikus triptikus peptidek jellemző adatai.

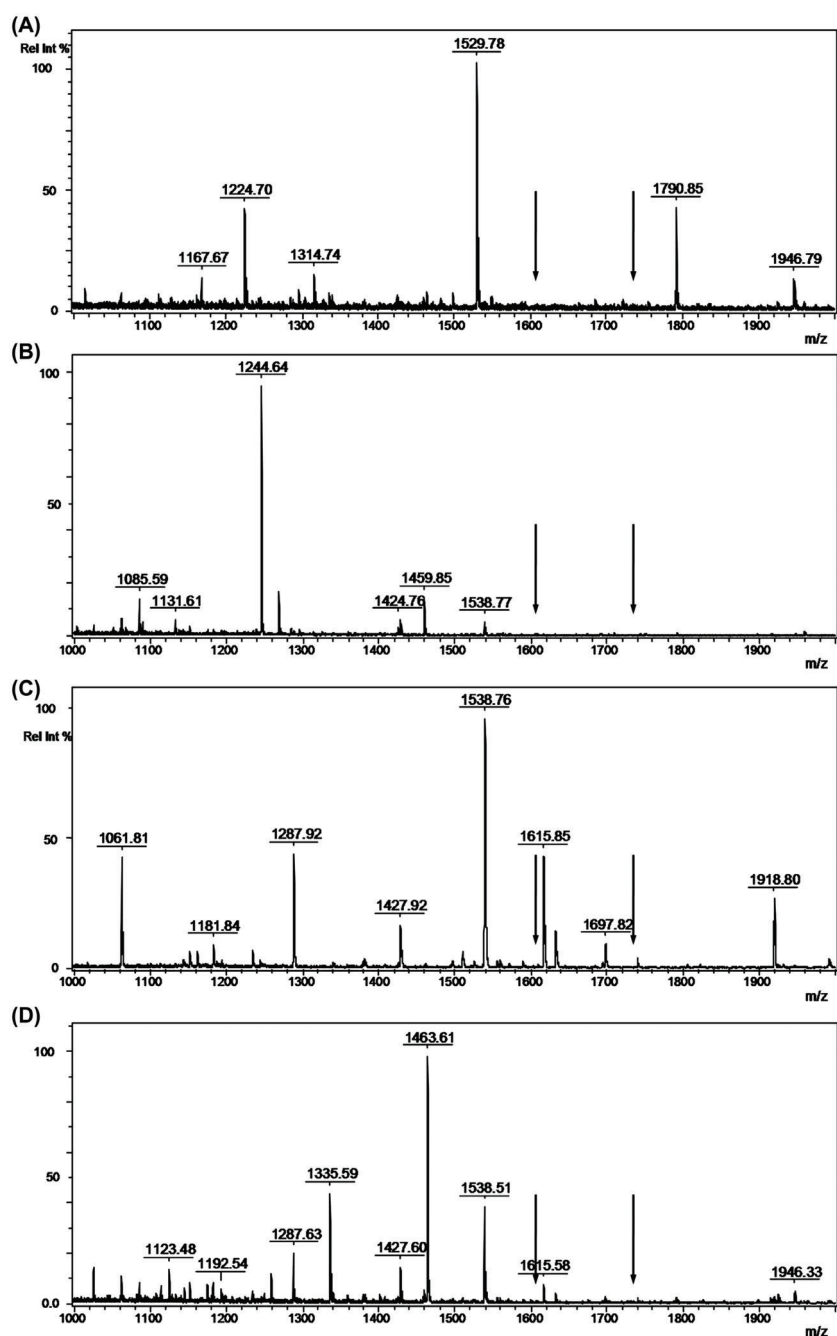
<i>Fehérje</i>	<i>Pozíció</i>	<i>Szekvencia</i>	<i>Elméleti tömeg (Da)</i>	<i>Detektált tömeg (Da)</i>
Annexin 1	[99-113]	ALTGHLEEVVLALLK	1605.957	1605.96
Peroxiredoxin-2	[92-108]	EGGLGPLNIPLADVTR	1734.862	1734.86



57. ábra: Az annexin 1 (m/z 1605,96) és a peroxiredoxin-2 (m/z 1734,86) diagnosztikus triptikus peptidjeinek MALDI TOF MS vizsgálatának eredménye fej-nyaki és szájüregi daganatos betegek nyálmintáiból.

Az 57. ábrán jól megfigyelhetők a célzott elemzésre kiválasztott fehérjék (annexin 1 és peroxiredoxin-2) diagnosztikus, egyedi triptikus fragmentjeinek jelenléte a malignus elváltozást mutató fej-nyaki és szájüregi tumorral diagnosztizált önkéntesek nyálmintáiból. A két peptid együttes jelenléte a vizsgált nyálminták mindegyikében (n=22) detektálható volt. Az egészséges, malignus szájüregi léziót nem mutató önkéntesek (n=20) nyálmintáinak célzott elemzését az 58. ábra mutatja. A reprezentatív tömegspektrumokon jól megfigyelhető az annexin 1 és a peroxiredoxin-2 diagnosztikus triptikus peptidjeinek m/z 1605,96 és m/z 1734,86 teljes hiánya [XI].

Hasonló fehérje expressziós eredményekkel záródott egy másik fehérjeanalitikai tanulmányunk, ahol 25 tumoros beteg (22-78 év közötti, 10 nő, 15 férfi) és 25 egészséges (15 dohányzó, 10 nem dohányzó), fej-nyaki és szájüregi malignitást nem mutató kontroll önkéntes nyálmintáit hasonlítottuk össze [XII].

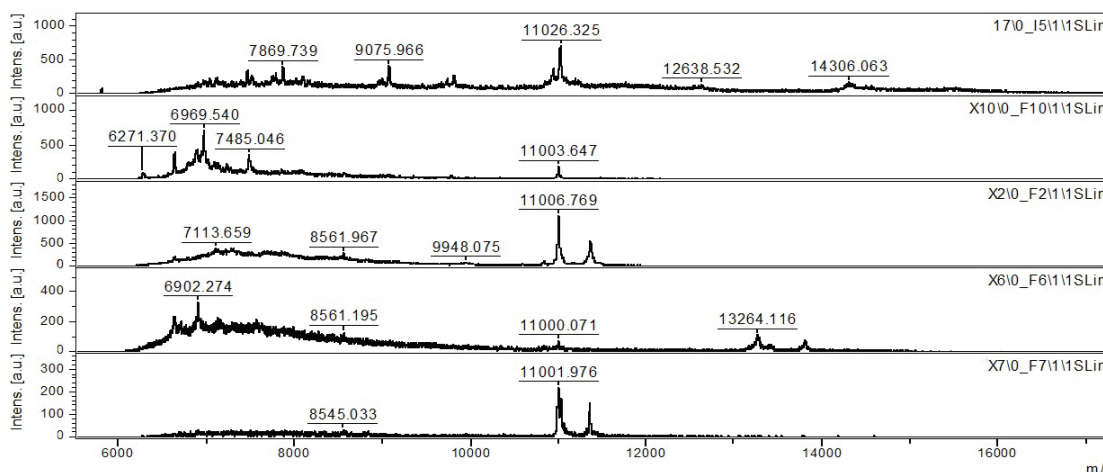


58. ábra: Az egészséges, fej-nyaki és szájüregi malignus elváltozást nem mutató önkéntesek nyálmintáinak MALDI TOF MS vizsgálatainak reprezentatív eredménye. A nyilak az annexin 1 (m/z 1605,96) és a peroxiredoxin-2 (m/z 1734,86) diagnosztikus triptikus peptidcsúcsainak helyét mutatják.

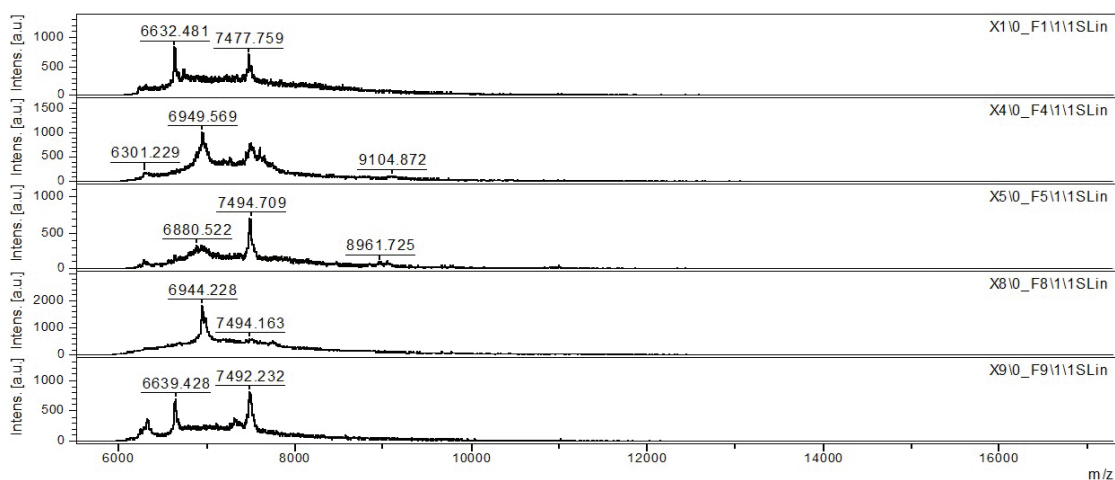
A korai diagnosztikai lehetőségek feltárása érdekében vizsgálatokat végeztünk a diabetes mellitusban szenvedő páciensek nyálmintáin. A cukorbetegség, mint précancerózus állapot jelentős rizikó faktort jelent a HNSCC kialakulása szempontjából [307]. Vizsgálataink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a diabéteszes betegek nyálfehérjéi között megjelennek-e a fej-nyaki és szájüregi tumorokra jellemző diagnosztikus proteinek. Tanulmányunkba 25 beteget vontunk be (25 és 70 év közötti, 14 férfi, 11 nő) valamint 10 nő és 10 férfi életkorukat tekintve hasonló egészséges kontroll személyt

vizsgáltunk [XIV, XVIII]. A nyálminták levétele és előkészítése az előző vizsgálatokban alkalmazott módon történt. Minden diabéteszes beteg nyálmintájában találtunk korábban már a szakirodalomban leírt, laphámkarcinóma daganatsejtek által expresszált fehérjéket. Ez az eredmény különös fontosságú, hiszen a vizsgálatba bevont önkénteseknél korábban nem diagnosztizáltak laphámrákot vagy azt megelőző elváltozást. A megnövekedett annexin A8, peroxiredoxin-2, és tirozin-protein kináz jelenlétét mindegyik vizsgált diabetes mellitusban szenvedő beteg nyálmintájában azonosítottuk. Eredményeink tükrében feltételezzük, hogy a diabetes mellitus nem csak precancerózus állapot, de valószínűsíthetően a rosszindulatú laphámkarcinóma kialakulását megelőző, premalignus állapotnak is tekinthető. Megállapítottuk továbbá, hogy azoknál a pácienseknél, akik 5 vagy annál több éve szenvednek diabetes mellitusban magasabb arányban fordul elő a peroxiredoxin-2 biomarker, mint azoknál a betegeknél, akik 5 évnél rövidebb ideje cukorbeteg.

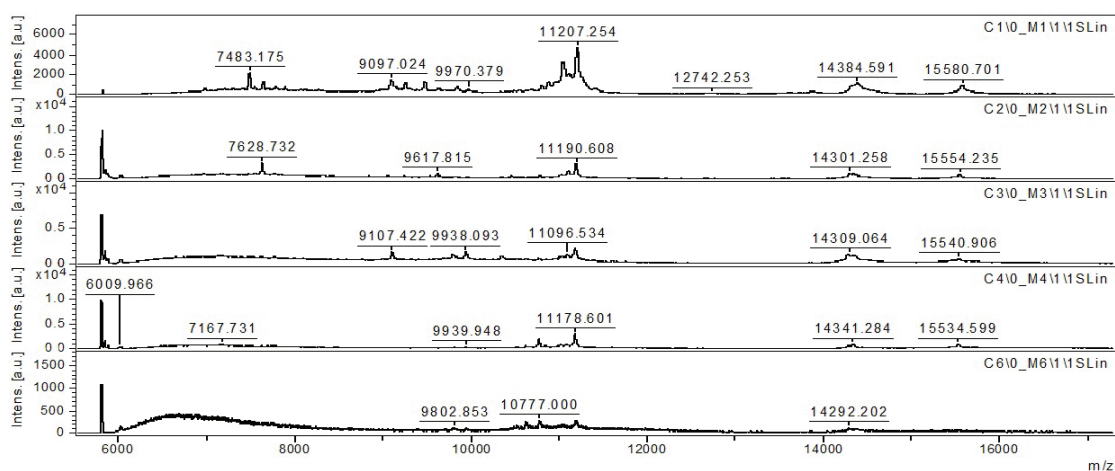
A MALDI TOF MS alkalmazása lehetővé tette számunkra a nyálban jelenlévő peptidek és fehérjék széles tömegtartományon belül történő együttes elemzését. Vizsgálataink során fej-nyaki és szájüregi tumoros betegek, a tumort megelőző (lichen oris, leukoplakia) állapotokban diagnosztizált és egészséges önkéntesek nyálmintáit elemeztük (n=50) m/z 5000-20000 tömegtartományban SA mátrixot, lineáris detektort és pozitív ionizációs módot alkalmazva. Eredményeink azt mutatják, hogy a tumort megelőző és a tumoros állapotokban jelentősen megnövekszik a proteáz/peptidáz aktivitás a nyálban vagy a nyál szekréciós folyamatában, így a nagyobb tömegű (m/z 9000-18000) tartományban a detektálható vegyületek száma szignifikánsan lecsökken (59.A. és B. ábrák). Az egészséges egyének mintáiban ez nem volt megfigyelhető (59.C. ábra) [XXXII]. Megfigyelésünk alapján kidolgoztunk egy olyan egyszerű diagnosztikai eszközt, amely alkalmas fej-nyaki és szájüregi tumorok nyálból történő szűrővizsgálat jellegű diagnosztikájára. Az eljárás, mintaelőkészítéssel együtt 7-8 percet vesz igénybe és teljesen nem-invazív módon képes a HNSCC kimutatására, illetve a precancer állapot detektálására [XXXV-XXXVII]. A módszer validálására az OKFŐ-vel kötöttünk együttműködési megállapodást 10000 fő bevonásával megvalósuló szűrővizsgálat elvégzésére (lásd 7. fejezet).



59.A. ábra: Precancerózus állapotú egyének nyálmintáinak reprezentatív MALDI TOF MS spektrumjai.



59.B. ábra: Malignus fej-nyaki és szájüregi elváltozásokat mutató egyének nyálmintáinak reprezentatív MALDI TOF MS spektrumjai.



59.C. ábra: Egészséges egyének nyálmintáinak reprezentatív MALDI TOF MS spektrumjai.

5.2.5. Elsődleges csonttumor (oszteoszarkóma) MALDI TOF MS vizsgálata [XVI]

Az oszteoszarkóma a leggyakoribb primer csonttumor, amelyet a rosszindulatú sejtekből származó oszteoid mátrix termelődése jellemez. Jellemzően gyermekek és fiatal serdülők hosszú csontjaiban, a metafízishez közeli növekedési lemezekben fordul elő [308].

Az ősi fehérjék tanulmányozása egyszerre nagyon régi és nagyon fiatal terület. Az ősi fehérjék kutatásának korai története mélyen gyökerezik a kémia, az antropológia és a geológia területén, és először az 1930-as években [309] fedezték fel, majd az 1950-es években „paleobiokémia” néven fogalmazták meg [310]. Azonban csak a lágyionizációs tömegspektrometria 2000-es évek eleji alkalmazását követően [311] vált igazán reálissá az ősi fehérjeszekvenciák tanulmányozása, amely a ma paleoproteomika néven ismert területté fejlődött [312, 313].

Munkánk során egy római korból származó (Savaria), megközelítően 2000 éves humán csontmaradvány (felkarcsont) proteomikai vizsgálatát végeztük el a morfológiailag detektált oszteoszarkóma molekuláris diagnózisa céljából (60. ábra).

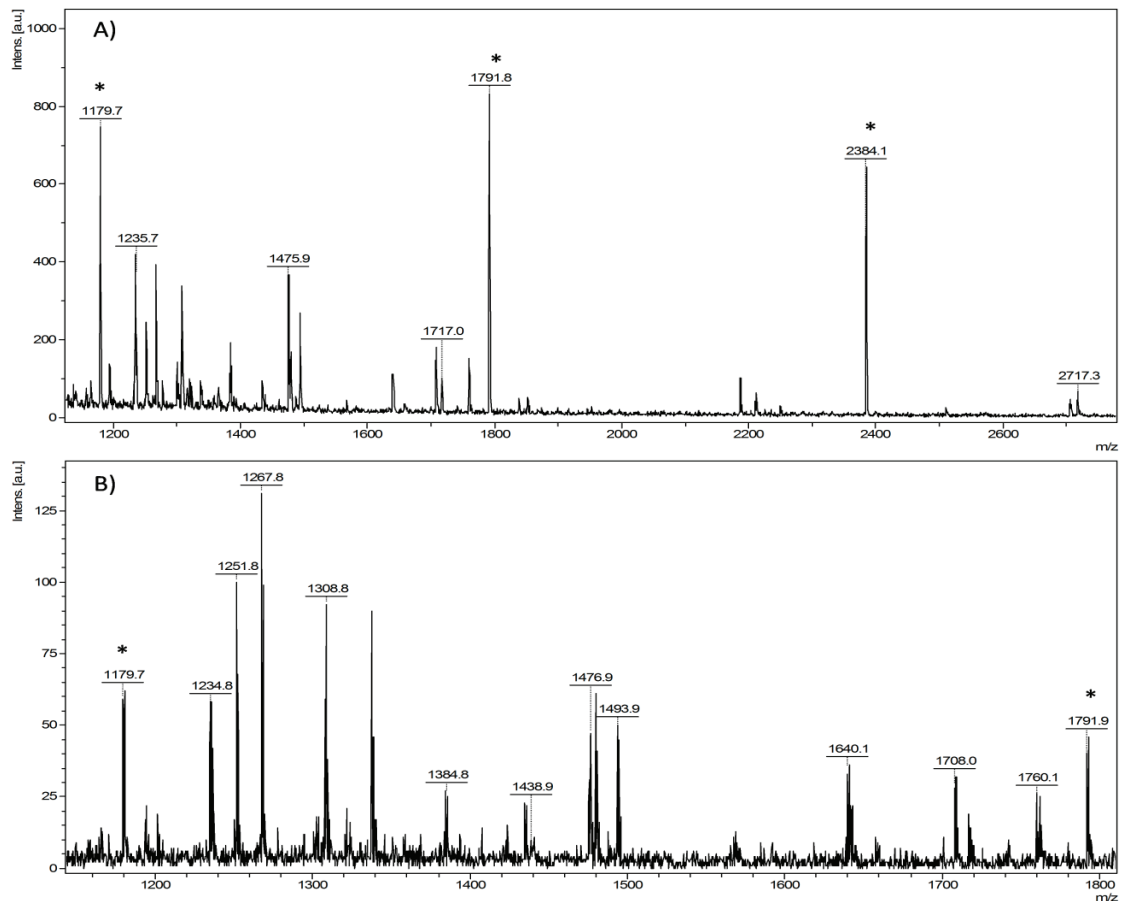


60. ábra: A tömegspektrometriai elemzésre kiválasztott paleoantropológiai minta. (A) és (B) Az elemzett jobb felkarcsont elülső és hátsó nézete az osteogén szarkómával. (C)

A vizsgált emberi maradvány röntgenfelvétele. A piros ellipszis a mintavétel helyét mutatja.

A csontdarabokat foszfátpuffer sóoldattal (PBS) és desztillált vízzel mostuk a szennyeződések eltávolítása érdekében. A csontport kézzel achátmozsár segítségével őröltük, a szemcseméret ca. 0,2 mm volt. Ezután 100 mg nyers csontport 1,00 ml 0,5 M EDTA-val (pH=8,0) kalciummentesítettünk, a pelletet 0,1 M Trisben (pH=7,5) szobahőmérsékleten 100 µl 6 M guanidin-HCl-val reszuszpendáltuk. A fehérjék extrakcióját 4°C-on 8 órán keresztül folyamatos rázással végeztük, proteáz inhibitor koktél (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) jelenlétében. A fehérjekivonatot C18 szilárd fázisú extrakció segítségével tisztítottuk. Ehhez a tisztítási lépéshez házi készítésű, oktadecilszilánnal módosított szilika alapú állófázist használtunk, amelynek

átlagos részecskemérete 5 μm és pórusmérete 120 $\text{\AA}$ volt. Az állófázist 0,1%-os (V/V) TFA vizes oldattal aktiváltuk, a betöltött fehérjekivonatot háromszor 100 μl 0,1%-os (V/V) TFA-ban lévő 2%-os (V/V) acetonitrillel mostuk. A fehérjéket 50 μl 50%-os (V/V) acetonitril 0,1%-os TFA (V/V) oldattal eluáltuk. Az oldatot liofilizáltuk és -80°C -on tároltuk a további feldolgozásig. A tumoros elváltozással rendelkező csontmintát nyolc technikai ismételtsben mértük.



61. ábra: Két azonosított tumor biomarker reprezentatív tömegspektrumai **(A)** Annexin A10, **(B)** Vimentin. A mintában keratin-szennyeződést észleltünk, a keratin triptikus peptidjeit belső kalibrációs standardként használtuk, a csúcsokat csillaggal jelöltük.

Munkánk során elsőként azonosítottunk primer csonttumorra jellemző elváltozást mutató régészeti csontleletből származó tumorbiomarkereket (annexin A10 és vimentin) tömegspektrometriával (61. ábra).

5.2.6. Száj- és ajakhasadékos gyermekek nyálproteomikai vizsgálata [XIII]

Az ajak- és szájpadhasadék egy olyan fejlődési rendellenesség, ami a terhesség 6. és 10. hete között alakul ki. A végleges szájpadot a maxilláris nyúlványok és a mediális orrnyúlványok összenövéséből létrejövő másodlagos palatum adja. Ha ezek fejlődése során bármilyen probléma adódik, akkor alakulnak ki a különböző ajak-, és szájpadhasadék elváltozások. Az ajak-, és szájpadhasadék a második leggyakrabban előforduló veleszületett fejlődési rendellenesség, előfordulási gyakorisága évente 1/700-850-hez.

A hasadékos területen az arc és állcsontnövekedés zavart szenved, mely idővel mind transzverzálisan mind szagitálisan kisebb méretű maxillát eredményez. A szájpadhasadék műtéti zárása nagyobb hatással bír a növekedésre, mint az ajakhasadék zárása. A sebészi szájpadhasadék zárás eredménye a visszamaradt maxilláris növekedés és ezáltal beesett középarc kialakulása. A túl korán végzett hasadékzárás gátolja az arcnövekedést, illetve a hegyszövet mennyisége a lecsupaszított palatumon gátolja annak fejlődését. Az optimális időzítés a hasadék zárására, figyelembe véve az arcnövekedés egyéni változatosságát: legjobb a második moláris okklúzióba kerülése után, kis hasadékok műtéti kezelése 12-18 hónappal korban, nagyobb hasadékok 18-24 hónapos korban, néha késleltetve 30 hónapos korban, izolált légyszájpadhasadék esetében 6-12 hónapos korban valósítható meg.

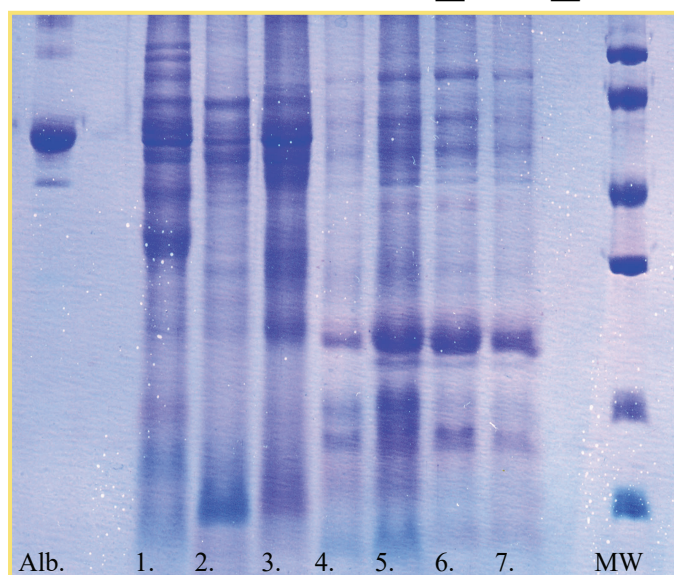
A hasadék számos problémát okoz, például: kozmetikai, fogászati, beszéd, nyelés, és növekedési eltéréseket. A betegség megváltoztatja az orr alakját, így etetési nehézségek, valamint torlódott fogazat alakulhat ki. Elmarad a maxilla növekedése, visszatérő fülgyulladás, és nehezített beszéd jellemezheti a kórképet [314].

Vizsgálataink célja a gyakori veleszületett hasadékok molekuláris patogenezisének jobb megismerése, valamint olyan potenciális biomarkerek feltérképezése, amelyek lehetőséget nyújthatnak a korai intrauterin szakaszban való diagnosztizálásra. Munkánkat a PTE Általános Orvostudományi Karán és Klinikai Központjában működő multidiszciplinális „Szájpadhasadék Team” bevonásával végeztük el.

A nyálminta vétele ajak- és szájpadhasadékos páciensekből a korábban ismertetett mintavételi protokollnak megfelelően történt: a szájüreg kiöblítése után, eppendorf csőbe gyűjtöttük a mintákat, majd, feldolgozásig -80 Celsius-fokon tároltuk azokat.

A nyálfehérjét Laemmli szerint 12% (m/V) SDS-PAGE segítségével szeparáltuk és a beteg és az egészséges kontroll minták között különbségeket mutató fehérjefoltokat kivágtuk és tripszinnel emésztettük a korábban leírtak szerint (62. ábra). A triptikus peptideket CHCA mátrix jelenlétében pozitív módban reflektor detektálás mellett határoztuk meg. A peptidek szekvenciáinak azonosítására MALDI TOF/TOF tandem tömegspektrometriát használtunk.

Méréseink eredményeként számos olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek funkciója kapcsolatba hozható különböző patológiás folyamatokkal. Ezek közül kettőt emelnék ki, amelyeknek az ajak- és szájpadhasadékok kialakulásában is jelentős szerepe lehet (16. táblázat)



62. ábra: A kontroll (1-3) és szájpadhasadékos minták (4-7) SDS-PAGE elektroforetogramja. (Az első oszlop az albumin, míg az utolsó a molekulásúly standardot tartalmazza)

16. táblázat: A szájpadhasadékos betegek nyálmintáiból azonosított fehérjék

Protein neve	peptidek száma	protein tömege (Da)	Mascot érték	szekvencia lefedettség
cystatin S precursor	6	16204	74	31%
beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase	11	58846	77	24%
actin, beta	7	40978	66	24%
keratin 2A	12	65393	68	30%
cystatin SN precursor	7	16351	76	53%
Keratin 6f type II	12	60045	66	26%
Dermokine	10	50276	65	31%
Transforming growth factor beta-3	7	47039	65	18%

A vizsgálataink során tapasztalt jelentős dermokine expresszió valószínűleg az ajak- és szájpadhasadék során aktiválódó keratinocitáknak köszönhető. Ugyanis a hasadék kialakulása során a szervezet védelmi mechanizmusa a légyszájpad záródása érdekében fokozott keratinocita aktivitást indukál [315-317]. Az egerekben, mint az emberekben is a dermokine gén szoros kapcsolatban van a subrabasin és a KDAP génekkel, amelyek a specifikus-keratinociták által szekretált proteinek kódolják. 2004-ben írták le a dermokine α és β formáját, a harmadik transzkriptumot dermokine γ -nak nevezték el [316], mely hasonlít a dermokine β -hoz, illetve a negyedik mRNS-t elnevezték dermokine δ -nak. A dermokine gén komplex transzkripcionális mintákat mutat az emberi normál epidermiszben. A dermokine α -t eddig csak epidermiszből és placentából, míg a dermokine

γ -t a legtöbb emberi szervből kimutatták. A pszoriázisos betegek léziós bőrében a dermokin β és/vagy γ expresszáldott magas szinten számos sejt rétegen keresztül. Szintén kimutatható volt az extracelluláris tér szélén, a legfelső granuláris sejtek és a legalsó korneociták között. A dermokin α β γ transzkripciós faktorok szekretálódó proteinek kódolnak, míg a dermokin δ intracelluláris proteinek.

Feltételezik, hogy a TGF β 3 szerepet játszik az ajak- és szájpadasadék kialakulásában. Sejt differenciálódásban, embriogenezisben és növekedésben van szerepe, illetve a szájpadas záródásában fontos, hiányában szájpadasadék alakul ki. Szerepe azonban még nem teljesen tisztázott mivel az eddigi vizsgálatokban részben ellentmondásos eredmények születtek. Az elképzelések szerint ezt az ajak- és szájpadasadék kialakulásának komplex genetikája okozhatja. A TGF β 3 részt vesz az interleukin (IL) hálózat szabályozásában, szerepe különösen az IL-1 és IL-6-nál jelentős. IL-6 egy multifunkciós citokine, amely csökkenti a TGF β és ahhoz kapcsolódó protein termelését. Az IL-6 és a TGF β 3 közötti interakciók kialakulása elindítja és kontrolálja fejlődési folyamatot szabályozó kaszkádot. Kimutatták, hogy a TGF β 3-nak, és az IL-6-nak közös hatása befolyásolja a hasadék fibroblaszt fenotípusát és az extracelluláris mátrix összetételét.

A TGF β 3 jelenlétét kimutatták az epithéliumban, a kis palatinális nyálmirigyekben és a m. elevator palati rostjaiban, ahol mennyisége változó volt, kevésbé (<10%), közepesen (10-30%), és magasan expresszáldónak (>30%) mutatkozott.

Azon kutatásokban, ahol az egereknél, a TGF β 3 hiányzott, vagy mennyisége elmaradt a normál értékektől ott elmaradt a szájpadas összenövése, így szájpadasadék alakult ki. Ahogy azt korábban kimutatták a TGF β 3 növeli a kondroitin szulfát proteoglikán (CSPG) szintézisét és így hozzájárul a CSPG mediálta szájpadasnyúlványok összenövéséhez [318-320].

5.3. Lézer ablációra épülő képpalkotási tömegspektrometria

Napjainkban a lézer abláció/lézerdeszorpció tömegspektrometriás alkalmazásának előretörését és intenzív fejlesztését főként a képpalkotási vizsgálatok elterjedése indukálja [75-93]. A MALDI utóbbi évtizedben zajló reneszánsza a klinikai mikrobiológiai alkalmazások (pl. Biotyper) mellett a szövetszövetek és biopsziák közvetlen, nagyérzékenységű, jó spektrális és térbeli felbontással rendelkező IMS vizsgálatainak köszönhető. Jelenleg a képpalkotási tömegspektrometriás eljárások közül a MALDI módszer rendelkezik a legjobb paraméterekkel, így ez a leggyakrabban alkalmazott technika. Az ionforrást csatolhatjuk a legkülönbözőbb analizátorokhoz, a leggyakrabban TOF, illetve TOF/TOF és ICR (ion ciklotron rezonancia) tömegspektrométereket alkalmaznak.

Az IMS óriási előnye főként azokban az esetekben érzékelhető, ahol látványosan heterogén szöveti és molekuláris eloszlás figyelhető meg egy-egy mintán belül. Munkánk során a képpalkotási tömegspektrometriát tumorok heterogenitásának vizsgálatára és szövetspecifikus biomarker azonosítására, a spermatogenezis lipidomikai kapcsolatainak vizsgálatára, valamint korai fázisú embrionális fejlődést meghatározó lokális és időbeni változások nyomon követésére használtuk. Ez mellett a térbeli felbontás határait feszegetve egysejtszintű analíziseket is megvalósítottunk neurális és növényi mintákon. Véleményem szerint a képpalkotási tömegspektrometria alapvető fontosságú módszer a szöveti molekuláris változások meghatározásában és az összetett biokémiai és patofiziológiai folyamatok vizsgálatában. A technikai fejlesztések a térbeli felbontás növelése mellett főként a felszínről történő direkt MS/MS fragmentáció és szerkezetazonosítás minőségének javítására irányulnak, amelyben igen nagy szerepe van az ICR, QTOF és Orbitrap analizátorok használatának.

5.3.1. Tumorszövet heterogenitásának vizsgálata [XII, XXII, XXIII]

A daganatok nagyon heterogének összetételükben, beleértve a sejttartalmat, a genetikai, epigenetikai, fehérje- és sejt differenciálódási jellemzőket [321, 322]. Annak ellenére, hogy nagy mennyiségű „omikai” információ áll rendelkezésre a genetikai, RNS-, fehérje- és funkcionális profilalkotás segítségével, a lipidek és a lipidmetabolizmus onkogenezisben betöltött szerepe csak a közelmúltban került a középpontba [323-328]. A daganatképződés egy többlépcsős folyamat, melyhez a sejtek genetikai, epigenetikai módosulásai szükségesek, amiket pedig különböző környezeti hatások, karcinogének idézhetnek elő. Az utóbbi évek kutatásaira alapozva megalkották az úgynevezett cancer-field elméletet, mely széles körben elfogadott a fej-nyaki tumorok kialakulásának egyszerűsített mechanizmusaként. A teljesen ép nyálkahártya bazális membránjának sejteiben a folyamatos környezeti ingerek hatására genomikai változások jönnek létre, megalkotva így a rák-öszejt (cancer stem cell), melyből osztódással „leánysejtek” (daughter cell) képződnek, azonos genetikai állománnyal. Ezek létrehozhatnak egy „folt-léziót” (patch). Tehát klonális expanzió révén létrejön a cancer-field. Ez sok esetben nem mutat különbséget sem klinikailag, sem hisztopatológiailag a normális nyálkahártyához képest, mivel az eltérés a genotípust érinti, és nem feltétlenül jelenik meg fenotípusosan is. Megjelenhet egy prekursorlézió, leukoplakia formájában is, a további klonális

szelekció révén pedig előbb *in situ* karcinóma, majd a bazálmembránt áttörve invazív karcinóma alakulhat ki. Fontos klinikai következménye ennek az elméletnek, hogyha a primer tumor sebészi eltávolítása során visszamarad ebből a cancer field-ből, akkor abból újabb tumor fejlődhet ki [329-331].

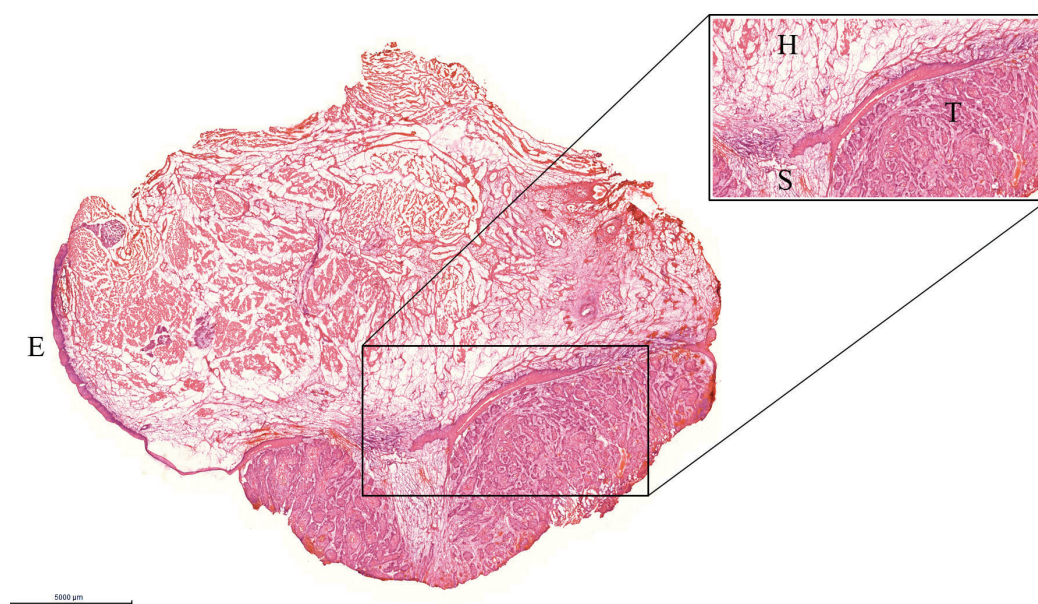
A korai diagnosztika és a rendszeres szűrővizsgálatok a rákos megbetegedések elleni harc alapjai. A betegség halálozási, metasztázis és recidíva képződési mutatói drasztikusan függenek a précancerózus és tumoros állapot fennállásának idejétől. A nemzetközi tömegspektrometriás trendeket követve, a korábbi tumorbiomarker azonosítási stratégiánkat a szokásosan használt klinikai mintákra építettük, így szérumból, plazmából és vizelethől próbáltunk validálható diagnosztikai értékkel rendelkező vegyületeket/vegyületcsoportokat detektálni. Tapasztalataink, és a nemzetközi kutatási eredmények alapján is azt láttuk, hogy a biológiai, klinikai variabilitás, a tumorok heterogenitása és az alkalmazott mintaelőkészítési és vizsgálati módszerek alacsony reprodukálhatósága miatt a várt eredmények elmaradnak. A bizonytalanságok csökkentése érdekében automatizált mintaelőkészítési és extrém érzékenységű nanoLC-MS/MS módszert fejlesztettünk ki, amely peptidek, alacsony molekulatömegű fehérjék vizsgálatára alkalmasnak bizonyult [XXI, XXXIV]. Ezt követően a beavatkozás nélkül gyűjthető, kellemesebb dinamikus tartománnyal és fehérjeprofillal rendelkező testnedvek elemzése felé fordultunk, ennek köszönhetően nyálproteomikai eredményeink már tényleges klinikai környezetben használható diagnosztikai fejlesztések alapjául szolgálhattak (lásd 5.2.4. és 7. fejezetek).

Jelenleg úgy véljük, hogy a tumorigenezis mélyreható megértése és a sejt- és szövetszintű molekuláris folyamatok feltérképezése a képzőképzési tömegspektrometria nélkül nem valósítható meg. Az egysejt szintű vagy sejtről-sejtre történő „omikai” vizsgálatok a jövőben felbecsülhetetlen fontosságúak lesznek a korai diagnosztikához és a megfelelő terápia tervezéséhez és nyomon követéséhez.

Vizsgálatainkban 32 önként jelentkező fej-nyaki daganatos beteg vett részt (6 nő, 26 férfi), átlagéletkoruk 60,44 év (43-81 év). Minden betegről az előzőekben már részletesen tárgyalt módszerrel nyálmintát gyűjtöttünk. Ezt követően a fej-nyaki betegek kivizsgálási protokolljának megfelelően minden beteg úgynevezett direkt laringoszkópián esett át. A legtöbbször általános narkózisban végzett vizsgálat célja egyrészt a szövettani mintavétel, másrészt pedig a folyamat pontos kiterjedésének megítélése, mely sok esetben indirekt vizsgálattal nem kivitelezhető. A beavatkozás alapvető fontosságú a diagnózis felállításához, és pozitív szövettani eredmény esetén a kezelés megtervezéséhez.

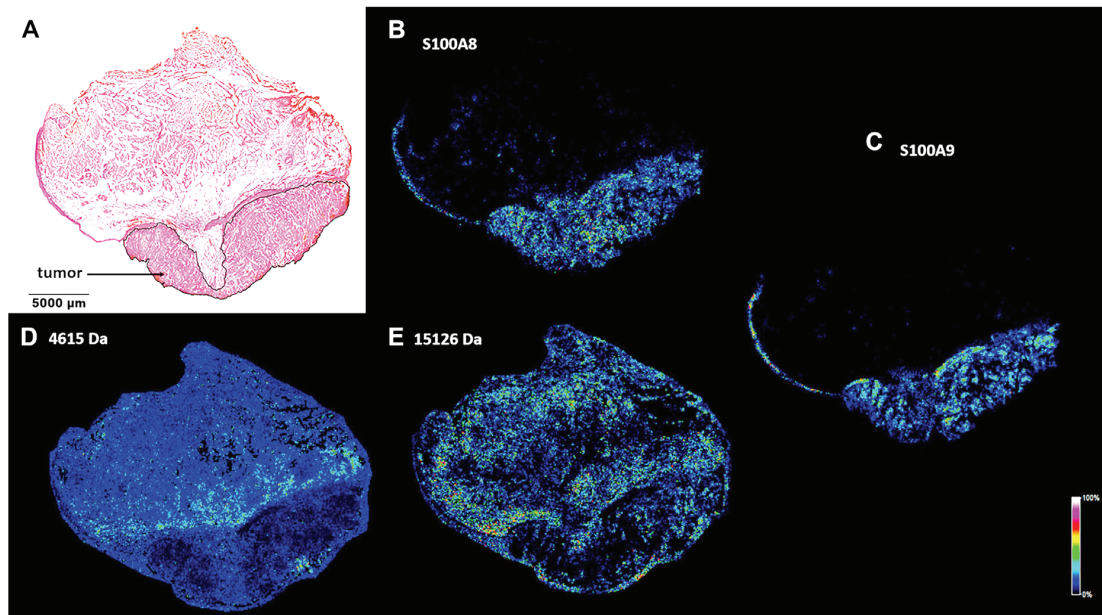
Egy 73 éves betegnél a gége jobb oldalának erózióját okozó daganatos tömeget észleltünk, a gégészeti biopszia és hisztopatológias elemzés invazív keratinizáló laphámsejtes karcinómát mutatott ki. A radiológia lokalizált tumort mutatott nyirokcsomó érintettség nélkül. Mivel a tumor elég nagy és komplex volt ahhoz, hogy megfigyeljük és bemutassuk a morfológiai és molekuláris intratumorális heterogenitást, ezt a HNSCC-mintát választottuk a további IMS vizsgálatokra. A patológiai hematoxilin-eozin (H&E) festéshez 4 µm-es (63. ábra), a MALDI TOF IMS-hez 15 µm-es kriometszeteket készítettünk, a fennmaradó szövetet pedig a további elemzéshez -80°C-on tároltuk. A minták tumorszelvényét a H&E festett minta morfológiai jellemzése

alapján jelöltük meg (64.A. ábra). A 4-17 kDa tartományba tartozó alacsony molekulatömegű fehérjék 80 μ m felbontású IMS vizsgálatában az S100A8 és S100A9 lényegében nem volt kimutatható a minta egészséges szöveti régiójában, míg a neoplasztikus struktúrában és a neostromában, valamint a hiperplasztikus epitheliumban jelen voltak (64.B. és 64.C. ábrák). További azonosítatlan, 4615 Da és 15126 Da tömegű fehérje komponenseket figyeltünk meg, amelyek negatív expresszióval rendelkeztek a tumor régióban, és heterogén eloszlással a teljes egészséges szövetrégióban (64.D. és 64.E. ábra).



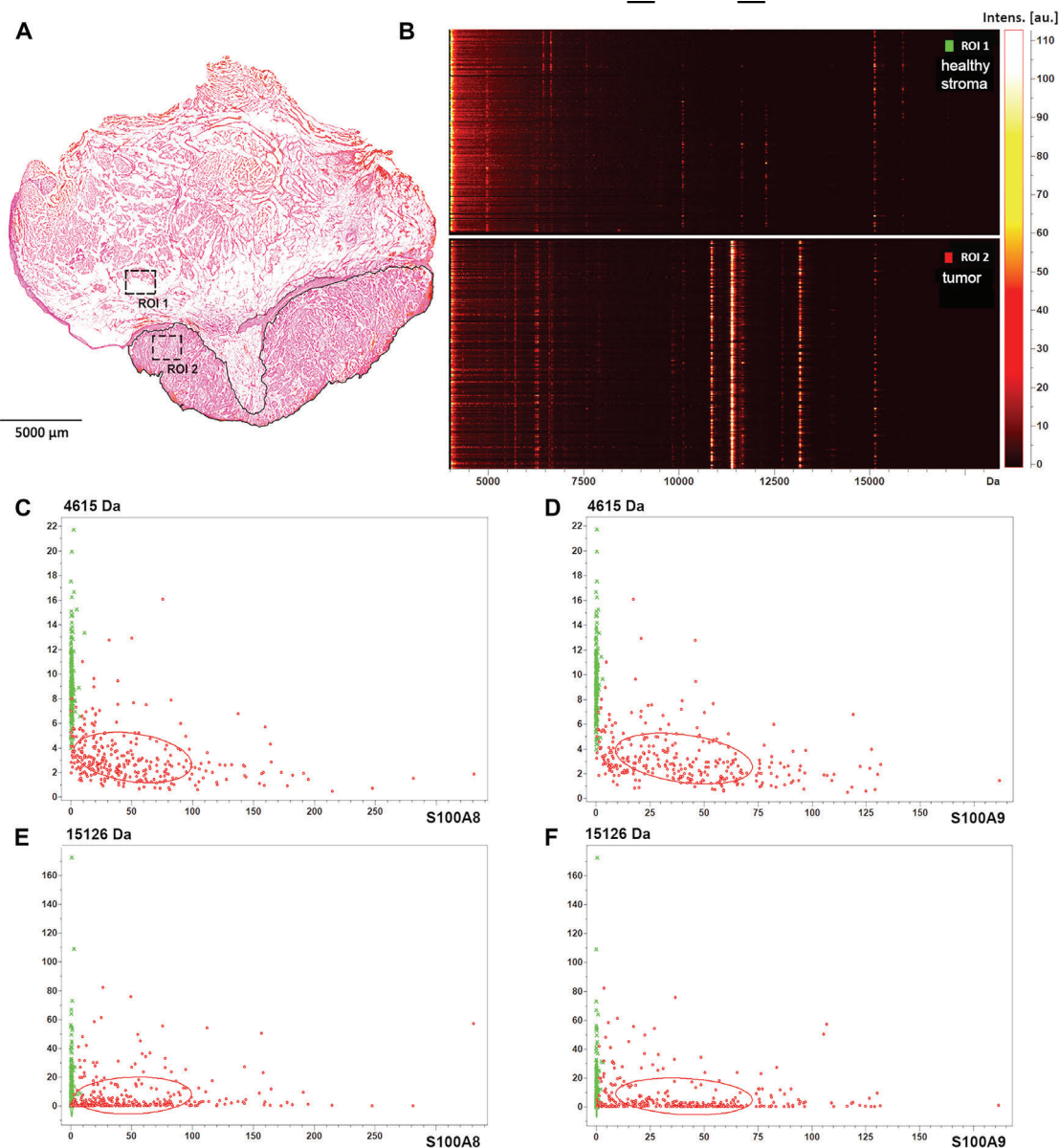
63. ábra: Nagy méretű és nagy mértékű szöveti heterogenitást mutató gégetumor (invazív keratinizáló laphámsejtes karcinóma) hematoxin-eozin festet szövettani képe. (T) neoplasztikus lézió, (H) egészséges szövet, (S) neostroma, (E) hiperplasztikus epithelium. Méretskála: 5000 μ m.

Eredményeink alapján az S100A8 és S100A9 fehérjék egyértelműen expresszálódtak a neoplasztikus régióban az epitheliális eredetű fej-nyaki laphámkarzinómák esetén. Vizsgálatainkkal párhuzamosan hasonló eredményre jutott néhány kutatócsoport [332-335], annak ellenére, hogy korábban a szakirodalom ennek ellenkezőjét állította. Az ellentmondás feloldása érdekében számos bizonyító erejű kiegészítő vizsgálatot, statisztikai elemzést végeztünk el. A specifikus fehérjék szöveti eloszlására jellemző képeket tovább teszteltük a szövetminta véletlenszerűen kiválasztott biopsziaméretű régióinak elemzésével (65.A. ábra, ROI-k). A detektált fehérjék expressziós szintjével arányos képpintenzitásokat gélnézetben jelenítettük meg, ahol az egészséges szövet (ROI1) és a tumor (ROI2) (65.B. ábra) kijelölt tartományaiban található összes képpixelhez tartozó egyedi átlagolt tömegspektrumokat (4-17 kDa) ábrázoltuk. A képek vizuális vizsgálatát alátámasztva, szembetűnő különbségeket lehetett látni az egészséges szövet és a neoplasztikus régiók között 10829 Da és 13146 Da értékeknél, amelyek az S100A8 és az S100A9 fehérjéknek felelnek meg. A calgranulinok mellett az m/z 11344-nál a HIST2H4B hisztonfehérje is felhalmozódott a tumorban (65.B. ábra).

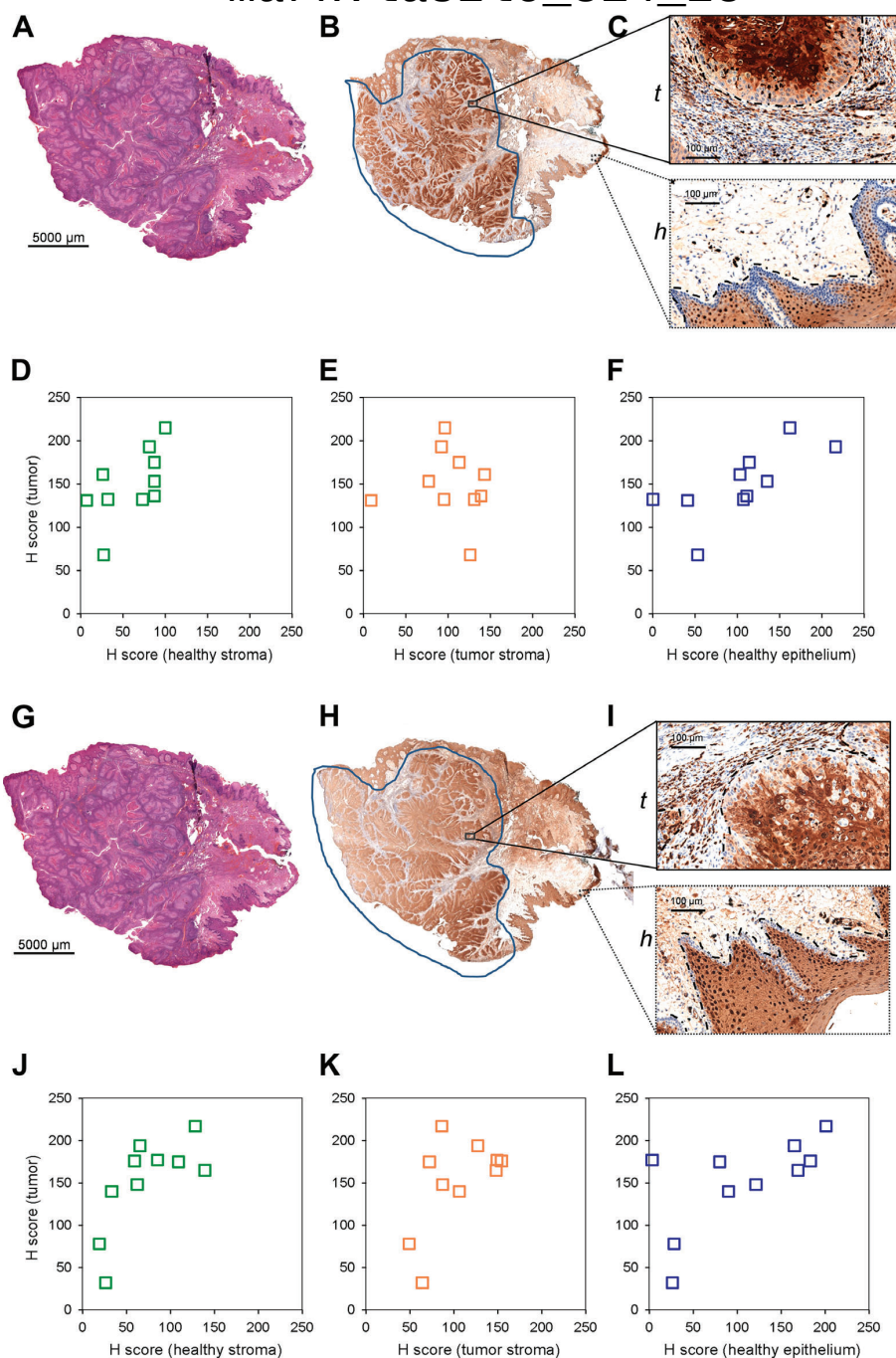


64. ábra: A tumormarkerjelölt fehérjék térbeli eloszlása egy HNSCC klinikai mintában. **(A)** Friss fagyasztott szövetminta patológiai H&E festése. A daganatos régió jelölve. **(B)** és **(C)** MALDI TOF IMS kép az S100A8 (m/z 10829) és S100A9 (m/z 13146) fehérjékről a minta egészséges és tumoros területein. **(D)** és **(E)** MALDI TOF IMS kép azonosítatlan, m/z 4615 és m/z 15126 Da értékű fehérje komponensekről. Méretskála: 5000 μm .

Bár a vizsgált ROI-kon belül az S100A8 vagy az S100A9 expressziója kissé heterogén eloszlást mutatott, egyértelműen megkülönböztette az egészséges és a tumoros területeket, és statisztikailag megbízható pozitív tumormarkernek bizonyult a mintában. A heterogén molekuláris eloszlás a neoplasztikus szöveti heterogenitással van kapcsolatban, ugyanis a neoplasztikus sejteket neostroma hálózza be (63. ábra). Az S100 A8 és A9 fehérjék kiterjedt kapcsolatban vannak a gyulladásos folyamatokkal és a tumorok kialakulásával [336]. A formalinfixált paraffinba ágyazott 4 mikronos szövetmetszeteket további immunhisztokémiai vizsgálatoknak vetettük alá, melynek során S100 A8 és A9 specifikus antitestekkel jelöltük a szöveti fehérjéket. A vizsgálat eredményeit a 66. ábra mutatja be.



65. ábra: A szövetminta biopsziaméretű régióinak fehérjeexpressziója és térbeli eloszlásának elemzése. **(A)** Az egészséges szövet (ROI1) és a tumor szempontjából érdekes régió (ROI2) a minta H&E festett metszetében. **(B)** A 4-17 kDa tömegtartományban detektált fehérjék képintenzitásának gélnézet formátumú ábrázolása. **(C)** Az egészséges (zöld) és a tumoros (piros) ROI-ban lévő spektrumok főkomponens analízise a 4615 Da fehérje és az S100A8, **(D)** a 4615 kDa fehérje és az S100A9, **(E)** az 15126 Da fehérje és az S100A8, valamint **(F)** az 15126 Da fehérje és az S100A9 esetében. Méretskála: 5000 μm .

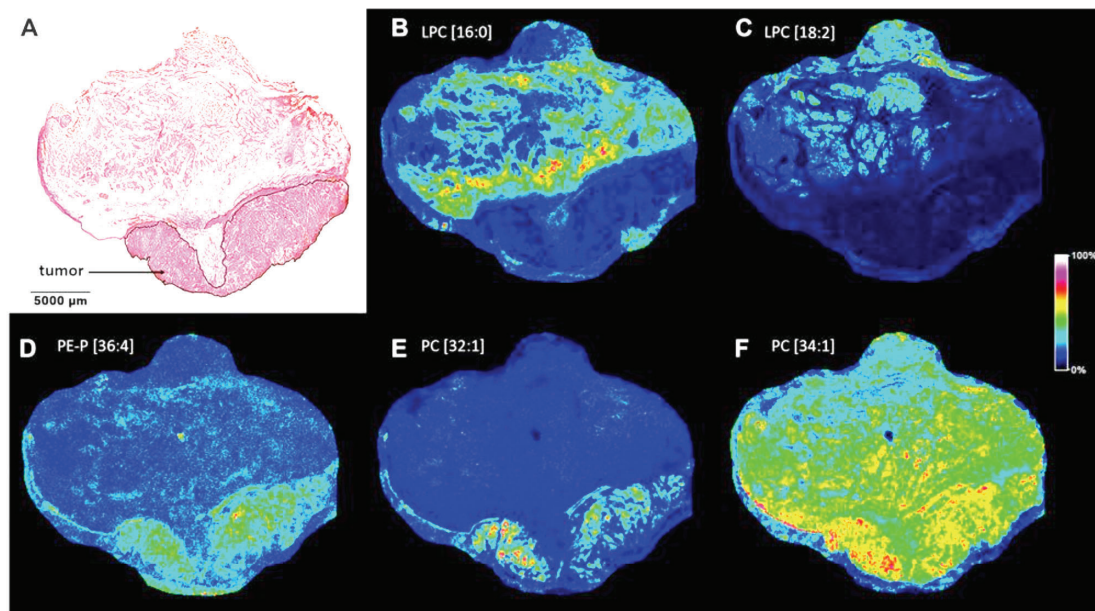


66. ábra: (A, G) Reprezentatív szövetszövet H&E festése. (B) Anti-S100A8 immunhisztokémia. (C) Tumor és neostroma (t) és egészséges hám és stroma (h) szöveti területek nagyított régiói. (D-F) Az S100A8 festődés hisztopatológiai pontozása (D) tumor vs. egészséges szövet (E) tumor vs. neostroma és (F) tumor vs. egészséges epithelium. (H) Anti-S100A9 immunhisztokémia. (I) Tumor és neostroma (t) és egészséges (h) szöveti területek nagyított régiói. (J-L) Az S100A8 festődés hisztopatológiai pontozása (J) tumor vs. egészséges stroma (K) tumor vs. neostroma és (L) tumor vs. egészséges epithelium.

Méretskála: 5000 µm.

A fehérje elemzéseket követően megvizsgáltuk a HNSCC szövetszövetek lokális lipid-összetételének változásait. Amint a 67.B. és 67.C. ábrákon látható, a palmitoil-

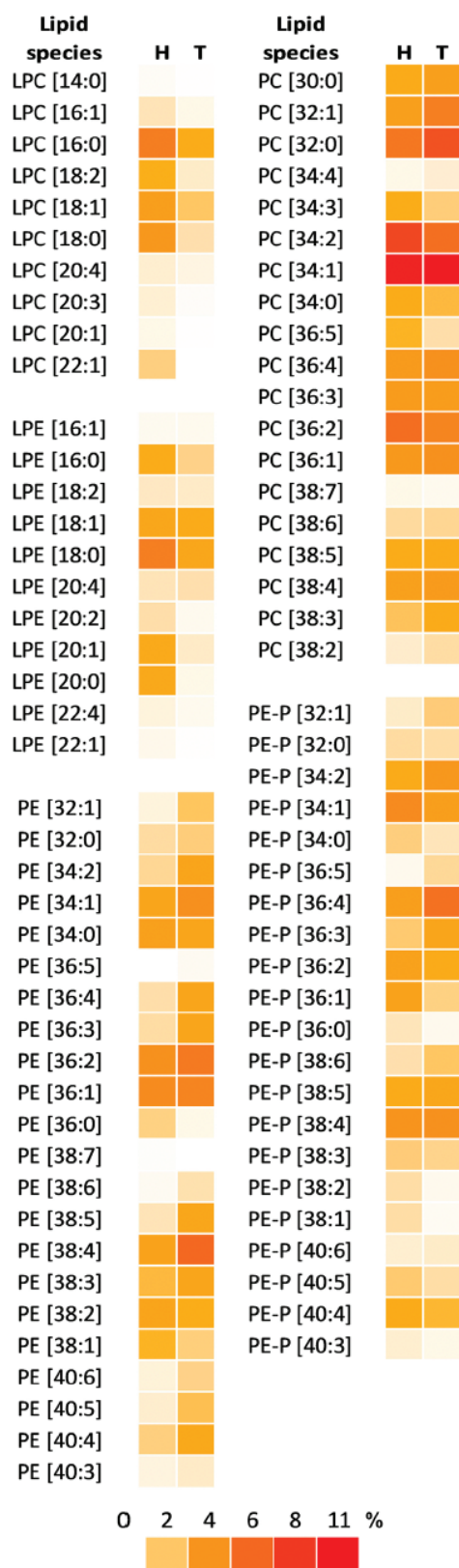
lizofoszfátidilkolin LPC (16:0) és linoleoil-lizofoszfátidilkolin LPC (18:2) szinte teljesen hiányoztak a minta daganatos régiójából, míg ezek a lipidfajták jelen voltak a minta egészséges szövetében. Ezzel kontrasztban a glicerofoszfolipid fajták, mint például a plazmalogén foszfátidil-etanolamin PE-P (36:4) és foszfátidilkolin PC (32:1) és PC (34:1) felhalmozódni látszott a minta daganatos területén (67D.-F. ábrák).



67. ábra: Lipidek lokális eloszlása a vizsgált HNSCC mintában. (A) Fagyasztott szövetminta hematoxin-eozin festése. A palmitoil-lizofoszfátidilkolin LPC (16:0) (B), linoleoil-lizofoszfátidilkolin LPC (18:2) (C), plazmalogén foszfátidil-etanolamin PE-P (36:4) (D), foszfátidilkolin PC (32:1) (E), és foszfátidilkolin PC (34:1) (F) szöveti eloszlása. Méretskála: 5000 µm.

A kvantitatív „shotgun” lipidomika segítségével több mint 300 lipid molekulát azonosítottunk az egészséges és daganatos szövetrészekből. A lizofoszfátidil-kolin (LPC) és a lizofoszfátidil-etanolamin (LPE) szintje általában csökkent a daganatban, ami az LPC és LPE lipidosztályok szintjének csökkenését eredményezte. Ezzel párhuzamosan ellentétes tendenciát figyeltünk meg a foszfátidil-etanolamin (PE) és kisebb mértékben a foszfátidil-kolin (PC), valamint a plazmalogén foszfátidil-etanolamin (PE-P) osztályai között az egészséges és daganat esetén (68. ábra). Meg kell jegyezni, hogy a PE, a PC és a PE-P a lipidom fő alkotórészei, ezért akár egyetlen lipidfajban is bekövetkező változás drámai hatással lehet a sejtfiziológiára és a tumor progressziójára.

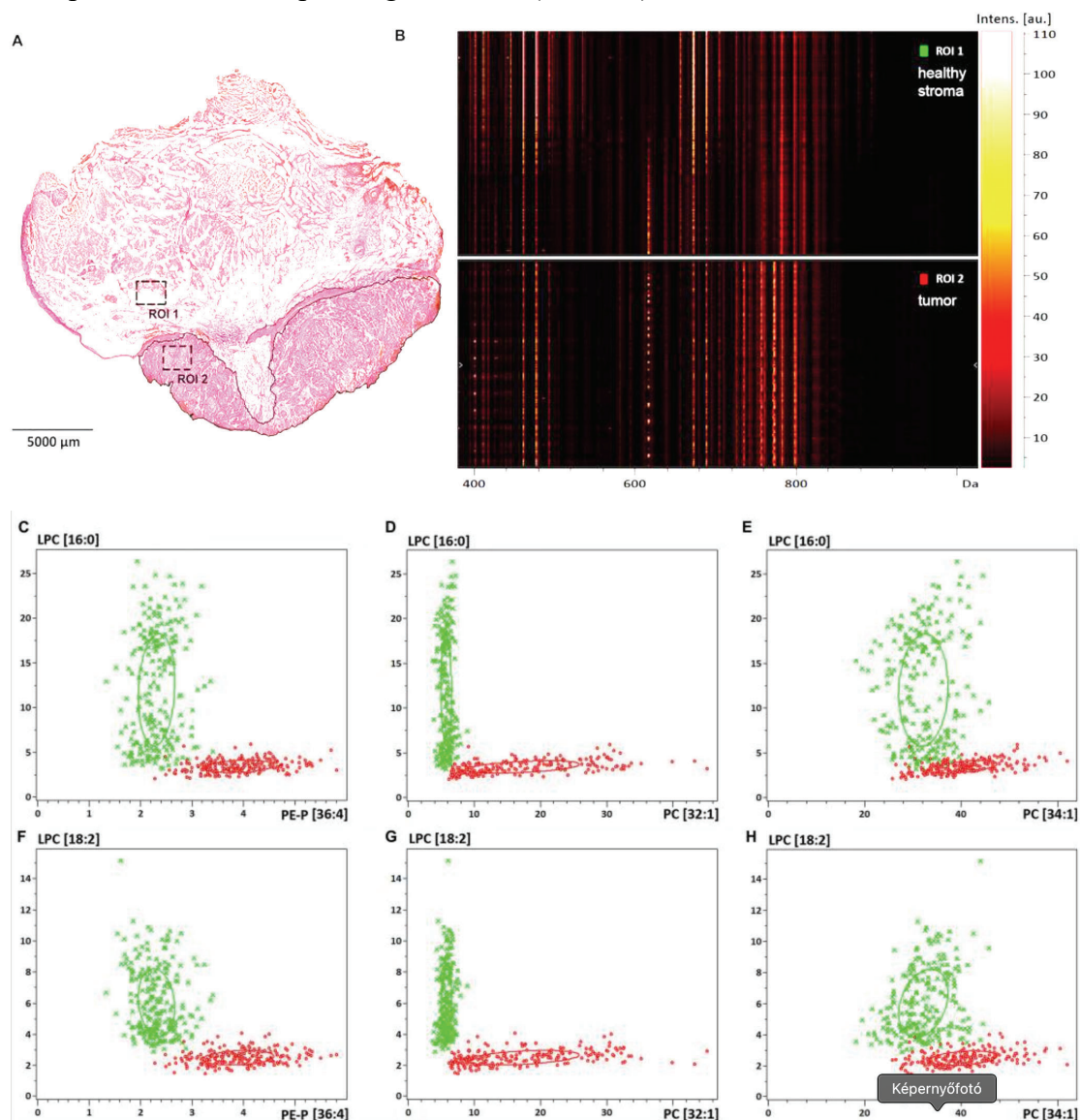
Elvégeztük a MALDI IMS eredmények statisztikai értékelését is az S100 fehérjék vizsgálatánál bemutatott módon. Ugyanazokat az egészséges (ROI1) és tumor (ROI2) területeket kijelölve, a lipidexpressziót gélnézetben jelenítettük meg a 400–1000 Da tömegtartományban (69.B. ábra).



68. ábra: Főbb lipidfajták kvantitatív változásait mutató heatmap az egészséges (H) és tumoros (T) régiókban.

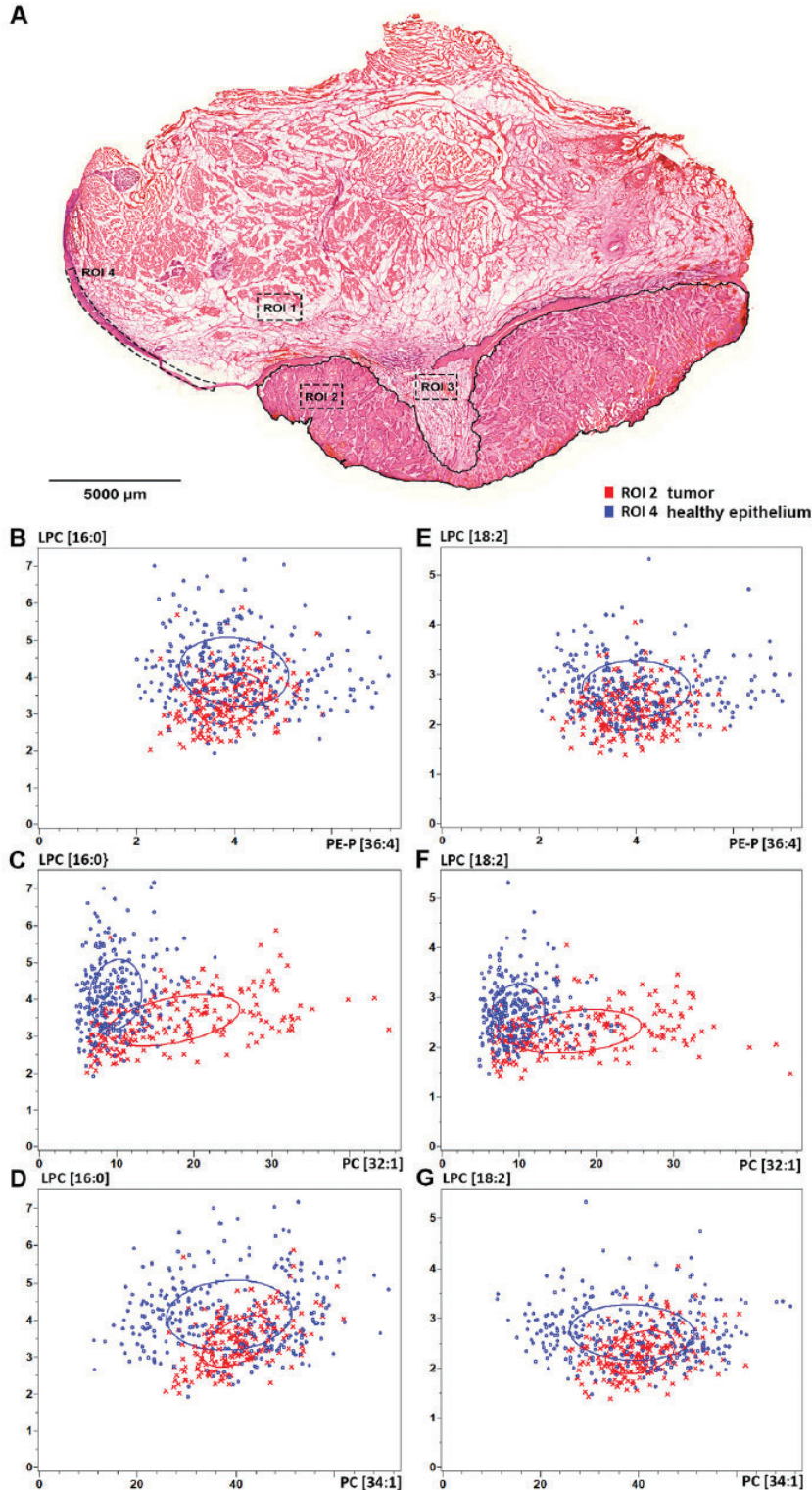
A lipidek m/z 500 körüli eltűnése, valamint m/z 700-800 tartományban való felhalmozódása összhangban volt a daganatban megfigyelt lizofoszfolipid-fogyással és foszfolipid-felhalmozódással. A negatív (LPC (16:0), LPC (18:2)) és pozitív lipidmarker

jelöltek (PE-P (36:4), PC (32:1), PC (34:1)) eloszlásai az egészséges és tumorszövetekben egyértelműen elkülönültek (69.C.-H. ábrák), ami azt jelzi, hogy ezen lipidfajták kombinációja megbízhatóan használható a patológias folyamatok értékelésére. A daganat régiója alig vagy egyáltalán nem különbözött a hiperplastikus epitheliumtól, amely a korai precancerózus állapot meglétére utal (70. ábra).



69. ábra: (A) Fagyasztott szövetminta hematoxin-eozin festése. (B) Detektált lipidek képintenzitásának gélnézeti formátuma a 400-1000 Da tömegtartományban. Az egészséges (ROI1, zöld) és a tumoros (ROI2, piros) régiókban lévő pixelek főkomponensanalízise, (C) LPC (16:0) és a PE-P (36:4), (D) az LPC (16:0) és PC (32:1), (E) LPC (16:0) és PC (34:1), (F) LPC (18:2) és PE-P (36:4), (G) LPC (18:2) és PC (32:1), (H) LPC (18:2) és PC (34:1) esetén. Méretskála: 5000 μm .

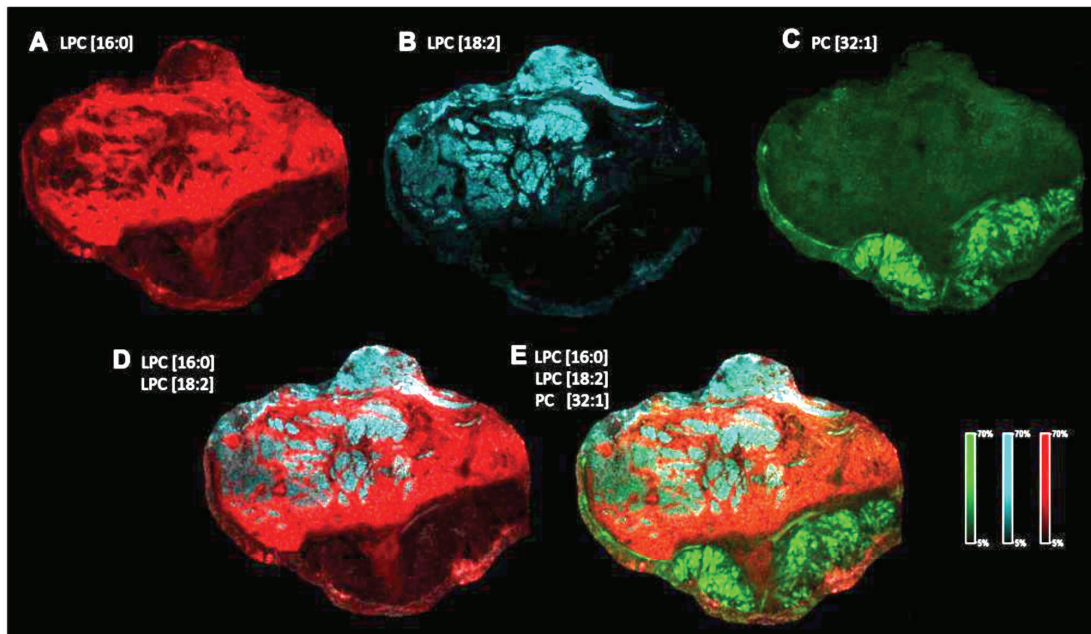
A



70. ábra: (A) Fagyasztott szövetminta hematoxin-eozin festése. A tumor (ROI2) és hiperplastikus epithelium (ROI4) specifikus lipidjeinek főkomponensanalízise. (B) LPC (16:0) és a PE-P (36:4), (C) az LPC (16:0) és PC (32:1), (D) LPC (16:0) és PC (34:1), (E) LPC (18:2) és PE-P (36:4), (F) LPC (18:2) és PC (32:1) (G) LPC (18:2) és PC (34:1) esetén. Méretskála: 5000 μm .

Az egészséges szövetben expresszáldott LPC (16:0) és LPC (18:2) egymástól eltérő lokális eloszlást mutatott (71.A.B.D. ábrák), amely az egészséges szövet és az azt

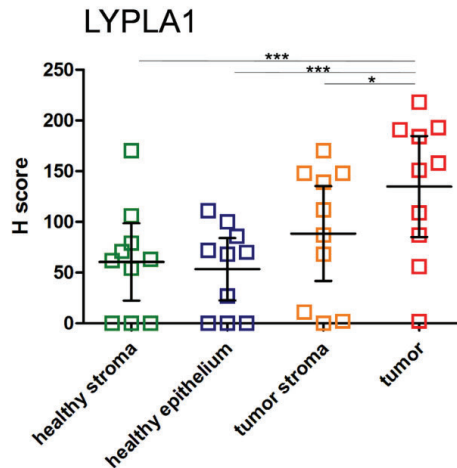
behálózó stroma molekuláris különbözőségét mutatja. A specifikus tumormarkerként detektált PC (32:1) a neoplasztikus szövetben kiegészíti az előbb említett lipideket, kirajzolva a tumorszövetet (71.C.E. ábrák)



71. ábra: Specifikus LPC és PC lipidek eloszlása a szövetmintában.

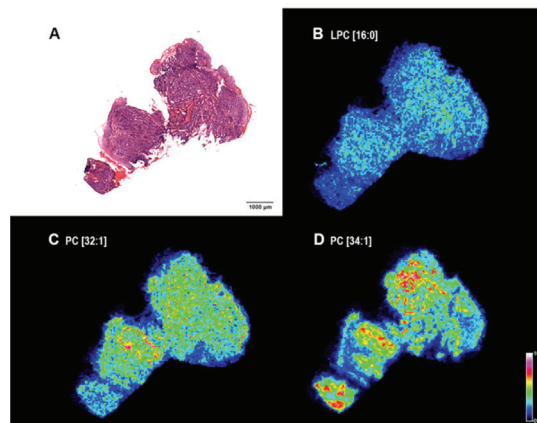
Piros: LPC (16:0), kék: LPC (18:2), zöld: PC (32:1).

A szövetminták pre- és posztoperatív analízise, vagy akár az *in situ*, valós idejű lipid alapú analízis a műtét során valódi diagnosztikai lehetőséggé vált a klinikusok számára [337]. Ennek ellenére a formalinfixált paraffinba ágyazott (FFPE), kémiaiag térhálósított minták immunhisztokémiája továbbra is a kórszöveti gyakorlat rutinja. A fixált minták még nem kompatibilisek a képalkotási tömegspektrometriás lipidanalízissel, és nem állnak rendelkezésre olyan antitestek sem, amelyek felismernék az LPC vagy LPE lizofoszfolipideket. Immunhisztokémiával kompatibilis célpontot keresve ezért azt feltételeztük, hogy a lizofoszfolipid depléción a HNSCC kép daganatos területén összefügghet a lizofoszfolipid lebontó enzim, a lizofoszfolipid lipáz A1 (LYPLA1) expressziójának növekedésével. Ugyanazt a paraffinba ágyazott patológiás HNSCC-mintát használva, amelyeket S100A8-ra és S100A9-re teszteltünk, a LYPLA1 expresszióját és eloszlását immunhisztokémiával tettük láthatóvá. A daganatos és egészséges szövetterületek kiválasztott régióit hisztopatológiai pontozásnak vetettük alá, hogy meghatározzuk a LYPLA1 expresszióját a tumorban és az egészséges szövetben. Az expressziós szintek kimutatása a tumorban és az egészséges szövetben a LYPLA1 egyértelmű felhalmozódását mutatta a daganatban, ami összhangban van az LPC (16:0) és az LPC (18:2) eredményeivel. Ezenkívül a LYPLA1 expresszióját a legtöbb vizsgált daganatos esetben magasabbnak találtuk, mint a neostroma esetében, ami ugyancsak jó egyezést mutatott az LPC (16:0) és az LPC (18:2) eloszlással. Összességében úgy tűnik, hogy az LPC (16:0), LPC (18:2) és LYPLA1 expressziója és eloszlása fordítottan korrelál, alátámasztva a daganat lipidalapú diagnózist (72. ábra).



72. ábra: A lizofosfolipid lipáz A1 expressziós szintje (H score) a különböző szöveti struktúrákban.

A MALDI TOF IMS vizsgálataink során specifikus tumor biomarkerként azonosított fehérjék és lipidek klinikai alkalmazhatóságának tesztelését preoperatív biopsziákon végeztük el. A 73. ábra egy 62 éves beteg hypopharynxéből vett viszonylag nagy szöveti biopszia hisztológiai elemzése során nem volt detektálható egészséges szövetrész. A kriometszetek MALDI IMS vizsgálata alapján egyértelműen detektálható volt az LPC (16:0), a PC (32:1) és a PC (34:1). A daganatban felhalmozódó PC (32:1) és PC (34:1) mellett az LPC (16:0) jelenléte kismértékű egészséges sejtes filtrációra utalt. A negatív és pozitív expresszióval rendelkező lipidmarker-készlet használata tehát hatékony eszköznek bizonyult a preoperatív biopsziás minta daganatos jellegének azonosítására.



73. ábra: Specifikus LPC és PC lipidek eloszlása a preoperatív biopsziában.

(A) Hematoxilin-eozin festett szöveti kép. (B) LPC (16:0), (C) PC (32:1), (D) PC (34:1). Méretskála: 1000 μ m.

A klinikai rutindiagnosztika során alkalmazott FFPE szövetmetszetek proteomikai elemzése érdekében egy jelölésmentes szemikvantitatív analitikai módszert dolgoztunk ki [XXIII]. Munkánk során fej-nyaki laphám karcinómák neoplasztikus és fenotípusosan egészséges szöveti régióinak LC MS/MS elemzését végeztük el. Tizenhat önkéntes HNSCC-vel diagnosztizált beteget (16 férfi, átlagéletkor 61 év, 45 és 79 év között) vontunk be a vizsgálatokba. Minden esetben erős dohányzásról és rendszeres alkoholfogyasztásról számoltak be. Minden daganat előrehaladott primer eset volt (III-

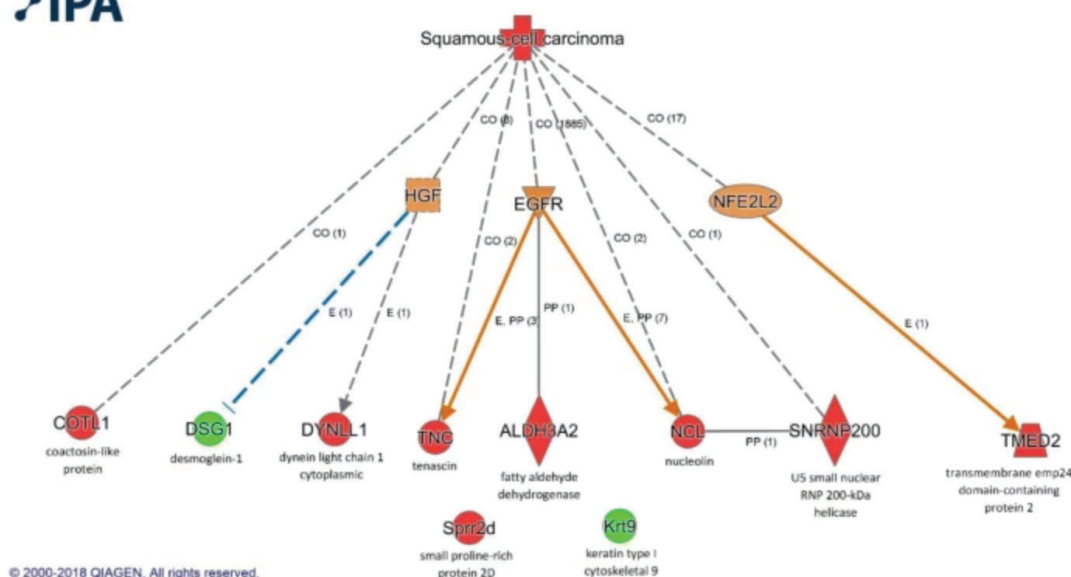
IV. A stádium). A kizárási kritériumok közé tartozott a nem SCC szövettan, a HPV pozitivitás, a korábbi onkológiai kezelés és a recidíva vagy a második primer tumor. A klinikai vizsgálat során minden daganatból biopsziát vettünk a kezelés előtti diagnózis érdekében. A biopsziás mintákat formalinban fixáltuk, majd paraffin-beágyazással, metszéssel és hematoxilin-eozin festéssel végeztük a hisztológiai vizsgálatot, amely minden esetben igazolta a HNSCC-t. Kutatási célból az összes megfelelő paraffinba ágyazott szövetblokkot előkerestük, és az eredeti blokkokból további metszeteket (15 μ m vastagság) készítettünk, és azokat festés nélkül hagyományos szövettani lemezre helyeztük. Ezenkívül egy másik H&E festett metszetet (7 μ m vastagság) készítettünk a blokkokból, amelyekben egy nyilvánvalóan malignus régiót jelölt meg a patológus a lemez ellenoldali oldalán. Ezen jelölés alapján minden festetlen paraffin fixált rész tartalmazó lemez azonos részét ugyanúgy körbe rajzoltuk. A paraffinmentesítést úgy végeztük, hogy a festetlen tárgylemezeket xiollal, 90%-os etanollal (V/V), 70%-os etanollal (V/V), 50%-os etanollal (V/V) és 50 mM ammónium-hidrogén-karbonáttal mostuk. Az antigén visszanyerését 100 mM Tris-HCl pufferrel végeztük (97°C, 30 perc). A szövettanilag nyilvánvalóan malignus rész alapján a szövetet mikroszkóp alatt kipreparáltuk, majd 2 ml-es SDS lízispuffert tartalmazó Eppendorf csőbe gyűjtöttük. A tumorról szomszédos normál szövetrégiót is kimetszettük, és mindegyik mintát lízispufferben inkubáltuk (97°C, 30 perc). Centrifugálás után jéghideg abszolút etanolt adtunk a felülúszóhoz 9 térfogat felesleggel. A mintákat egy éjszakán át 4°C-on tartottuk a fehérje denaturálása céljából. A pelletet kétszer mostuk abszolút etanollal, a fehérjéket 8 M karbamiddal oldottuk. A redukciót és az alkilezést egy éjszakán át tartó tripszin emésztés követte. A kapott triptikus peptideket Pierce C18 spin oszlopokkal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) tisztítottuk. Az elemzéshez használt MS egy Bruker MAXIS II ETD Q-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) volt, egy Ultimate 3000 nanoRSLC rendszerhez (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) kapcsolva. A mintákat egy Acclaim PepMap100 C-18 csapdaoszlopra (100 μ m $\times$ 20 mm, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) injektáltuk online, egy ACQUITY UPLC M-Class Peptide BEH C18 oszlophoz (130 Å, 1,75 μ m) $\times$ 250 mm, Waters, Milford, MA, USA). A peptideket 48°C-on választottuk el 300 nl/perc áramlási sebességgel, 4% B oldószer 0-11 perc, majd 120 perces gradiens 50% B oldószerig. Az A oldószer víz + 0,1% (V/V) hangyasavból állt, míg a B oldószer acetonitril +0,1% (V/V) hangyasav volt. Az injektált minta mennyisége 0,5 μ g volt. A minta ionizálása pozitív elektroporlasztásos ionizációs módban történt egy CaptiveSpray nanoBooster ionforráson keresztül. A kapilláris feszültség 1300 V, a nanoBooster nyomás 0,2 Bar, a szárítógáz 150°C, az áramlási sebesség 3 l/perc volt. A külső tömegkalibrálás az Agilent low concentration tuning mix-szel, közvetlen infúzióval történt. A belső tömegkalibrálást a lock mass segítségével végeztük minden egyes futtatásnál nátrium-formiát alkalmazásával. Az MS-spektrumokat fix ciklusidővel (2,5 s) vettük fel az m/z 150–2200 tartományban 3 Hz-en, a minimális prekursor tömeggel, amely m/z 322 volt. A CID-t 16 Hz-en végeztük a nagy és 4 Hz-en az alacsony intenzitású prekursor ionoknál. Az egyszeresen töltött peptideket kizártuk az elemzésből, csak többszörösen töltött peptideket választottunk a fragmentációhoz. A prekursor jelek ütközési energiáját automatikusan változtattuk, és a gyári beállításokat alkalmaztuk. A fehérjeanalízishez a nyers adatokat a Compass

DataAnalysis 4.3 szoftverrel (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) újralibráltuk. Az adatokat a ProteinScape 3.0 szoftverrel (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Németország) dolgoztuk fel. A fehérjék azonosítása a humán Swissprot adatbázis (2015_08) alapján történt a Mascot keresőmotor 2.5-ös verziójával (Matrix Science, London, Egyesült Királyság) a következő keresési paraméterek alkalmazásával: 7 ppm peptidtömeg-tolerancia, 0,05 Da fragmentumtömeg-tolerancia, 2 kihagyott hasítási hely, ciszteinek karbamidometilezése fix módosításként, dezamidálás (NQ) és oxidáció (M), mint változó módosítás, a fehérjéket 1%-os FDR határérték alkalmazásával azonosítottuk. Ezután a MaxQuant (szoftververzió 1.5.3.30) segítségével, az alapértelmezett paraméterek alkalmazásával, jelölés nélküli kvantifikációt (LFQ) hajtottunk végre. A MaxQuant elemzés csak a Mascot által korábban azonosított fehérjéket kereste. Az adatok statisztikai elemzését diszkriminancia analízis és páros t-próba segítségével végeztük el. A bioinformatikai elemzést IPA (Ingenuity Pathway Analysis) segítségével végeztük, hogy az azonosított fehérjéket ismert jelátviteli útvonalakhoz rendeljük.

A minták vizsgálatával 1164 fehérjét azonosítottunk legalább 2 egyedi peptid alapján. A diszkriminancia analízis 18 fehérje expresszióját mutatta ki, a tumor és a normál szöveti régiók elkülönítésére. Páros t-próbát használtunk az egyes párok közötti statisztikai szignifikancia tesztelésére a diszkriminatív 18 fehérje tekintetében. A p értéket 0,1-nek határoztuk meg, figyelembe véve a koherens tumor és normál szövet mintapárjainak alacsony számát ($n=16$). Nyolc fehérje mutatott szignifikánsan nagyobb mennyiséget a neoplasztikus régióban, ezek a: tenascin, transmembrane emp24 domain-containing protein 2, cytoplasmatic dynein light chain 1, coactosin-like protein, small proline-rich protein 2D, nucleolin, U5 small nuclear RNP 200-kDa helicase és a fatty aldehyde dehydrogenase voltak. A desmoglein-1 és a keratin Type I cytoskeleton 9 mennyisége csökkent a tumorban.

Az IPA nem talált kapcsolatot a fehérjék között, de feltártuk a létező kölcsönhatásokat, amelyek lehetséges célpontok lehetnek a HSCC-k jövőbeni terápiáihoz (74. ábra).

Elméletileg a TMED2 vagy annak indukálója az NFE2L2 fehérje gátlása ígéretes terápiás eszköz lehet a HNSCC invázió ellen. Az NCL az EGFR által közvetített útvonalakon keresztül elősegítheti az EGFR citoplazmatikus részének dimerizációját, így az NCL túlzott expressziója lehet az EGFR aktiváció következménye és kezdeményezője is. Ezért az interferáló NCL ígéretes lehet az EGFR-pozitív HNSCC-ban, míg a mennyiségi csökkenése az anti-EGFR terápia hatékonyságának markereként szolgálhat.



74. ábra: A fej-nyaki laphám karcinóma során expresszáldott fehérjék jelátviteli útvonal analízise. CO: korreláció, PP: fehérje-fehérje interakció, E: expresszió

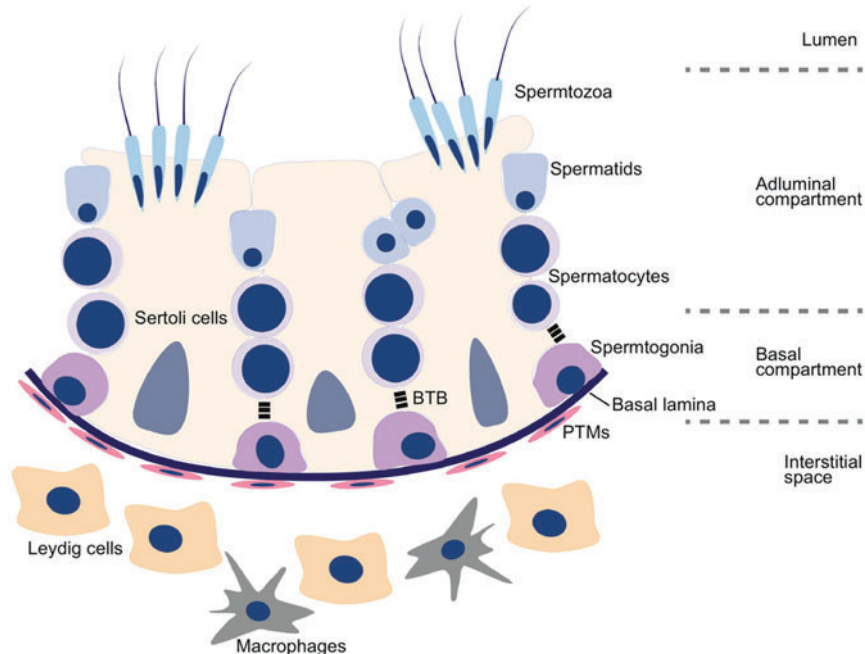
A TNC-t tartalmazó EGF-szerű ismétlődések célpontként szolgálhatnak az EGFR-pozitív HNSCC-kal szemben. Az EGFR gátlása a TNC leszállítását eredményezi. Figyelembe véve a TNC és az EGFR közötti sokféle összefüggést, a TNC potenciális célpontként szolgálhat a HNSCC-ban és terápiás markerként az anti-EGFR kezelésben. A DYNLL1-hez kapcsolódó citoskeletális átrendeződés és a tumorsejtek migrációja elméletileg gátolható anti-HGF terápiával, mivel a DYNLL1 közvetett kölcsönhatást mutat a HGF-fel a HGF/c-MET útvonalon HNSCC-ban.

Az IPA azt találta, hogy a HGF indirekt gátolja a DSG1-et rosszindulatú melanómában, rávilágítva arra, hogy a DSG1 leszállítása hozzájárul a sejt-sejt adhézió megzavarásához, ami megkönnyíti az inváziót. Így a HGF gátlása tumorelles hatást fejthet ki a sejt-sejt kapcsolatok fenntartásával a dezmoszómák DSG1 túlzott expressziója általi stabilizálása révén. Figyelembe véve, hogy az EGFR-útvonal közös jeleket tartalmaz a HGF-közvetített útvonalakkal, ami redundanciát és gyakran mérsékelt terápiás választ eredményez az anti-EGFR-kezelésre, az EGFR és a c-MET/HGF-útvonal együttes gátlása kialakulóban van. A zavaró redundáns útvonalak (p44/p42 MAPK, PI3K/AKT, STAT) kifejthetik a kívánt rákellenes hatást. Amíg a HGF, EGF és NFE2L2 által közvetített útvonalakat egyszerre célzó, rutinszerűen alkalmazott rákellenes gyógyszerkombinációk nem állnak rendelkezésre, a túlzottan expresszált DYNLL, TNC, NCL és TMED2 gátlása diagnosztikus szerepükön túl daganatellenes hatást is kifejthet a HNSCC-re [XXIII].

5.3.2. Patológiás spermatogenezis molekuláris mechanizmusának vizsgálata [XXIV, XXVI]

A spermatogenezis az a folyamat, amelyben haploid spermiumok fejlődnek ki a spermatogóniákból, ondótubulusokban (75. ábra). Össejtosztódással kezdődik, majd mitózissal folytatódik és végül meiózissal zárul. Az elsődleges spermatociták másodlagos

spermatocitákra osztódnak, amelyek tovább termelnek haploid spermatidokat, és végül érett spermiumokká alakulnak. A spermatogenezis a herékben az ondótubulusokon belül történik, míg a spermiumok további érése a mellékhere csatornáiban valósul meg [338-340].



75. ábra: A heresejtek és a spermatogenezis sematikus folyamata [341].

A spermatocitogenezis egy diploid spermatogóniummal kezdődik, amely mitózison keresztül eltér, és elsődleges spermatociták keletkeznek. Minden elsődleges spermatocita a lumenbe vándorol, replikálja a DNS-t, és átesik az első meiózison, másodlagos spermatocitákat termelve, amelyek aztán haploid hímivarsejtekre osztódnak. A spermiogenezis során a hímivarsejtek farkat képeznek, DNS-t csomagolnak, és transzkripciósan inaktívvá válnak [342, 343].

Ezt követően megtörténik a felesleges citoplazma és organelumok eltávolítása. Ez a spermiáció néven ismert folyamat, ahol a Sertoli-sejtek elnyelik a maradványokat. Az intratesztikuláris tesztoszteron jelentős hatással van a spermatogenezisre legalább négy kritikus folyamaton keresztül: a vér-here gát fenntartása, a meiózis, a Sertoli-sejt-spermatid adhézio és a spermium felszabadulása az ondótubulusok lumenébe [344]. A mellékherébe szállított spermiumok motilitása és termékenyítőképessége fokozódik. A Sertoli-sejtek szerkezeti és metabolikus támogatást nyújtanak, szabályozzák a szoros kapcsolatokat és fagocitizálják a maradék citoplazmát. Ezenkívül anyagokat választanak ki a meiózishoz, a tesztoszteron koncentrációhoz és a hormonszabályozáshoz, és védik a hímivarsejteket az immunrendszerrel (vér-here gát) [345].

A Sertoli-sejtek lipidmembrán kölcsönhatásokon keresztül ismerik fel az apoptotikus csírasejteket, és a szeminolipidek döntő szerepet játszanak a spermatogenezisben. A herében a szulfatált glicerogalaktolipidek dominálnak, a galaktozilációt az UDP-galaktóz:ceramid galaktoziltranszferáz (CGT) katalizálja. A CGT-hiányos egerek terméketlenséget, neurológiai rendellenességeket és károsodott spermatogenezist

mutatnak, kiemelve a szulfoglikolipidek fontosságát. A szeminolipidek stabilizálják a hímivarsejt membránokat és lehetővé teszik a sejt-sejt adhéziót. A foszfatidilkolinok és a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k) szintén kulcsszerepet játszanak a herék szerkezetében és a termékenységekben [345]. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a herékben lévő lipidek, beleértve a zsírsavakat, glikolipideket és szeminolipideket, különféle biológiai funkciókat látnak el. A szeminolipidek, amely az emlős hereszövetben és a spermiumokban a fő glikolipid frakció nélkülözhetetlenek a egészséges spermatogenezishez [346-351].

Az azoospermia, egy olyan patológiás folyamat, amikor nem mutatható ki hímivarsejt a lecentrifugázott ejakulátumban, ez a kóros állapot a terméketlen férfiak 10-15%-át érinti. A jelenség tovább osztályozható obstruktív vagy nem obstruktív azoospermiaként. A „Sertoli cell only” szindróma (SCOS) a leggyakoribb kóros elváltozás a nem obstruktív azoospermia hátterében, és a csírahám teljes hiánya jellemzi, ilyenkor a Sertoli-sejtek kizárólag a szeminiferus tubulusokban vannak jelen. Gyakran genetikai rendellenességek (pl. Y kromoszóma mikrodeleció, Klinefelter szindróma) vagy környezeti károsodások (pl. toxin expozíció, sugárzás, korábbi vírusfertőzés) okozzák, de többnyire idiopátiás. Ezekben az esetekben a diagnosztikai vizsgálatok magukban foglalják a hormonszint mérését (a normál tesztoszteron értékek mellett általában emelkedett FSH szintet is kimutatnak), de végleges diagnózist csak herebiopszia ad, ahol asszisztált reprodukcióhoz egyidejűleg here spermium extrakció (testicular spermium extraction, TESE) is lehetséges [352]. A kezelési lehetőségek az állapot súlyosságától függően változnak. Enyhébb esetekben a herében a részleges vagy teljes spermatogenezis szigetszerűen megtalálható, ezek a betegek asszisztált reprodukciós technikákkal (ART), többnyire mikro-TESE-t követő intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI) alkalmazásával saját gyermeket vállalhatnak [352, 353].

A Johnsen pontozási rendszer egy kórszövettani osztályozás, amely egytől tízig terjedő skálán értékeli a herekárosodást és a spermium érettségét a heretubulusokban (17. táblázat). Ez a rendszer értékeli a spermatogenezist, a késői spermatidokat, a korai spermatidokat és a csírasejteket a heretubulusokon, és e tényezők összessége alapján határozzuk meg a pontszámot. A Johnsen érték tíztől, ahol teljes a spermatogenezis, egyig terjed, ahol nem található geminális epithélium [354]. Mesterséges megtermékenyítés (IVF) a Johnsen 7 érték felett lehetséges.

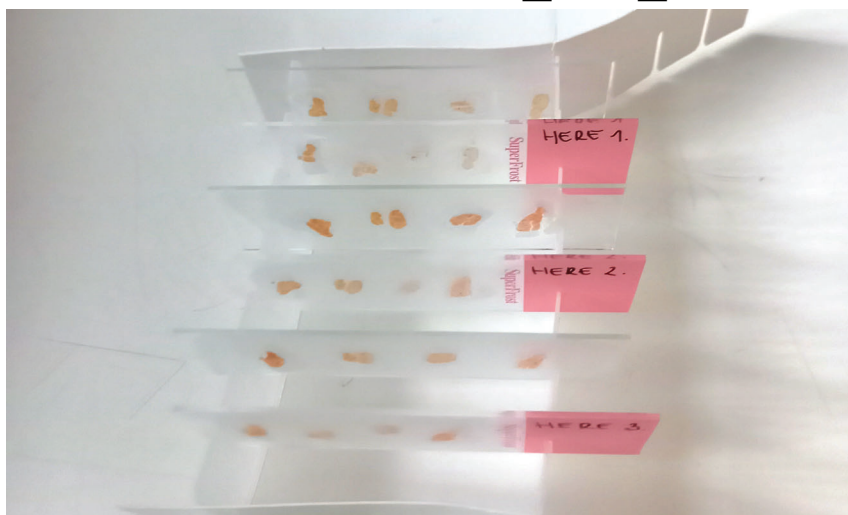
Az első MALDI IMS tanulmányt egereken végzett hereszöveti vizsgálatairól 2009-ben tette közzé Goto-Inoue és csoportja. Megállapították, hogy a szeminolipid, egy szulfatált gliceroglikolipid, az emlős herében található glikolipidek 90%-át teszi ki, továbbá, hogy a szeminolipidek sejtspecifikus lokalizációja szignifikáns összefüggést mutatott a here érésével [347]. Hashemitabar és munkatársai felfedezték, hogy az asthenozoospermiát, amely a férfiak meddőségének gyakori oka, a spermiumok csökkent motilitása jellemzi. A kutatók normozoospermiás és asthenozoospermiás betegek spermiumfarok proteomikáját elemezték, hogy új biomarkereket azonosítsanak MALDI technikával. Kimutatták, hogy ezek a fehérjék markerekként szolgálhatnak a hímivarsejt diszfunkció diagnózisához, a férfi fogamzásgátlás fejlesztéséhez és az embrió minőségének előrejelzéséhez [355].

17. táblázat: A Johnsen értékelési rendszer jellemzői.

Johnsen pontszám	Szövettani jellemzők
10	Teljes spermatogenezis, sok spermatozoa, geminális epithélium szabályos vastagságú szabad lument hagyva
9	Sok spermatozoa, geminális epithélium rendezetlen elmosódott lumen
8	Néhány spermatozoa figyelhető meg
7	Nincs spermatozoa, de sok spermatida látható
6	Nincs spermatozoa és csak néhány spermatida van jelen
5	Nincs spermatozoa, nincs spermatida, sok spermatocita van
4	Csak néhány spermatocita található
3	Spermatogoniák csak a csírasejtekben vannak
2	Nincs csírasejt csak Sertoli-sejtek láthatók
1	Nincs csírasejt és Sertoli-sejt a szövetben

Korábban Nielsen és munkatársai kimutatták, hogy a rendszeres kannabisz használat ronthatja a spermiumok minőségét azáltal, hogy megzavarja az endokannabinoid rendszert (ECS) a férfi nemi szervekben. A heresejtekben endokannabinoid-szintetizáló enzimeket, diacil-glicerín-lipázt és N-acil-foszfátidil-etanol-amin-specifikus foszfolipáz D-t, valamint kannabinoid receptorokat találtak. Ahogy az várható volt, az ECS részt vesz a herék fiziológiájának szabályozásában, beleértve a spermatogenezist és a Leydig-sejtek működését, ami arra utal, hogy a kannabisz rekreációs célú használata káros hatással lehet a herék működésére [356].

Vizsgálataink során emberi hereszövetminták foszfolipid eloszlását vizsgáltuk MALDI IMS segítségével. A hereszövetmintákat a meddőségi kezelés részeként azoospermias betegekből származó heréből történő spermium nyeréssel (TESE) nyertük. Összesen 12 mintát vizsgáltunk: 3 normális/gyengén károsodott spermatogenezissel vagy érési leállással (Johnsen 6-10) és 9 SCOS-val (Johnsen 2) a hagyományos szövettani vizsgálat eredményei szerint. A rutin szövettani vizsgálatokhoz 4 µm vastag FFPE metszeteket (n=5) készítettünk Leica CM1860 UV kriosztáttal (Biomarker Kft., Budapest, Magyarország), a preparátumokat standard hematoxin-eozinnal festettük, és Panoramic Desk digitális diaszkennelrel (3D Hitech, Budapest, Magyarország) dokumentáltuk, az adatok kiértékelésére a Panoramic Viewer 1.15 szoftvert használtuk. A friss hereszövetmintákat a feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A beágyazáshoz frissen készített 2%-os karboximetil-cellulózt használtunk, a szövetek metszéséhez pedig egy Leica CM1860 kriosztátot (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) alkalmaztunk -23°C-on. A 15 µm vastag metszeteket indium-ón-oxiddal (ITO) bevont üveglemezekre (n=5) (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) helyeztük (76. ábra).

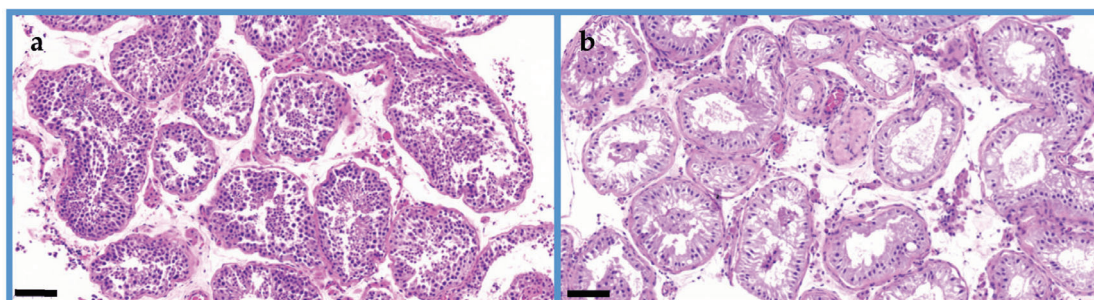


76. ábra: A hereszövet kriometszetek makroszkópikus képe az ITO és normál tárgylemezeken.

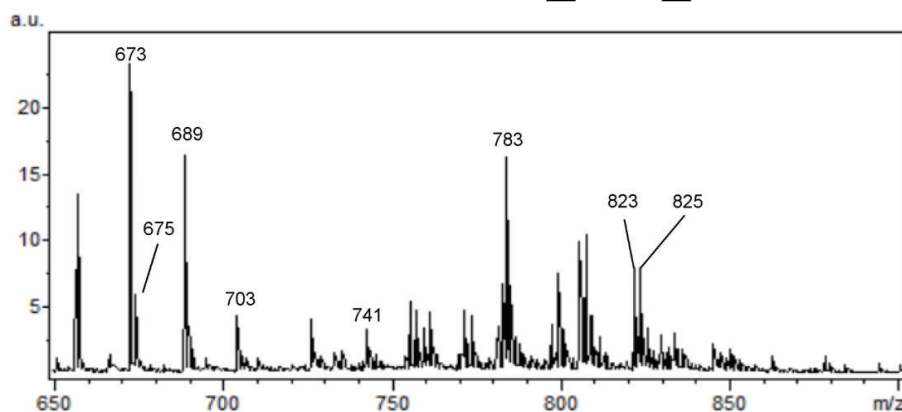
A CHCA mátrixot 50 ciklusban vittük fel az általunk kifejlesztett automatizált piezoelektromos porlasztó segítségével. A 7 mg/ml mátrixoldatot minden nap frissen készítettük a CHCA 6:4 acetonitril-0,2%-os (V/V) vizes triluoroecetsavban (TFA, Spectranal minőség, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) történő feloldásával. A tömegspektrumokat Autoflex Speed MALDI TOF/TOF tömegspektrométeren vettük fel. A MALDI-méréseket pozitív reflektoron üzemmódban végeztük az m/z 400 és 3000 közötti detektálási tartományban. A MALDI képalkotás laterális felbontását 50 μm -re állítottuk be. Összesen 300 lézerlövést gyűjtöttünk minden egyes pixel pozícióból. Az adatgyűjtést és a kiértékelést a FlexImaging 3.0 és FlexControl 3.4 szoftverrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük. A lipidek azonosítását MALDI TOF/TOF tömegspektrometriával végeztük LIFT üzemmódban PSD (post-source decay) és CID (collision-induced decay) fragmentációval.

Az 77. ábra a H&E festett, felnőtt emberi hereszövet morfológiáját mutatja normál és SCOS körülmények között.

A vizsgált lipidek térbeli expressziós szintjei szignifikánsan megváltoztak a normál (Johnsen pontszám 8-10) és a SCOS egyénekben (Johnsen pontszám 2). A foszfatidilkolin (PC), szfingomielin (SM) és foszfatidil-etanolamin (PE) csúcsokat detektáltunk az m/z 650 és m/z 900 közötti tömegtartományban (78. ábra).

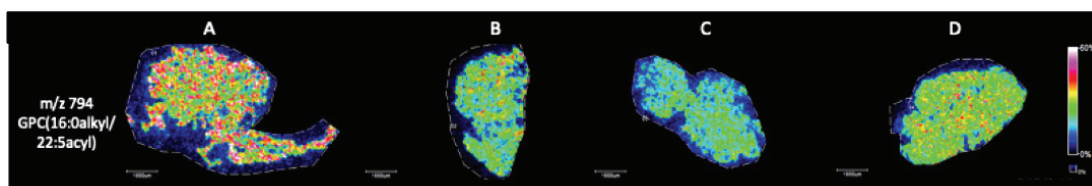


77. ábra: Hematoxin-eozin festett humán hereminták szövettana **(a)** Teljes spermatogenezis, sok A és B típusú spermatogónia, Johnsen pontszám: 8-10. **(b)** Sertoli cell only szindróma (SCOS), Johnsen pontszám: 2. Méretskála: 100 μm .



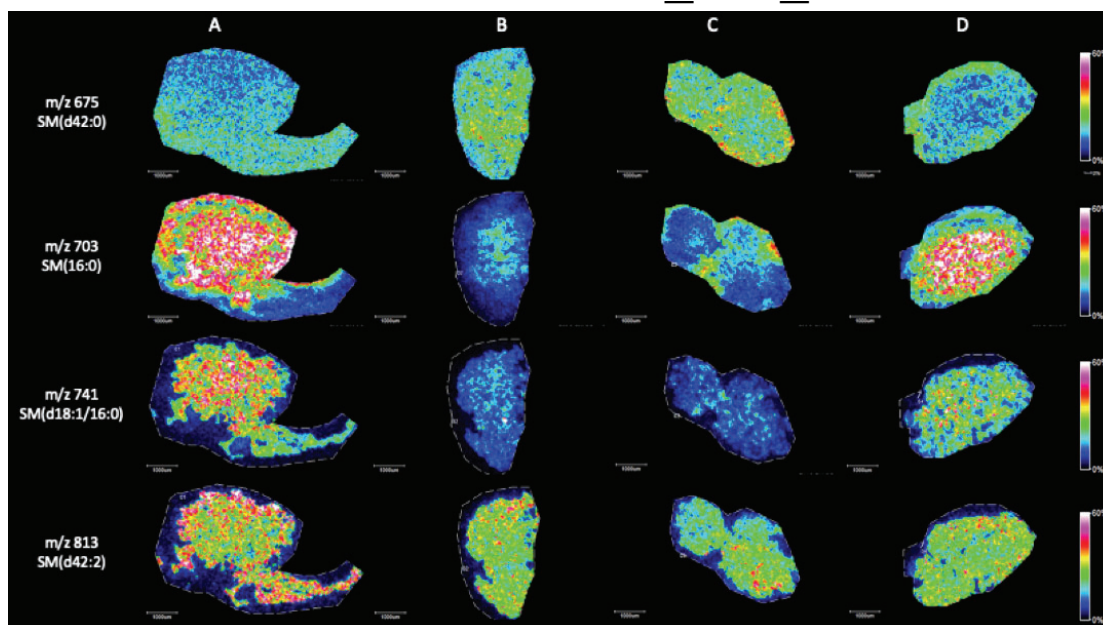
78. ábra: Reprezentatív, 300 egyedi lézerimpulzus összesítéséből származó MALDI TOF tömegspektrum az m/z 650 és 900 közötti tartományban. A spektrumot közvetlenül a hereszövet kriometszetének felületéről vettük fel, CHCA-mátrix jelenlétében pozitív ionizációs módban, reflektoron detektor alkalmazásával.

A 79-84. ábrák a szfingomielinek, foszfatidil-kolinok, glicerofoszfatidil-kolin, plazmalogén és foszfatidil-etanolaminok specifikus lipidtérképeit mutatják be. A képkalkulációs tömegspektrometriai eredmények a lipidcsoportok protonált kvázimolekuláris ionjait ($M+H^+$) szemléltetik, ezen kívül az azonosított lipidek nátrium- és kálium-adduktjait ($M+Na^+$, $M+K^+$) a legtöbb esetben sikeresen detektáltuk.

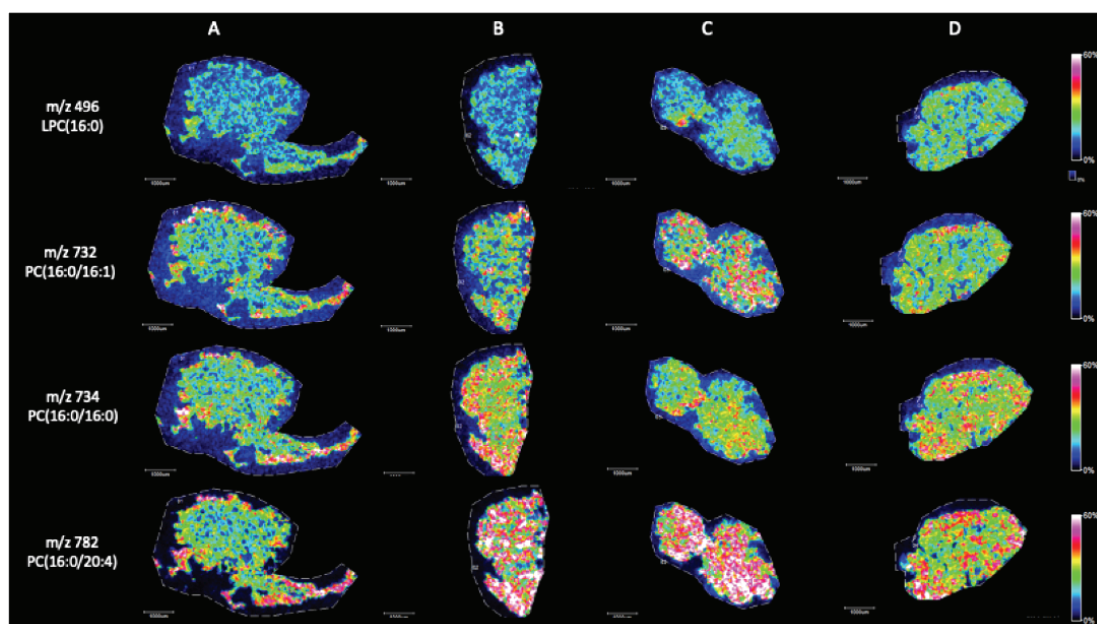


79. ábra: A hereszövet minták reprezentatív MALDI IMS képei a detektált glicerofoszfatidil-kolin (GPC16:0alkyl/22:5acyl) $[M+H]^+$ tekintetében. **(A)** Johnsen score 8-10, **(B)** Johnsen score 2, **(C)** Johnsen score 2, **(D)** Johnsen score 6-8.

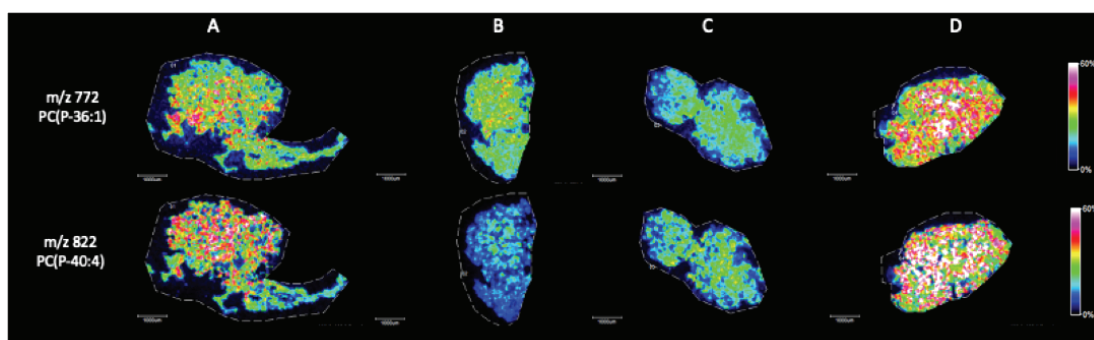
Méretskála: 1000 μm .



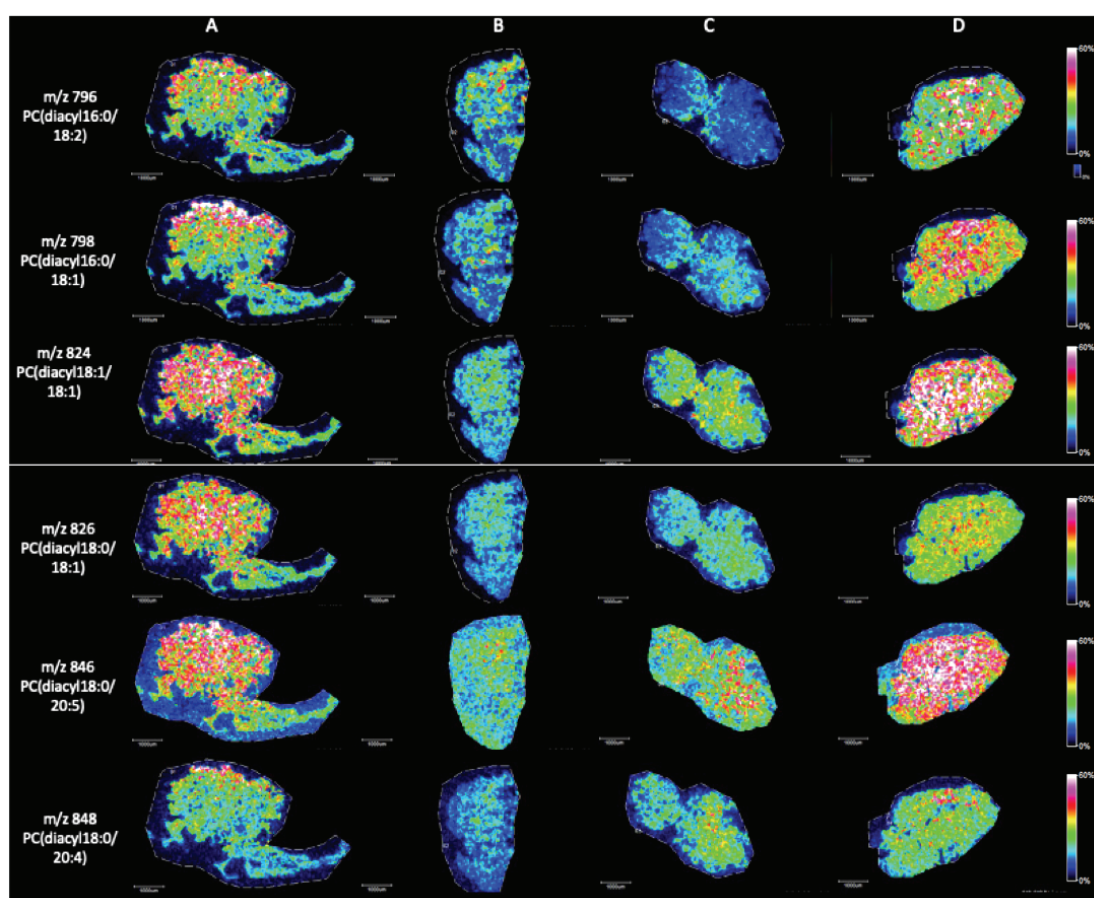
80. ábra: A hereszövet minták reprezentatív MALDI IMS képei a szfingomielinek $[M+H]^+$ tekintetében. (A) Johnsen score 8-10, (B) Johnsen score 2, (C) Johnsen score 2, (D) Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μm .



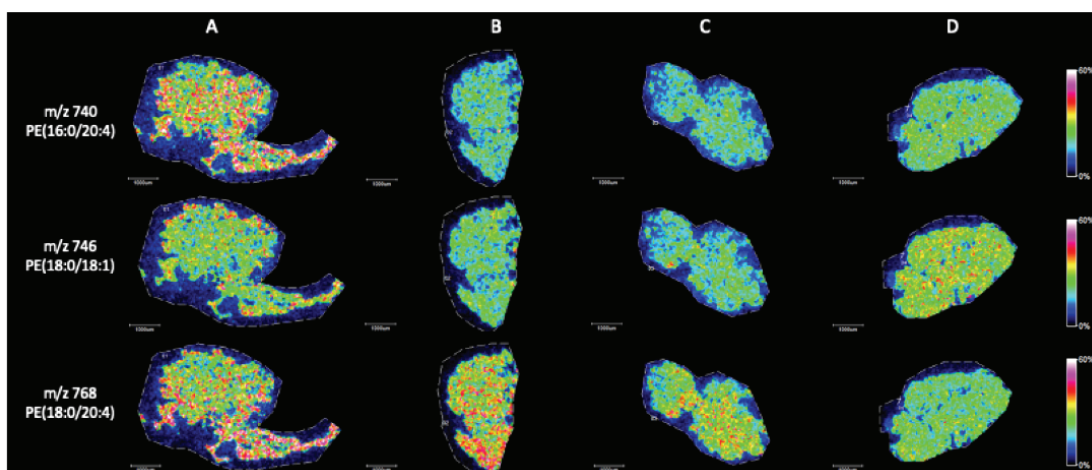
81. ábra: A hereszövet minták reprezentatív MALDI IMS képei a lizofoszfátidil-kolin és foszfátidil-kolinok $[M+H]^+$ tekintetében. (A) Johnsen score 8-10, (B) Johnsen score 2, (C) Johnsen score 2, (D) Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μm .



82. ábra: A heresözet minták reprezentatív MALDI IMS képei a plazmalogének $[M+H]^+$ tekintetében. (A) Johnsen score 8-10, (B) Johnsen score 2, (C) Johnsen score 2, (D) Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μm .



83. ábra: A heresözet minták reprezentatív MALDI IMS képei a diacyl csoportot tartalmazó foszfatidil-kolinok $[M+H]^+$ tekintetében. (A) Johnsen score 8-10, (B) Johnsen score 2, (C) Johnsen score 2, (D) Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μm .



84. ábra: A hereszövet minták reprezentatív MALDI IMS képei a foszfatidil-etanolaminok $[M+H]^+$ tekintetében. **(A)** Johnsen score 8-10, **(B)** Johnsen score 2, **(C)** Johnsen score 2, **(D)** Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μm .

A glicerofoszfatidil-kolin (16:0-alkyl/22:5-acyl) térbeli eloszlása kimutatható különbségeket mutat a normál és a SCOS szöveti metszetek között. A legmagasabb szintje a 8-10-es Johnsen-pontszámú mintában volt, míg a többi szövetmetszetben csökkent a hisztológiai értékelés függvényében (79. ábra).

Az SM (d42:0) m/z 675, az SM (16:0) m/z 703, az SM (d18:1/16:0) m/z 741 és az SM (d42:2) m/z 813 protonált ionok eloszlása a 80. ábrán látható. A szfingomielinek (16:0) és (d18:1/16:0) helyi eloszlása szignifikánsan különbözik az egészséges (Johnsen 8-10) és a SCOS (Johnsen 2) heremintákban. Az SM (16:0) és (d18:1/16:0) koncentrációja magasabb a sikeres spermatogenezissel és éréssel rendelkező mintákban. A nagyon hosszú láncú, többszörösen telítetlen zsírsavat (VLCPUFA) tartalmazó SM, az SM (d42:2) szintje pozitív korrelációt mutatott a sikeres spermatogenezissel, míg az SM (d42:0) szintje kissé emelkedett a SCOS mintákban.

Az emlősök sejteiben jelen lévő fő foszfolipid a PC, amely kb. 50%-át teszi ki a teljes foszfolipid készletnek. A 81. ábra a palmitinsav-tartalmú foszfatidil-kolinok, mint például az LPC (16:0), PC (16:0/16:1), PC (16:0/16:0) és PC (16:0/20:4) kiválasztott $[M+H]^+$ ionképeit mutatja. Ezekben az esetekben a lipidek koncentrációja magasabb szintet mutatott a sikertelen spermatogenezissel rendelkező szövetmetszetekben (Johnsen 2). A legjelentősebb különbség az 1-palmitoil-2-arachidonoil-sn-glicero-3-foszfokolin PC (16:0/20:4) helyi eloszlásában mutatható ki, amelyet az m/z 782 ioncsúcs képvisel.

A plazmalogének a spermiumok membránjában található egyedi éterlipidek. Az éter-foszfolipidek a glicerín-foszfolipidek olyan típusa, amelynek glicerín gerincéhez alkil- vagy alkenil-láncok kapcsolódnak [357]. A plazmalogének döntő szerepet játszanak a fiziológiás spermatogenezisben, a spermiumok érésében, a motilitás, a membránfluiditás és a lipidperoxidáció fenntartásában. A plazmanil-PC 40:4 koncentrációja jelentősen csökkent SCOS körülmények között, míg a PC (P-36:1) koncentrációja enyhén változott (82. ábra).

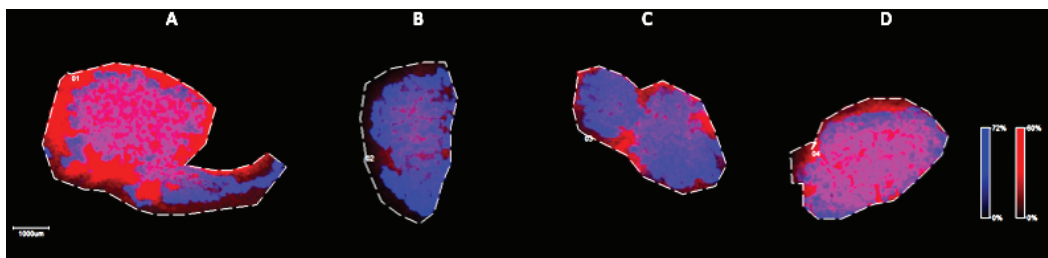
A diacil-PC-k helyi eloszlása magasabb szintet mutat az egészséges mintákban, míg a koncentráció jelentősen csökken az alacsonyabb Johnsen-pontszámú mintákban. A

leglátványosabb változások a PC (16:0/18:2), PC (16:0/18:1), PC (18:1/18:1) és PC (18:0/20:5) esetében figyelhetők meg (83. ábra).

A PE kimutatható volt, azonban pozitív ionizációban alacsonyabb érzékenységgel rendelkezik, mint a PC vagy az SM. Az arachidonsav tartalmú PE-k (16:0/20:4) és (18:0/20:4) kissé csökkentek a SCOS mintákban (84. ábra), homogén térbeli eloszlással. Ahogy korábban leírtuk, az SM (16:0) szintje lecsökkent míg a PC (16:0/20:4) koncentrációja megnövekedett az SCOS mintákban (85. ábra).

Eredményeink az egyszeresen és többszörösen telítetlen diacil-PC-k (16:0/18:2, 16:0/18:1, 18:1/18:1 és 18:0/20:5) csökkenését mutatták az összes SCOS hereszöveti mintában, míg a PC (16:0/20:4), PC (16:0/16:0) és PC (16:0/16:1) koncentrációja azozoospermias körülmények között felülreprezentált volt.

A szfingomielin a plazmamembránok szerkezeti összetevői, amelyek döntő jelentőséggel bírnak az apoptózisban, a sejtek öregedésében, a fejlődésben, a spermatogenezisben és a spermiumok működésében. A spermatogenezis fiziológias körülményei között az SM (16:0) koncentrációja jelentősen magasabb, mint SCOS körülmények között, ellentétben néhány PC expressziós szintjével. A PC-k potenciális kolin donorok az SM bioszintézisében, ennek megfelelően az eredmények az SM-szintetikus útvonalak szabálytalanságára utalhatnak SCOS körülmények között. Korábbi tanulmányok is kimutatták az SM/PC arány hasonló hatásait a spermiumok epididymális érése során (85. ábra) [358].



85. ábra: Az SM (16:0) (m/z 703, piros) és a PC (16:0/20:4) (m/z 782, kék) egyesített MALDI IMS ionképei hereszöveti mintákban. (A) Johnsen score 8-10, (B) Johnsen score 2, (C) Johnsen score 2, (D) Johnsen score 6-8. Méretskála: 1000 μ m.

A plazmalogének a herékben egyedülálló PC-k, amelyek erős antioxidatív jelleggel rendelkeznek, mivel az alkenil-éter kötés rendkívül érzékeny a reaktív oxigén gyökökre (ROS). Jelentős down-regulációjuk fokozott oxidatív jellegre és magasabb ROS-koncentrációra utal a SCOS heremintákban [357, 359].

Az emberi hereszövetek kriometszetekből gyűjtött MALDI IMS adataink összefüggést mutattak a Johnsen-féle pontozási rendszer és a foszfolipidek lokális eloszlása között.

5.3.3. Embrionális implantáció és embrió-endometrium kommunikáció molekuláris hálózatának vizsgálata [XXV, XXVII]

A WHO 2023-ban közzétett jelentése alapján a felnőtt lakosság körülbelül 17,5%-a meddőségben szenved [360]. Meddőségről akkor beszélünk, ha rendszeres, fogamzásgátlástól mentes, reprodukciós korban lévő, gyermekvállalás előtt álló, aktív nemi élet ellenére egy év alatt terhesség nem jön létre. A meddő párok körülbelül 85%-ánál azonosítható a meddőség oka. A meddőség leggyakoribb okai az ovulációs diszfunkció, a petevezeték és a méh betegségei, a női hormonok vagy hormonális rendszer elégtelenségei, illetve a férfi reprodukciós szervek vagy hormonok működésének zavarai. A meddő párok fennmaradó 15%-ának a meddőség oka nem meghatározható pontosan. Az életmód és a környezeti tényezők, mint például az alkohol fogyasztás és az elhízás, hátrányosan befolyásolhatják a termékenységet.

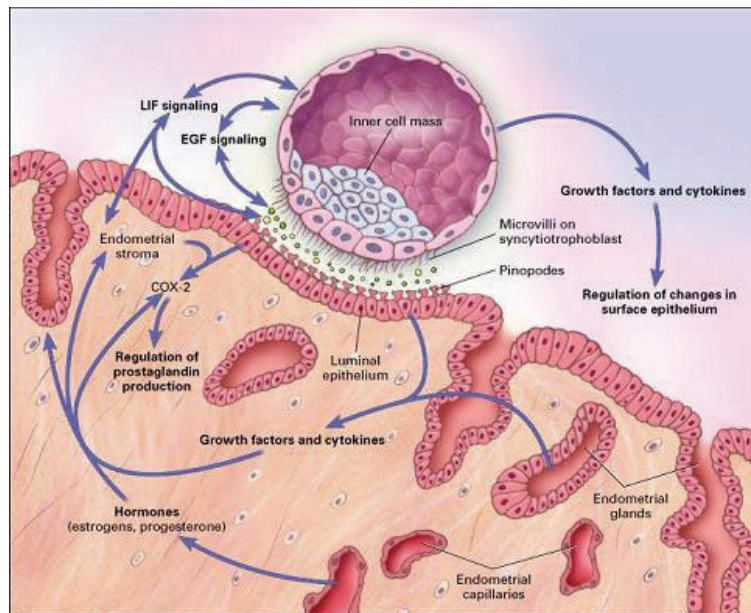
A meddőség kezelését szolgáló mesterséges reprodukciós eljárások összefoglaló elnevezése az asszisztált reprodukciós technikák (ART). Napjaink és az elmúlt évtizedek robbanásszerű orvostudományi fejlődése lehetővé tette olyan módszerek kimunkálását és finomítását, amelyek segítségével be lehet avatkozni az utódnemzés kezdeti szakaszába, az új élet keletkezésének folyamatába. A szervezeten kívüli megtermékenyítés (*in-vitro* fertilization, IVF) és embrió transzfer célja, hogy, valamilyen okból hiányzó kürtfunkciót áthidalva, a szervezeten kívüli megtermékenyítés után az osztódás állapotában lévő, általában 4-8 sejtes blasztocisztát bejuttassuk az uterus üregébe, ahol az várhatóan megtapad, és további embrionális fejlődésnek indul.

Az IVF beavatkozások sikeressége világszerte körülbelül 20-25%-os, és jelenleg világszerte a megszületett gyermekek 1-4%-a már asszisztált reprodukciós technológiával fogant [360]. Hazánkban is évről évre nő a mesterséges megtermékenyítések száma míg 2017-ben 7473 addig 2021-ben már 12237 embriótranszfer történt.

A megtermékenyítés és az azt követő korai embrionális fejlődés és endometrális beágyazódás egy rendkívül érzékeny, komplex élettani, biokémiai folyamat (86. ábra). A korai embrionális történéseket bizonyítottan befolyásolja a foszfolipid metabolizmus és a hozzá kapcsolódó jelátvitel [361]. A foszfolipidek a biológiai membránok lényeges felépítő és szabályozó komponensei, továbbá számos bioaktív molekula prekursoraként is szolgálnak, mint például: eikozanoidok, lizofoszfolipidek.

A méhben található teljes arachidonsavmennyiség mintegy 93%-a tárolódik a foszfolipidekben, ezek közül is 80% raktározódik foszfatidil-kolinban (PC), foszfatidil-etanolaminban (PE) és trigliceridek (TAG) formájában [362]. A membrán foszfolipidjeiből az arachidonsav a foszfolipáz A2 enzim által szabadul fel. Arachidonsavból keletkeznek a ciklooxygenáz enzimek által a prosztaglandinok, melyek az eikozanoidok közé tartozó molekulák. Az e módon előállított prosztaglandinok több típusának (PGI₂, PGE₂, PGF₂α) jelentős szerepe van az ovulációban, fertilizációban, implantációban, továbbá a decidualizációban, mely az endometrium sejtjeinek morfológiai és funkcionális változásait jelenti, kiegészülve az anyai artériák átalakulásával. Elsődlegesen a prosztaciklin (PGI₂) nélkülözhetetlen az implantációhoz és decidualizációhoz, mely hatását a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor egyik típusának (PPARβ/δ) aktiválásával fejt ki. A receptor aktiválásával sejtproliferáció és

angiogenezis indul, melyek a korai embriogenezis fázisában elengedhetetlen folyamatok [363].

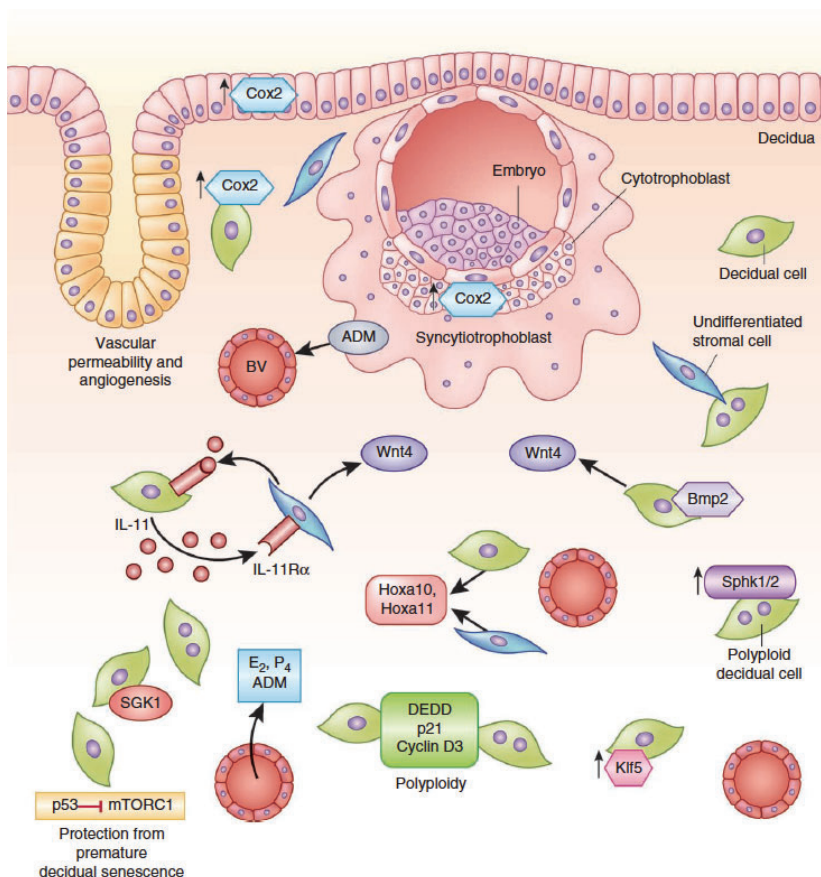


86. ábra: A blasztociszta endometriális beágyazódásának molekuláris folyamatai [364].

Egy másik jelentős molekula a lizofoszfatidsav (LPA), mely jelátviteli molekulaként az implantáción túl abban játszik fontos szerepet, hogy többes terhesség esetén (pl. egér) a blastociszták egyenlő távolságban ágyazódjanak be az uterusba. Ezt a folyamatot nevezzük spacing-nek. Hogy pontosan hogyan valósul meg ez a folyamat, arról egyelőre csak feltételezések állnak rendelkezésre. Eszerint a LPA a méh myometrium rétegének kontrakcióját váltja ki [364]. Az ösztrogén és progeszteron által szabályozott G-protein-kapcsolt egyik receptorának ($LPAR_3$) expressziója különösen a periimplantációs időszakban emelkedik meg, mely egybe esik a megnövekedett proszttaglandin szintézissel. Ehhez hozzájárulhat, hogy a $LPAR_3$ közvetetten fokozza a COX-2 enzim működését. Ez egy igen szoros interakciót feltételez a két említett jelátviteli útvonal között (87. ábra) [365, 366].

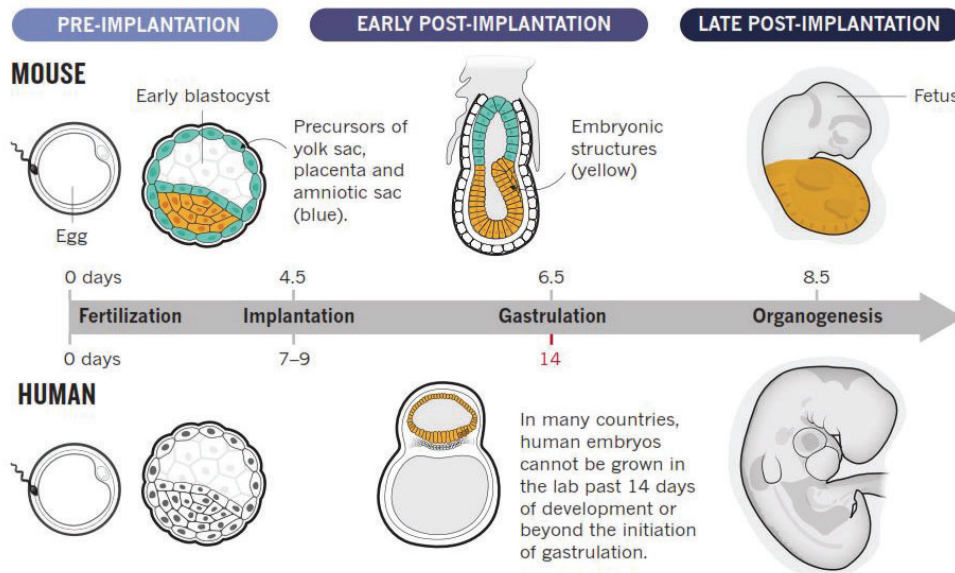
Számos korábbi tanulmány vizsgálta a lipidek szerepét az *in-vitro* megtermékenyítésben (IVF) a periimplantációs időszakban. Egy IVF-en átesett nőknél végzett vizsgálat összefüggést talált a periimplantációs endometriális lipidek és a progeszteron korai emelkedése között, ami az endometrium receptivitása és az endometrium lipidkoncentrációja közötti lehetséges kapcsolatra utal [367]. Emellett a follikuláris folyadék fokozott glicerofosfolipid metabolizmust is mutatott, ami a nem teljes oxidáció és a lipotoxicitás révén alacsonyabb minőségű petesejteket eredményezhet az IVF során [368]. A follikuláris folyadékban található lipidek közül számos potenciális biomarkerként is felmerült a nőikkel kapcsolatos meddőség [369], és a follikuláris folyadék lipidomja [370] vagy akár a szérumlipidom [371] segíthet előre jelezni a későbbi terhesség kimenetelét IVF-ben. Az endometriális folyadékban közvetlenül az embriótranszfer előtt néhány PC és PE lipid szignifikánsan csökkent a nem beültetési ciklusokban, ami a lipidek másik fontos szerepére utal a sikeres beültetésben [372]. Nemcsak úgy tűnik, hogy a lipidek részt vesznek a megfelelő beültetésben és az IVF

sikerének előrejelzésében, de ez a kapcsolat kétirányúnak tűnik: az IVF eltérő lipidprofil okozhat a méhlepényben, mint normál terhesség esetén [373], sőt a magzatban is lipidomikai változásokat indukálhat [374].



87. ábra: A korai embrionális fejlődés biokémiája [364].

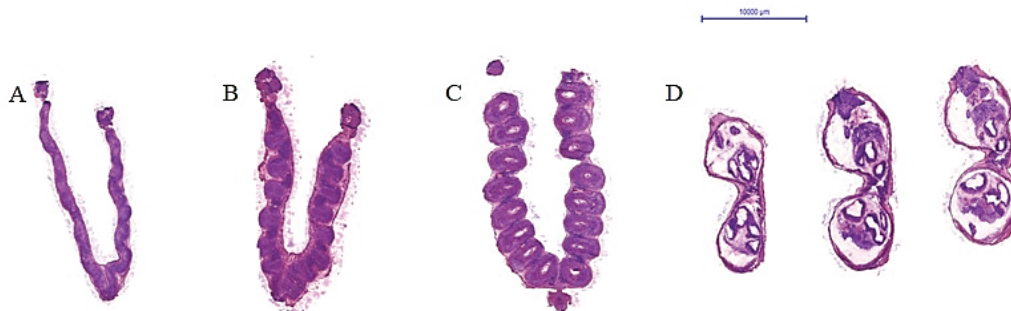
Vizsgálataink során egérmodellből származó szövetmetszeteken tanulmányoztuk a normál terhesség és a mesterséges megtermékenyítés lipidomikai hatásait. Korábbi szisztematikus összefoglaló cikkünkben kimutattuk, hogy a periimplantációs időszakban több PL, elsősorban PC-k, térbeli és időbeli változásokat mutatnak, mind az anyai, mind az embrionális szövetekben [XXVII]. Korábbi kutatások azt mutatták, hogy eltérések lehetnek az IVF és a normál terhesség lipidomikája között, de tudomásunk szerint egyetlen tanulmány sem vizsgálta a lipidek térbeli és időbeni változását a periimplantációs periódusban, mind a méhben, mind a beágyazódó embrióban. Ezért célunk az volt, hogy tömegspektrometriás képalkotással megvizsgáljuk az IVF hatását mind az anyai, mind az embrionális szövetek PC lipidjeire a terhesség korai szakaszában, és összehasonlítsuk a normál terhességgel egérmodellben. Az állatmodellként használt CD-1 egér és az ember korai fázisú embrionális fejlődésének időbeni lefolyását és fázisait a 88. ábra mutatja be.



88. ábra: A humán és az egér korai embrionális fejlődésének párhuzama [375]

Mintáinkat CD-1 egerekből nyert különböző fázisú terhességet mutató uterusok alkották. Néhány jellemző hisztológiai példát a 89. ábrán mutatok be.

A vizsgálatban 54 azonos életkorú nőstény CD-1 egeret véletlenszerűen két kísérleti csoportba osztottunk ($n=27$ mindegyikben). A nőstény egerek első csoportját (IVF-csoport) meddő (vazektómiás) és a második csoportot (normál) CD-1 termékeny hímekkel párosítottuk, hogy álderhességet, illetve terhességet idézzünk elő. Az egereket a vemhesség meghatározott napján 09:00 és 10:00 óra között elaltattuk (0. óra az 1. napon = hüvelydugó). Az 54 méhmintát (minden csoportból technikai triplikátumok) ivarzási ciklusban részt vevő állatokból, álderhes és vemhes állatokból (természetes és IVF embriók) gyűjtöttük a 4,5., 6,5., 8,5., 10,5., 12,5. és 16,5. embrionális napokon.



89. ábra: H&E festett kriometszetek a természetes fogantatású terhes egér uterus különböző fázisaiban. (A) 4,5 napos terhes. (B) 6,5 napos terhes. (C) 8,5 napos terhes. (D) 12,5 napos terhes. Méretskála: 1000 µm.

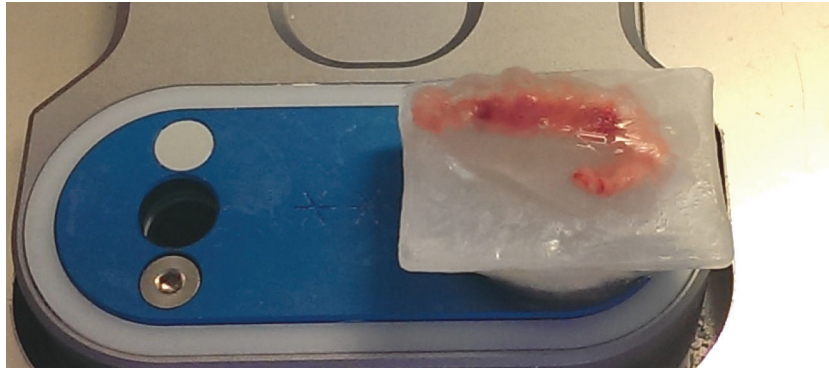
Egereinket 12 órás világos/sötét ciklusban tartottuk, normál rágesáló étrenden, és szükség szerint víz állt rendelkezésre. A petesejtek fokozott érését indukáltuk 6-12 hetes CD-1 nőstény egerekben 5 NE intraperitoneálisan injektált tüszőstimuláló hormon (Meriofert, IBSA Pharma, Castagnola-Lugano, Svájc) alkalmazásával. 48 óra elteltével ezeket az egereket 5 NE luteinizáló hormonnal kezeltük (Chloragon, Ferring, Budapest, Magyarország). Másnap a nőstényeket nyaki diszlokációval történő humánus eutanáziát

követően, a petevezetékét kimetszettük, és összegyűjtöttük a kumulus-petesejt komplexet (COC). Ezzel egyidejűleg spermiumokat gyűjtöttünk a cauda epididymisből egy 8-12 hetes hím CD-1 egér humánus nyaki diszlokációja után. A spermiumokat 1 órán át inkubáltuk 200 µl humán tubális folyadék (HTF) tápközegben (Cosmo Bio, Tokió, Japán) ásványolaj alatt 37°C-on 5% CO₂ atmoszférában, amíg a kapacitáció be nem fejeződött. A nőstény és a hím ivarsejteket ezután 300 µl HTF tápközegben ásványolaj alatt 4 órán át 37°C-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk. A feltételezett zigótákat 50 µl embrionális tenyésztő médiumba (Millipore, Watford, UK) helyeztük ásványolaj alatt, majd további 3 napig inkubáltuk, amíg el nem érték a blasztociszta állapotot. A tápközeget 24 óránként cseréltük. 3,5 napon belül az embriókat átlátszó BL6/CBA F1 nőstényekbe ültettük be, 6-9 embriókat injektáltunk be műtéti úton a méh mindkét szarvába (90. ábra).



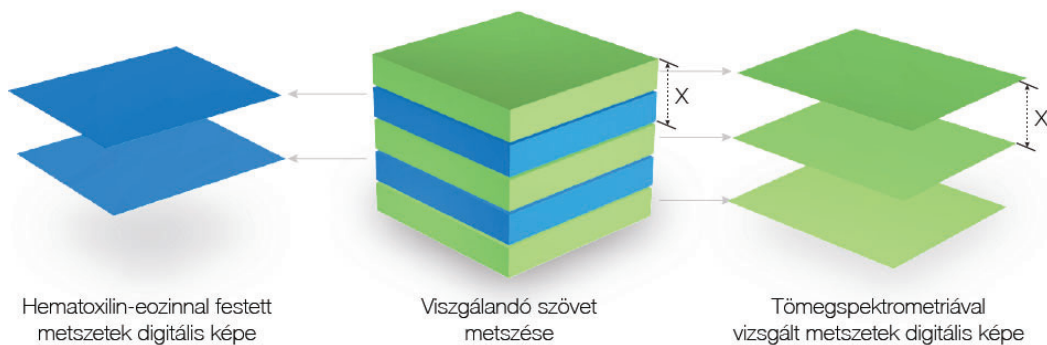
90. ábra: Reprezentatív H&E festett egér uterus kriometszetek. **(A)** 8,5 napos embrionális életkorú normál terhesség, **(B)** 8,5 napos embrionális életkorú IVF terhesség, **(C)** 10,5 napos embrionális életkorú normál terhesség, **(D)** 10,5 napos embrionális életkorú IVF terhesség. Méretskála: 5000 µm.

A kipreparált szövetet -80°C-on tároltuk a feldolgozásig. A szövet beágyazásához frissen készített 2%-os (m/V) karboximetil-cellulóz (CMC) vizes oldatát használtuk, a szövetmetszéshez pedig Leica CM1860 kriosztátot (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) alkalmaztunk -19°C-on (91. ábra).



91. ábra: A -19°C -ra fagyasztott, karboximetil-cellulózba ágyazott uterus minta kriometszés előtt.

A szövettani elemzéshez $5\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú kriometszeteket készítettünk, majd a lemezeket hematoxilin-eozin festékekkel festettük, a dokumentálásra az előző fejezetben leírt digitális tárgylemez szkennert alkalmaztuk. Ugyanekkor $15\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú metszeteket vettünk fel ITO lemezekre, melyeket IMS-re szántunk. A hisztológiára és MALDI IMS-re készített parallel kriometszetek készítésének szisztémáját a 92. ábra szemlélteti.



92. ábra: A H&E festett szövettani ($5\text{ }\mu\text{m}$) és a képalkotási tömegspektrometriás ($15\text{ }\mu\text{m}$) vizsgálatokra készített parallel kriometszetek készítési stratégiája.

A MALDI TOF IMS vizsgálatokhoz CHCA mátrixot alkalmaztunk 70 porlasztási-szárítási ciklusban a korábbiakban bemutatott automatizált piezoelektromos porlasztó berendezéssel. A 7 mg/ml -es mátrixoldatot naponta frissen készítettük CHCA-nak 6:4 arányú acetonitril-0,2%-os (V/V) vizes trifluor-ecetsavban való feloldásával (TFA, Spectranal minőség, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A tömegspektromokot 1 kHz -es Smartbeam-II szilárdtestlézerrel felszerelt Autoflex Speed MALDI TOF/TOF tömegspektrométeren vettük fel (Bruker Daltonics, Bremen, Németország). A MALDI méréseket pozitív reflektoron módban, m/z 400 és 3000 közötti detektálási tartományban végeztük. A MALDI képalkotás oldalirányú felbontását $50\text{ }\mu\text{m}$ -re állítottuk.

A lipidek azonosítására nem vemhes és vemhes (normál, IVF) egerek uterusából mikrodisszekciót használtunk. Az egerek uterusából és embrióiból származó lipideket módosított Bligh és Dyer extrakciós módszerrel vontuk ki [376]. Két $100\text{ }\mu\text{m}$ -es szövetmetszetet egy üvegfíolába helyeztünk, és a lipideket 1 ml butilezett hidroxitoluolt (10 ng/ml) tartalmazó extrakciós oldat (kloroform/metanol/víz $60/30/10$, V/V/V%) hozzáadásával extraháltuk. Először a mintákat homogenizáltuk és 2 perc ig vortexeltük,

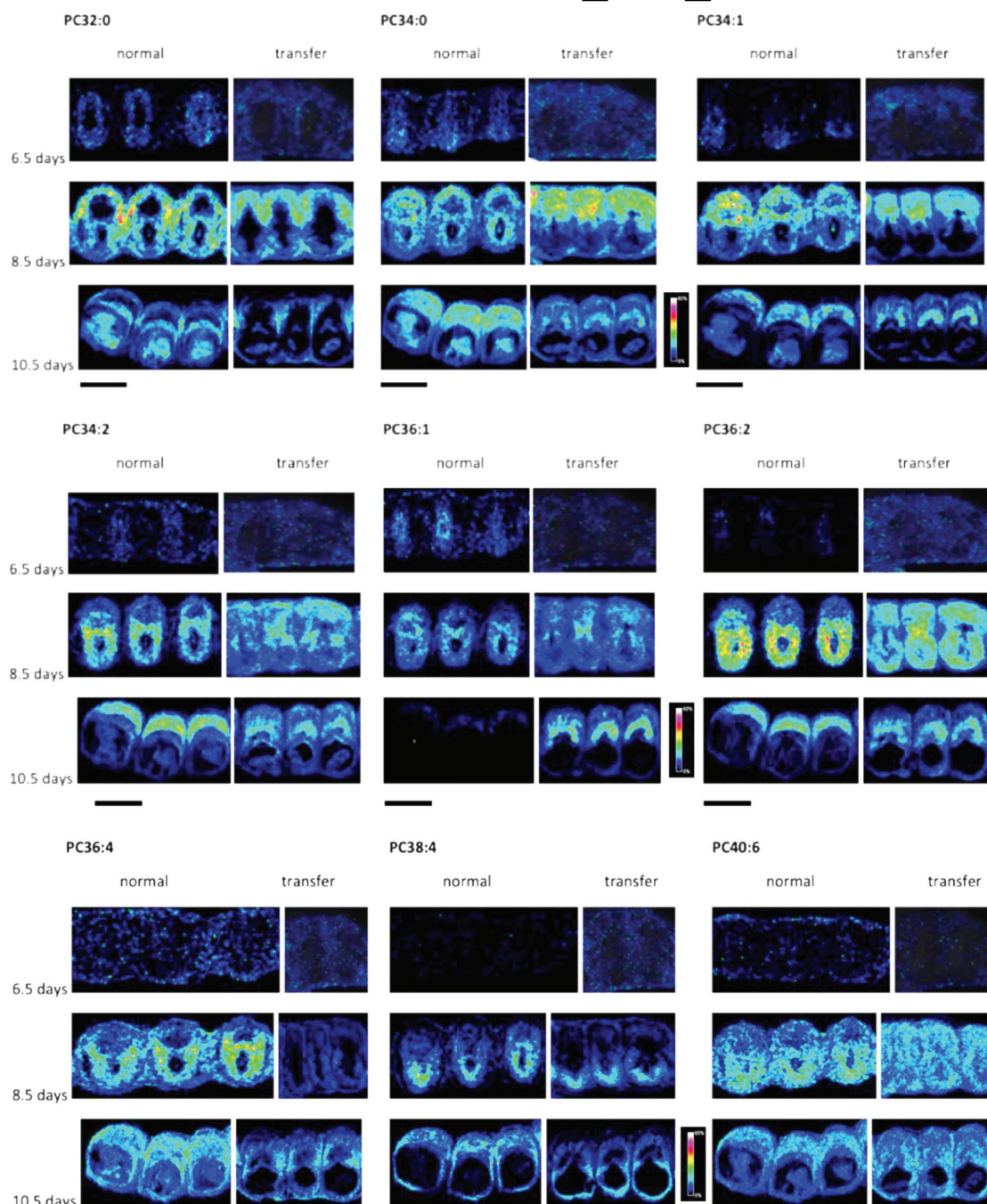
mark.laszlo_314_25

majd 10 percig ultrahanggal segítettük az extrakciót. A mintákat 30 percig állni hagytuk, de 5 percenként 30 másodpercig vortexeltük őket. Az első extrakciós fázis után a szerves fázist eltávolítottuk, és új üvegfiolába helyeztük. A második extrakciós fázisban 500 µl extrakciós oldatot adtunk a szervetlen fázis maradékához. Az extrakciót ismét elvégeztük, és az első extrakcióhoz hozzáadtuk az új szerves fázist. Ezután az extrahált lipideket nitrogéngáz alatt szárítottuk, majd 50 µL acetonitril/izopropanol/víz eleggyel (65/30/5, V/V/V% 0,1%-os hangyasavban) visszaoldtuk.

A lipidprofilok azonosítását folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometriával végeztük. Az elemzéseket komplex Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) HPLC rendszerrel végeztük, amely Q-Exactive tömegspektrométerrel volt felszerelve HESI forrással (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). Az elválasztást Kinetex C-18 (150 mm, belső átmérő 2,1 mm, részecskeméret 2,6 µm) oszlopon (Phenomenex, Torrance, CA, USA) végeztük. Az áramlási sebesség 150 µl/perc volt 5 µl minta-injektálási térfogat mellett. Az adatgyűjtést és elemzést Xcalibur 1.4 (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük. A kromatográfiás elválasztáshoz az A és B mozgófázisból álló bináris gradienst (A: metanol, 0,1% (V/V) hangyasav; B: víz, 0,1% (V/V) hangyasav) alkalmaztuk. A vegyületeket a következő gradiensprofillal választottuk el: 40% A 5 percig, majd 10 perces lineáris gradiens 90%-ig és 5 perces izokratikus periódus. Az oszlopot 1 perces lineáris gradienssel 40% A-ig és 5 perces izokratikus periódussal egyensúlyba hoztuk a kezdeti feltételekkel. Mind az MS, mind az MS/MS méréseket pozitív ion módban végeztük. A HESI forrás 3500 V feszültséggel működött. Mind a köpeny, mind a segédgáz nitrogén volt, 10, illetve 2 l/perc áramlási sebességgel. A kapilláris hőmérsékletet 200°C-ra, míg a HESI forrást 40°C-ra állítottuk be. Az S-lencsék RF-szintjét 70-re állítottuk. Az MS/MS kísérleteket m/z 2,0 izolációs ablakkal végeztük, ahol a kiindulási ionok m/z 306, 308, 482 és 484; a normalizált ütközési energiát 35 eV-ra állítottuk be.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az IVF embriók esetében az uterusban a beültetési helyek nem szimmetrikusan fejlődnek, valamint a spontán vetélések aránya szignifikánsan magasabb, mint normál terhesség esetén (90. ábra).

Tanulmányunkban a sejtmembránokban található fő foszfolipidekre, a PC-kre összpontosítottunk. A lokális és időbeni változások a PC-k eloszlásában minden vizsgált időpontban szignifikáns eltéréseket mutattak a normál és az IVF terhességek között. Az összesített eredményeket a 93. ábra mutatja. A kapott PC-fajták azonosításához LC MS/MS-sel minden esetben protonált, nátrium- és káliumaddukt ionokat, mint prekursorokat, valamint foszfokolin ion specifikus fragmensét (m/z 184) detektáltuk.



93. ábra: Egyes PC-k térbeli és időbeni változása MALDI képalkotó tömegspektrometriával normál terhességben és embriótranszfert követően a 6,5; 8,5 és 10,5 embrionális napon. Méretskála: 2000 μm (színekód: sötétkék - alacsony koncentráció; fehér - magas koncentráció).

A normál terhesség 6,5. embrionális napján a PC (32:0) növekedését találtuk az uterus stromasejtekben az implantációs helyeken, kivéve az elsődleges decíduális zónát (PDZ). A PC (34:0), PC (34:1) és PC (34:2) magasabb expressziót mutatott az uterus stromasejtekben az implantációs helyeken, míg a PC (36:1) és PC (36:2) magasabb volt a PDZ-ben. Ezzel szemben az embriótranszferált állatokban a PC-k a mirigyhám növekedését mutatták az interimplantációs helyeken.

A normál terhesség 8,5. napján a PC (32:0), PC (34:0) és PC (34:1) magasabb szintet mutatott a mezometriális pólusban (M-pólus), míg a PC (34:2), PC (36:2), PC (36:4), PC

(38:4) és PC (40:6) magasabb szintet mutatott az antimezometriális pólusban (AM-pólus). Ezzel szemben az IVF uterusmintákban a PC (32:0), PC (34:0), PC (34:1) és PC (34:2) értékek megnövekedtek az M-pólusban; PC (36:4) és PC (38:4) az AM-pólusban; míg a PC (36:2) és PC (40:6) magasabb expressziót mutatott mind az M-pólusban, mind az AM-pólusban.

A normál terhesség 10,5. napján a PC (32:0) nagyobb intenzitást mutatott a placentában; PC (34:1), PC (34:2), PC (36:2) és PC (40:6) a mezometriális deciduában; míg a PC (34:0) és a PC (36:4) magasabb volt mind a placentában, mind a mezometriális deciduában. Az embrionális szövetekben a PC (32:0) és a PC (34:0), míg az AM deciduában a két arachidonsavat tartalmazó PC, a PC (36:4) és a PC (38:4) szintje emelkedett meg. Az IVF mintákban a PC (34:0), PC (34:1), PC (34:2), PC (36:1) és PC (36:2) magasabb expressziója volt megfigyelhető a mezometriális deciduában, míg a PC (36:4) és PC (38:4) fokozott expressziót mutatott az AM-ben és a laterális deciduában. Az embrió abszorpció helyein jelentős növekedést tapasztaltunk a PC (36:2) arányban az M-pólusban és a PC (38:4) arányban az AM-pólusban.

Mind a normál, mind az IVF terhességben megfigyeltünk változásokat az egyes anatómiai struktúrák lipidösszetételében, valamint nyomon követtük a vizsgált PC-k időbeni változását. Normál terhességben a PC (34:2), PC (36:2) és PC (36:4) nagyobb intenzitást mutatott, elsősorban az AM pólusnál, az embrionális 8,5. napon. Azonban két nappal később, az embrionális 10,5. napon ezeknek a lipideknek az intenzitása a mezometriális deciduában volt a legmagasabb. Az embrionális 6,5. napon a PC (36:4), PC (38:4) és PC (40:6) intenzitása alacsony volt. Az embrionális 8,5. napon azonban nagyobb intenzitást mutattak az AM póluson, elsősorban a másodlagos deciduális zónában. Ezzel szemben két nappal később (10,5 nap) ezeknek a vegyületeknek az intenzitása csökkent, a maximális intenzitást a mezometriális deciduanál figyeltük meg. Hasonló időbeni változást figyeltünk meg a vizsgált PC-kben IVF-terhességekben. A PC (36:1) alacsony intenzitást mutatott az embrionális 6,5. és 8,5. napon, míg a legmagasabb expressziót a mezometriális deciduában az embrionális 10,5. napon detektáltuk. A PC (34:0) és PC (34:1) intenzitása a 6,5. napon alacsony volt, az M-pólus az embrionális 8,5. napon növekedett, két nappal később pedig a mezometriális decidua esetében volt a legnagyobb az intenzitás.

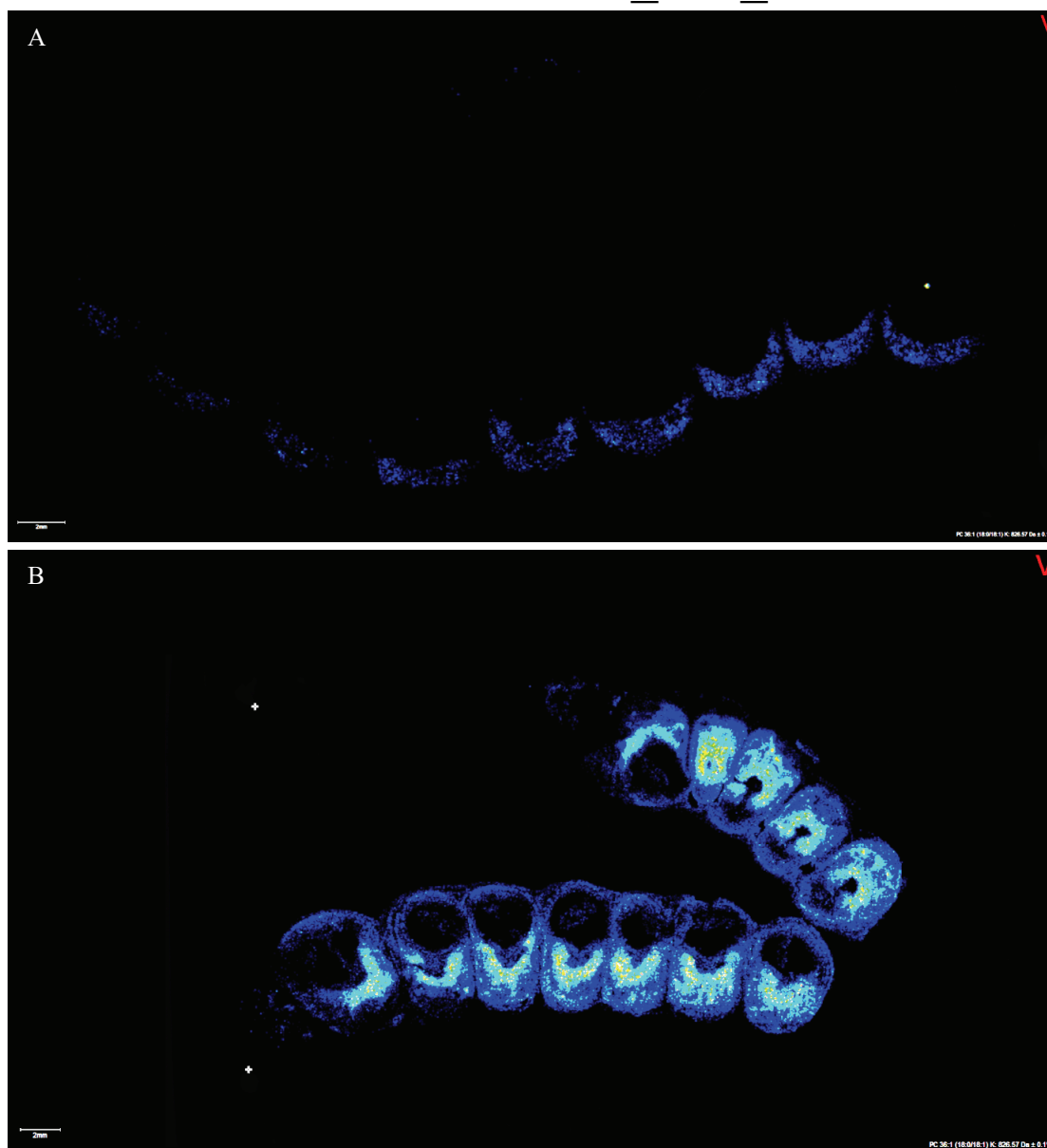
Vizsgálataink megerősítették, hogy a normál vemhes egerek méhében lévő PC-k mind időbeni, mind térbeli változásokon mennek keresztül a terhesség korai szakaszában az implantáció körüli időszakban [361]. Elsőként sikerült szövetminták MALDI TOF IMS vizsgálatainak segítségével kimutatnunk szignifikáns változásokat a normál és IVF terhesség lipidomikai profiljában. Tekintettel arra, hogy a foszfolipidek – elsősorban a bennük lévő zsírsavak révén – kulcsfontosságú szerepet játszanak számos jelátviteli folyamatban, ideértve az uterus receptivitását, az optimális uterus-embrionális kommunikációt, a beágyazódást és a későbbi méhlepény fejlődését, a mesterséges megtermékenyítés során érintett specifikus lipidosztályok és zsírsavak azonosítása elősegítheti az implantáció alapjául szolgáló biokémiai mechanizmusok mélyebb megértését, ezáltal potenciálisan javítva az IVF technikák eredményeit.

Hamori és munkatársai már az 1980-as évek végén leírták, hogy az IVF késleltetett implantációt okozhat [377]. Az embrionális fejlődés során a foszfolipidek nem csupán

arachidonsavraktárként szolgálnak, de a lebontás során sok más szabad zsírsav is felszabadul, amelyekről köztudott, hogy a terhesség előtt és alatt is változatos hatást fejtenek ki. Shibahara és munkatársai egyik tanulmányában a palmitinsav (PA, C16:0) a petesejt érésére gyakorolt hatását vizsgálták. Beszámoltak arról, hogy a magas PA koncentráció veszélyezteti a korai embrió minőségét és fejlődési képességét, és hiszton módosulásához is vezethet [378]. Aardema és munkatársai a megtermékenyítést követően csökkent fejlődési képességről, valamint a PA és a sztearinsav (SA, C18:0) dózisfüggő negatív hatásáról számoltak be a petesejt lipidcseppjeiben tárolt lipidek mennyiségére. Ezenkívül az egyszerűen telítetlen olajsav (OA, C18:1n-9) ellentétes hatásáról írtak, amely szerint az OA enyhén növeli a lipidcseppekben tárolt lipid mennyiségét, és javítja a megtermékenyítés utáni fejlődést. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a telített és telítetlen zsírsavak aránya jelentős hatással van a petesejtek fejlődési képességére [379]. Oseikria csoportja egy hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsav (LCPUFA), a dokozahexaénsav (DHA, C22:6n-3) hatását vizsgálta a szarvasmarha petesejtekre IVF során. Alacsony fiziológiás koncentrációban adva a DHA javította a petesejtek osztódási sebességét, és az embriók nagyobb mértékben jutottak el a blasztociszta stádiumba. A nagy koncentrációjú DHA beadása éppen ellenkező hatást váltott ki, mivel megzavarta a környező kumulussejtek lipidanyagcseréjét [380]. Abolghasemi egyik publikációjukban a linolsav (LA, C18:2n-6) génexpresszióra gyakorolt hatásáról írt. Szarvasmarhák plazma progeszteronszintjének emelkedését találták, melynek hátterében a csökkent CB2 receptor termelés és az N-acil-foszfatidil-etanolamin-foszfolipáz D (NAPE-PLD) enzimszintézis állt az endometriumban [381].

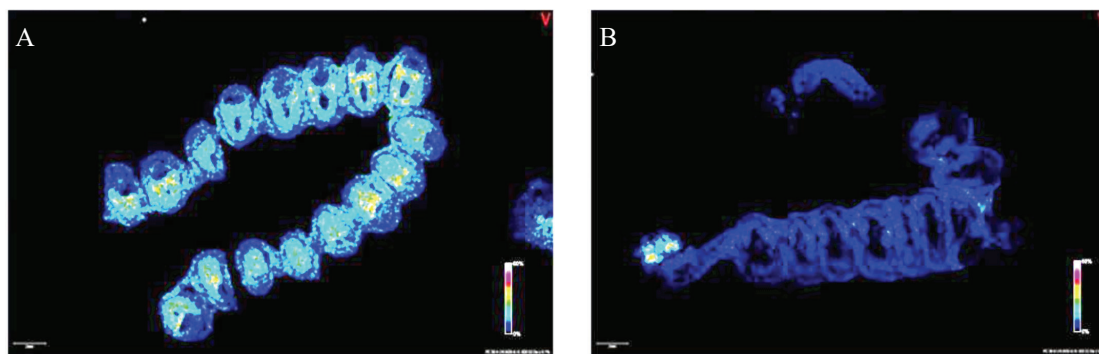
Vizsgálatunkban a túlnyomórészt OA-t tartalmazó PC (34:1) és PC (36:1) magas intenzitást mutatott az uterus különböző részein a periimplantációs időszakban, mind normál, mind IVF terhességben. Ezeknek a lipideknek a felhalmozódása azonban különbözött a két csoport között. A PC (36:1)-et a mezometriális deciduában figyeltük meg IVF-terhesség alatt, de a normál terhességben szinte hiányzott (94. ábra). Ez a szembetűnő különbség az OA-tartalmú lipidek lehetséges szerepére utal a korai embrionális fejlődésben, és amelyek patobiokémiai szerepet játszhatnak az IVF korai embrionális fejlődésében.

A többszörösen telítetlen zsírsav tartalmú PC-k mind térbeli, mind időbeni különbségeket mutattak a periimplantációs periódusban mindkét csoportban. Figyelemre méltó, hogy a legnagyobb eltérést a normál és az IVF csoport között az embrionális 8,5. napon figyeltük meg ezen PC-k intenzitásában (PC (36:2), PC (36:4), PC (38:4) és PC (40:6)) (95. ábra).



94. ábra: A PC 36:1 lokális eloszlása a 10,5 napos normál (A) és az IVF (B) egér uterusban. A lipid az IVF terhességben az mezometriális deciduában helyezkedett el, míg a normál embriókban szinte teljesen hiányzott. Méretarány: 2000 μm (színekód: sötétkék - alacsony koncentráció; fehér - magas koncentráció).

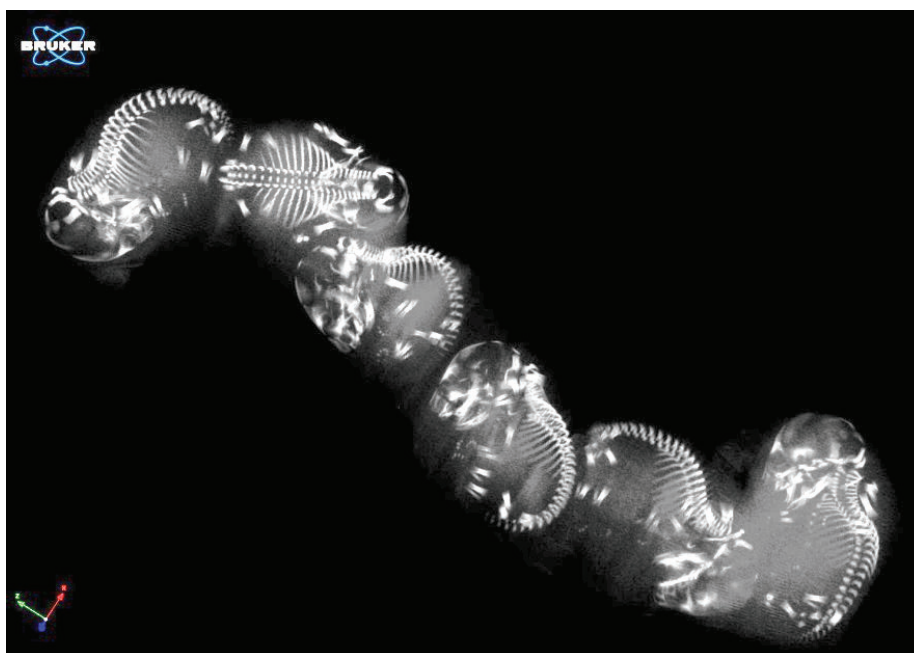
A magas n-3 vagy n-6 zsírsavban gazdag anyai étrend hatékonyan módosíthatja az uterus foszfolipid készletének zsírsavösszetételét, és egerekben még a beágyazódási arányt is növelheti [382]. Kimutatták, hogy az IVF-en áteső nők magasabb anyai DHA-bevitelle javítja az embrió morfológiáját, ami potenciális kapcsolatra utal a DHA és az IVF sikerességi aránya között [383]. Ezenkívül az anyai LCPUFA bevitel a beültetés előtt növelheti az IVF és a klinikai terhesség és az élveszületés sikerességét, ami elsősorban az n-3 LCPUFA-k, például az eikozapentaénsav hatásának köszönhető [384].



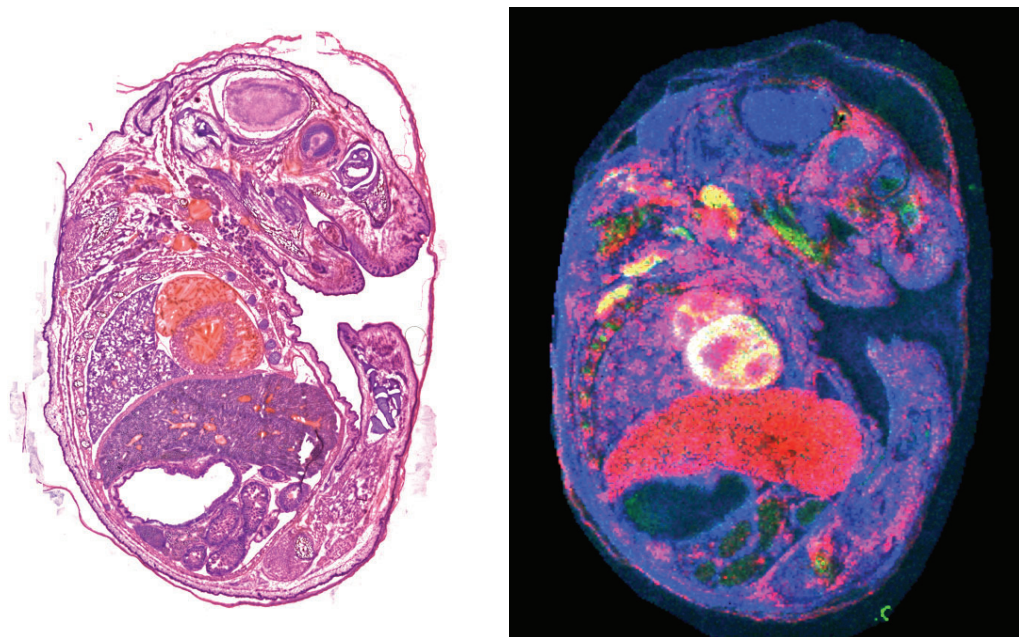
95. ábra: A PC 36:4 lokális eloszlása a 8,5 napos normál (A) és az IVF (B) egér uterusban. A lipid a normál terhességben az antimezometriális zónában helyezkedett el, míg az IVF embriókban szinte teljesen hiányzott, de az ováriumban erősen kifejeződött.

Méretarány: 2000 µm (színkód: sötétkék - alacsony koncentráció; fehér - magas koncentráció).

Idősebb embriók, például 16,5 napos terhességből származó állatok alkalmat adhatnak farmakonok metabolizmusának vizsgálatára. Kutatásaink során egy ismert teratogén hatású antiepileptikummal, Epanutinnal kezeltünk terhes egereket, annak érdekében, hogy ajak- és szápadhasadékot idézzünk elő néhány embrióban (96. és 97. ábrák). Beavatkozásaink célja az volt, hogy az ajak- és szápadhasadék molekuláris etimológiáját jobban megismerjük.

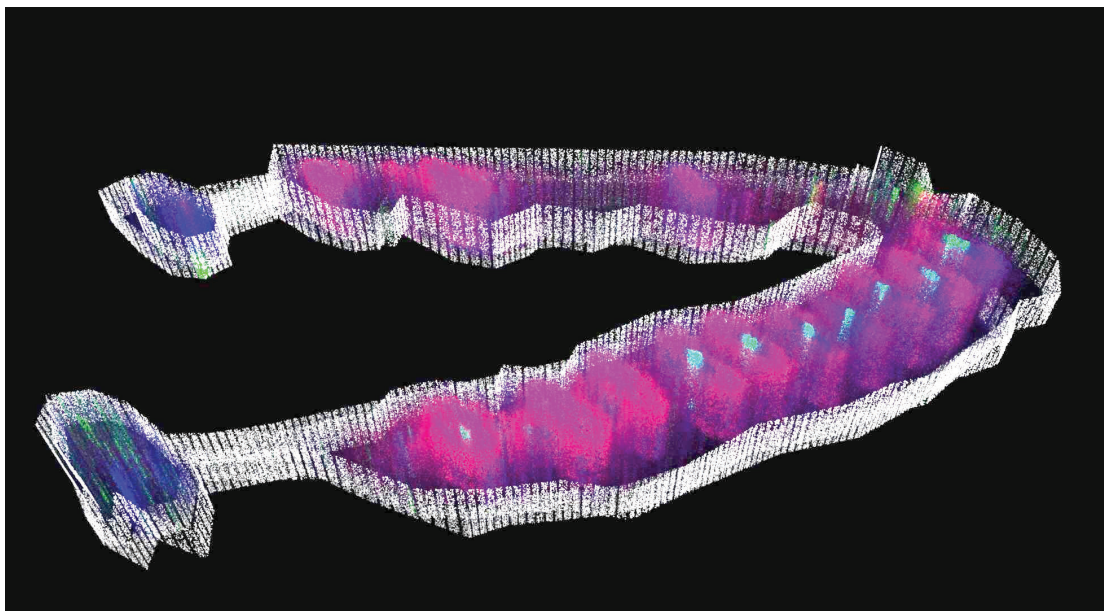


96. ábra: Az uterusban fejlődő 16,5 napos kisállat embriók CT felvétele.



97. ábra: Az uterusból kioperált 16,5 napos embrió H&E festett szövettani képe és egy reprezentatív MALDI IMS vizsgálat eredménye a szervekben/szövetekben expresszálo lipidek eloszlásáról. A különböző színek különböző foszfolipideket jelentenek.

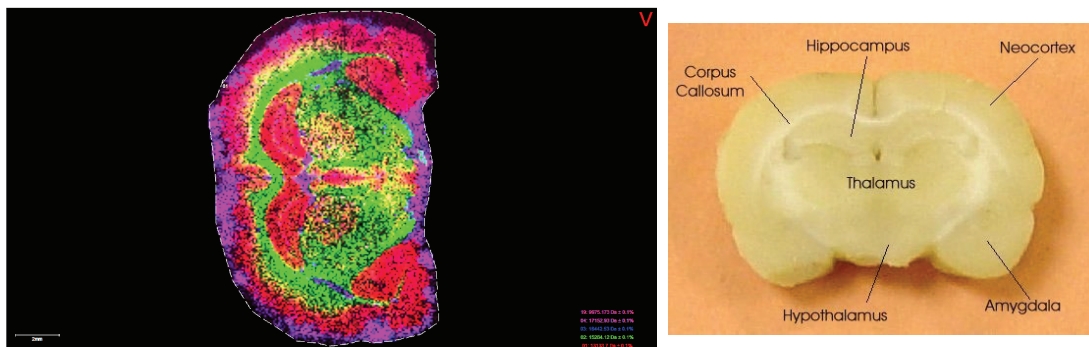
A parallel metszetekből készült képalkotási tömegspektrometriás eredményeink 3D-ban is ábrázolhatók, amely még pontosabb és részletgazdagabb képet fest a lokális molekuláris változásokról (98. ábra).



98. ábra: Reprezentatív 3D ábra az egér uterusban fejlődő 8,5 napos embriókról és az ováriumokról.

5.3.4. Nagy térbeli felbontású MALDI IMS vizsgálatok neuropeptidok sejtszintű expressziójának detektálására [X, XXXII]

Ahogy azt az 5.2.1. és az 5.2.3. alfejezetekben már röviden bemutattam a MALDI TOF MS hatékony eszköz lehet a neuropeptidok vizsgálatában, ezt kiegészítve a módszer képalkotási alkalmazása a molekuláris eloszlások nagy felbontású elemzésével és az anatómiai vonatkozások láthatóvá tételével rendkívüli lehetőségeket nyújt (99. ábra). Az idegrendszer jól definiált anatómiai struktúráinak és a neurális hálózat molekuláris működésének *in-situ* multiparametrikus összekapcsolására kiváló módszer a MALDI IMS [385].



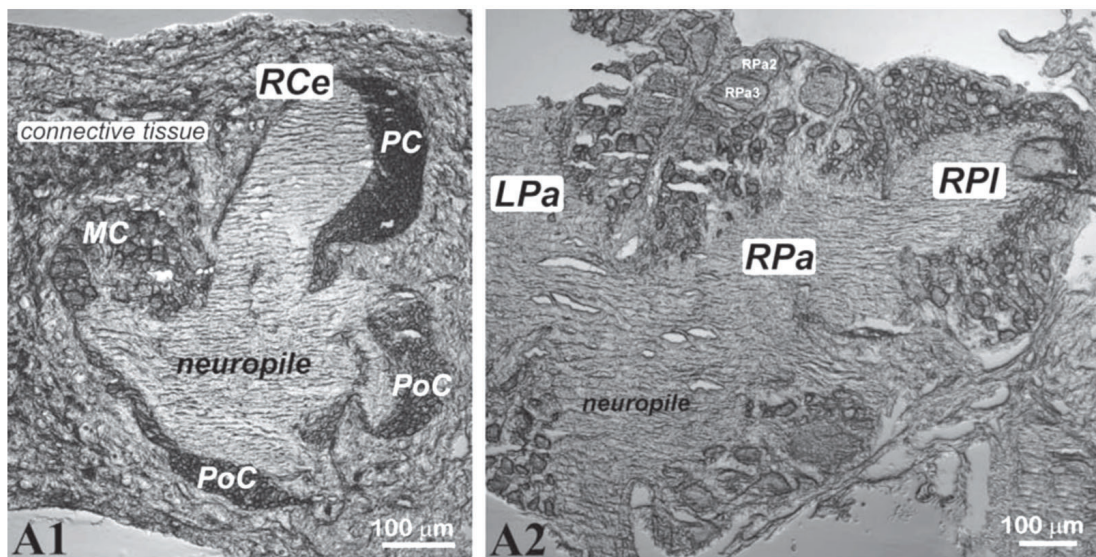
99. ábra: Fehérjék lokális expressziójának vizsgálata MALDI TOF IMS módszerrel és az egér agy anatómiája (rózsaszín: m/z 9975, magenta: m/z 17152, kék: m/z 16442, zöld: m/z 15284, piros m/z 13133). Méretskála: 2000 μm .

A neurotransmitter-rendszerek közötti kölcsönhatások intenzív kutatások tárgyát képezik, azonban az emlősöknél az idegrendszer összetettsége gyakran akadályozza a molekuláris folyamatok megértését és az eredmények értelmezését. A puhatestűek könnyen hozzáférhető és neuronról-neuronra feltérképezett idegrendszerét gyakran választják modellrendszernek a viselkedési sémák háttérében álló neurotransmitter kölcsönhatások vizsgálatához. Egyes evolúciósan konzervált molekuláris folyamatok a gerinctelenek idegrendszerében is jól tanulmányozhatók. Ilyen például az FMRFamiderg és enkephalinergikus neuronok közötti antagonizmus, valamint a dopamin (DA) szint opioid agonisták általi szabályozása, amelyeket mind emlősökben mind puhatestűekben kimutattak [386]. A csigáknál kimutatták, hogy az FMRFamid (FMRFa) és a DA elindítja, modulálja és leállítja a táplálkozási és védekező viselkedést [387, 388], amelyet ugyanakkor endogén opioidok szabályoznak [389, 390].

Az FMRFa neuropeptid és az FMRFa-t tartalmazó pleurális neuronok leállítják a táplálkozási programot és elősegítik a védekező viselkedést *Lymnaeában* [391, 392], *Helisomában* [393] és *Limax maximusban* [394], jelezve, hogy az FMRFa-t tartalmazó neuronok fontos szerepet játszanak az elvonási reakció szabályozásában. Az FMRFa eloszlásának feltérképezése a *Helix* központi idegrendszerében és a periférián immunhisztokémiai és RIA módszerekkel széles körű eloszlást mutatott, ami számos fiziológiai és viselkedési folyamatban való részvételüket jelzi. Immuncitokémiai vizsgálatokat végeztek anti-FMRFa antiszérummal különböző szárazföldi csigákon, mint

például a *Helix pomatia* vagy a *Limax maximus*. Az FMRFamid-szerű immunreaktivitás eloszlását a CNS különböző részein mutatták ki [394-397].

Vizsgálatunk célja, hogy közvetlenül a *Helix pomatia* CNS szövetmetszetről néhány mikrométeres felbontással sejtszintű expressziót mutassunk ki az FMRFamid tekintetében MALDI LTQ Orbitrap IMS segítségével. A kísérleteket a *Helix pomatia* szárazföldi csiga kifejlett példányain végeztük. A csigákat (n=10) laboratóriumi körülmények között neveltük; $24 \pm 2^\circ\text{C}$ szobahőmérsékleten, az állatok 12 óra világos és 12 óra sötét ciklus szerint, 95-98%-os páratartalom mellett terráriumban nevelkedtek, salátával és uborkával hetente kétszer etettük őket. A kifejlett csigákat lefejeztük, és a teljes központi idegrendszer (CNS) kiboncoltuk, közvetlenül 4%-os (V/V) paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 2 órán keresztül, majd 10%-os (m/V) zselatinba ágyasztuk 25°C -on, és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A 6-8 μm -es szövetmetszeteket Bright OTF 5000 kriosztáton készítettük -25°C -on. A metszeteket ITO bevonatú üveglemezekre (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) helyeztük és 1-2 percig levegőáramban szárítottuk, majd -80°C -on tároltuk őket a MALDI LTQ Orbitrap IMS vizsgálatokig. A morfológia megőrzését a metszési és a tárolási folyamatot követően optikai mikroszkópiával ellenőriztük.



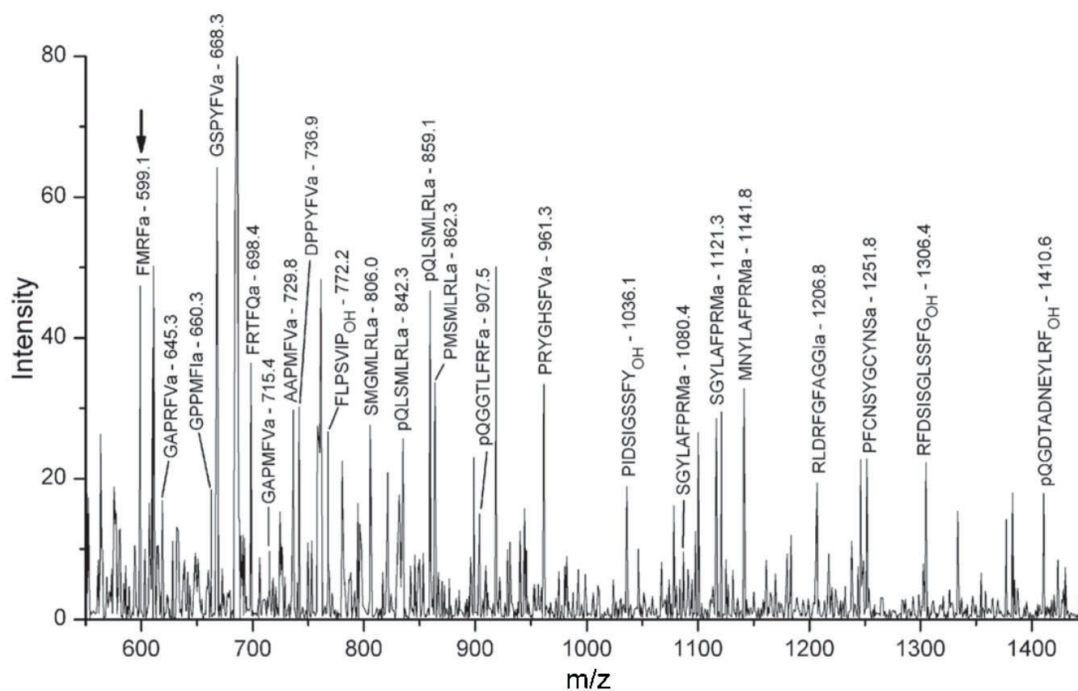
100. ábra: A 4%-os PFA fixált *Helix* agyi kriometszetek mikroszkópos képei. (A1) a jobb agyi ganglion (RCe) és annak különböző részei, mint a procerebrum (PC), mezocerebrum (MC), posztocerebrum (PoC) és a neuropile régió, (A2) a visceroparietalis-pleurális ganglion komplexumot mutatja. Az RPa2 és RPa3 azonosított nagy neuronokat jelöl, amelyek referenciapontokat biztosítanak. Méretskála: 100 μm .

A 100. ábra a CNS jobb agyi (A1) és jobb parietális-plurális (A2) ganglionjainak optikai képét mutatja. A képeken jól látható az azonosított neuronok (RPa2, RPa3) különböző mérete a jobb agyi ganglionok különböző részein, mint például a pro-, mezo- és postocerebrum és a jobb parietális-plurális ganglionok, valamint a neuropil régióban.

A szöveti homogenátumban végzett célzott peptidelemzést szelektív ionmonitorozással végeztük egy Finnigan AQA (Thermoquest, San Jose, USA) tömegspektrométerrel, amelyet ESI interfésszel használtunk. A spektrumokat pozitív ion módban vettük fel 1,2

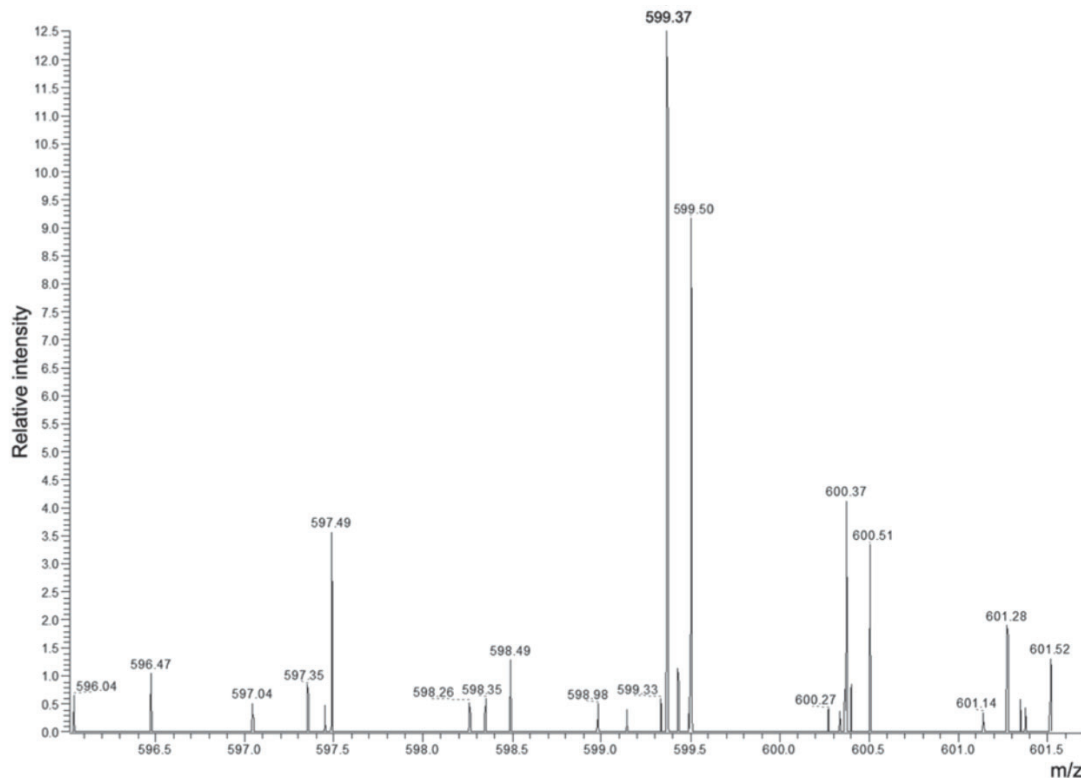
scan/s sebességgel m/z 400 és 1600 közötti tartományban. A mintákat 3 állatból készítettük. A teljes CNS-t 100 μ l, 0,1 M hideg foszfát pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk, amely 10% (V/V) proteáz/peptidáz inhibitor koktélt tartalmazott. Az agyi homogenátumot 13000 g-vel 10 percig centrifugálással tisztítottuk. A centrifugált minták 50 μ l-ét 50 μ l 1%-os (V/V) TFA-val savanyítottuk, majd 8000 g-n centrifugáltuk, és a felülúszót ZipTipC4 (Millipore, Billerica, MA, USA) pipettaheggyel tisztítottuk. A vegyületek tömegspektrumainak feldolgozására a Finnigan Xcalibur XCALI-97006 szoftvert használtuk.

A szöveti krioszekciókat elektroporlasztással vontuk be CHCA mátrix-szal. Ebben a képalakotási munkában egy MALDI LTQ Orbitrap XL tömegspektrométert (ThermoFisher Scientific, Bréma, Németország) használtunk pozitív üzemmódban. A készülék egy kereskedelmi forgalomban kapható 60 Hz-es, 337 nm-es N₂ lézert (LTB Lasertechnik Berlin GmbH, Berlin, Németország) használ. A peptidtömegeket az m/z 200 és 3000 közötti tömegtartományban vettük fel.



101. ábra: *Helix pomatia* CNS homogenizátum ESI-MS vizsgálatának reprezentatív eredménye az azonosított peptidok szekvenciáival. Az FMRFa protonált kvázimolekulacsúcsát $[M+H]^+$ a nyíl mutatja m/z 599,1 értéknél.

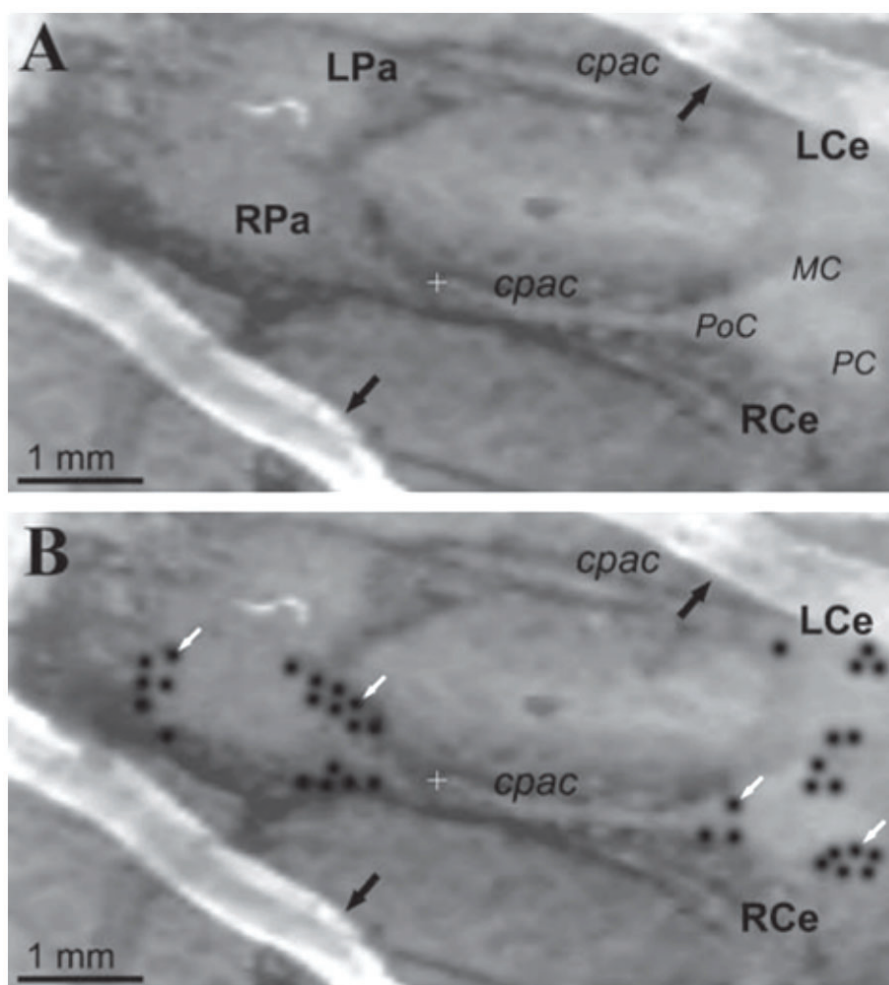
Az agyi homogenátum MS-analízise során számos tömegspektrometriás csúcsot detektáltunk (101. ábra). Ebből 23 neuropeptidet azonosítottunk a korábbi szekvenciaadatok, elméleti és megfigyelt tömegek alapján és irodalmi adatok alapján [398-399, IV, XXXIII]. A korábbi és a jelenlegi tömegspektrometriás adataink alapján tudjuk, hogy a *Helix* CNS neuronjai viszonylag magas koncentrációban tartalmazzák az FMRFa.



102. ábra: Reprezentatív MALDI Orbitrap MS spektrum a *Helix* agyi ganglionjának CHCA mátrixszal bevont felszínéről (m/z 596,0 és 601,7 között). Az m/z 599,37 csúcs az FMRFa diagnosztikus ionsúcsát mutatja.

A 102. ábra *Helix* agyi ganglionjának felszínéről készített reprezentatív MALDI tömegspektrumot mutatja a m/z 596,0 és a m/z 601,7 között. Ez a spektrum tartalmaz egy jellegzetes FMRFa csúcsot a m/z 599,37-nél. A mátrix bevonatú kriometszet ionoptikai képét egy pozícióérzékeny detektorral rögzítettük és az optikai képeket a készülék CCD-kamerájával készítettük (103.A. ábra). Ezen az ionoptikai felvételen az agyi és a parietális-plurális ganglionok különböző részei azonosíthatók. A 103.B. ábra az FMRFa kiválasztott tömegének (m/z 599,37) szürkeárnyaltos eloszlását mutatja ugyanezen az ionoptikai képen. Az FMRFa lokális eloszlását különálló mérésekből rekonstruáltuk úgy, hogy három 10x10 mm-es területről készített mérés eredményét 30 μ m átfedéssel egymásra vetítettünk. Az egyes sötét foltok egy-egy 90-100 μ m-es, FMRFa expresszálo neuronokat tartalmazó régiót jelölnek. Eredményeink alapján a jobb oldali parietális-plurális ganglion több FMRFa-ot tartalmazó foltot tartalmaz, mint a bal parietális és visceralis ganglion. Az agyi ganglionok pro-, mezo- és posztcerebrális régiójában is számos FMRFa expresszálo neuront detektáltunk.

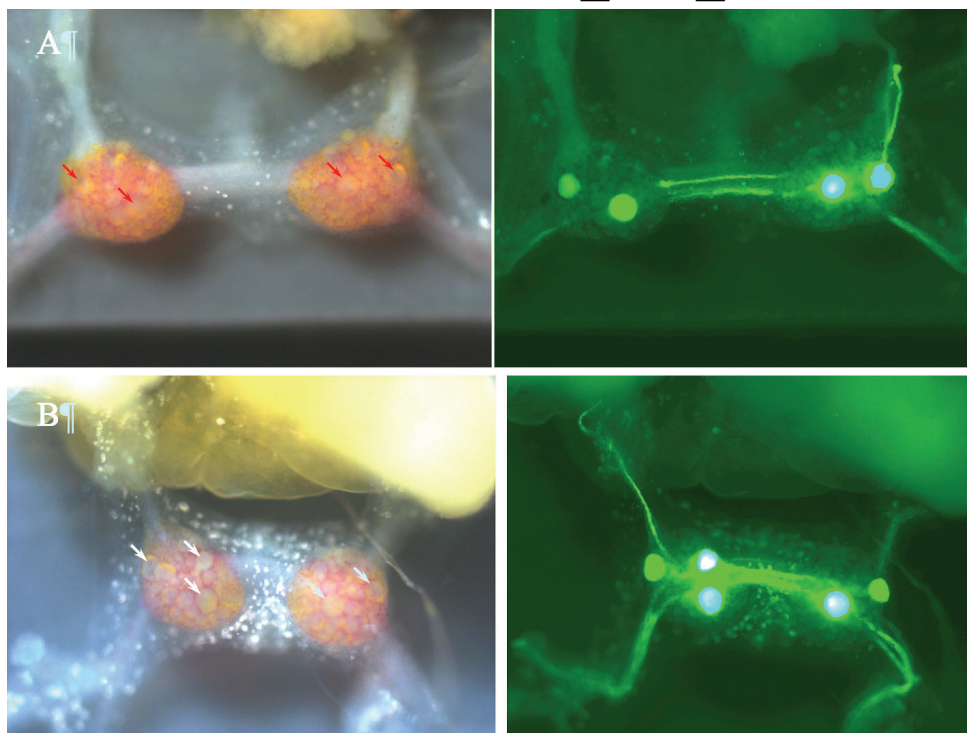
Tanulmányunkban mutattuk be először a *Helix* CNS FMRFa lokális eloszlását ellenanyag használata nélkül. Képpalkotási tömegspektrometriás vizsgálataink során sejtszintű, néhány mikrométeres (ca. 5 μ m) térbeli felbontással térképeztük fel az m/z 599,37 (FMRFa) tartalmú neuronok eloszlását közvetlenül a CNS ganglionjaiban. Eredményeink szerint az FMRFa túlnyomórészt a CNS agyi ganglionok, a pedális ganglionok és a jobb oldali parietális ganglionok pro-, mezo- és posztcerebrális régióiban található neuroncsoportokban lokalizálódott.



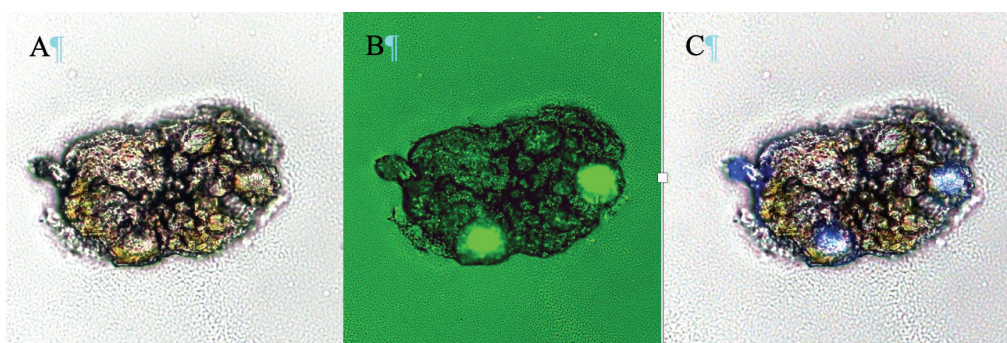
103. ábra: Optikai (A) és ion-optikai (B) képek a *Helix* CNS azonos részéből. Egy-egy sötét folt (fekete nyilak) egy 90-100 μm -es régiót mutat, amely FMRFa-t expresszáló idegsejteket tartalmaz. Fehér nyilak jelzik a referenciavonalat a kiválasztott CNS körül.

LCe/RCe: bal/jobbsági agyi ganglion, PC: procerebrum, MC: mezocerebrum, PoC: posztocerebrum, cpac: cerebro-parietális kapcsolat. Méretskála: 1000 μm .

Az egy sejt (single cell) felbontású MS és IMS vizsgálatok, illetve „omikai” alkalmazások napjaink egyik intenzíven fejlesztett területe. Munkacsoportomban számos olyan elképzelést valósítottunk meg, amelyek ezt a célt szolgálják. A megvalósítás során jelentős kihívásokkal kell szembe néznünk úgy, mint a sejtek kis mérete (átlagosan ca. 5-10 mikron) és térfogata (néhány száz nanoliter), a komponensek széles dinamikus tartománya, illetve a bioaktív molekulák alacsony koncentrációja. Az egyik „single cell” megoldásban a sejtet (pl. neuron) feltöltöttük fluoreszcens festékkel (pl. DAPI, FITC) és MALDI mátrix oldattal (104. ábra), majd kriosztatós metszetkészítést követően, további mintaelőkészítés nélkül MALDI TOF IMS vizsgálatot végeztünk a metszeten [XXXII].



104. ábra: Csiga idegrendszerének kipreparált részlete. A nyilak a fluoreszcens festékekkel (FITC) és (A) CHCA, (B) DHBA mátrixszal injektált neuronokat mutatják.



105. ábra: *Helix* idegrendszer részletének mikroszkópos felvétele (A), FITC fluoreszcens festékekkel és CHCA mátrix-szal feltöltött neuronok lokalizációja (B), kék színnel jelölve az FMRFa (m/z 599,1) MALDI TOF IMS vizsgálatának eredménye.

A pozitív módon reflektoron detektor alkalmazásával elvégzett MALDI IMS vizsgálatok eredményét a 105. ábra mutatja, ahol jól megfigyelhető az FMRFa (m/z 599,1) lokalizációja a *Helix* ganglion festékekkel és MALDI mátrixszal (CHCA) feltöltött két sejtjében.

5.3.5. Lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (LAESI) alkalmazása a képkalkotási tömegspektrometriában [XIX, XXXI]

A sejtek és szövetek természetes víztartalmának mátrixként való felhasználására tervezett LAESI 2940 nm-es közép-infravörös lézerimpulzusokat használ a mintában lévő O-H rezgések gerjesztésére a hatékony energiadepozíció érdekében [16-18]. A hirtelen

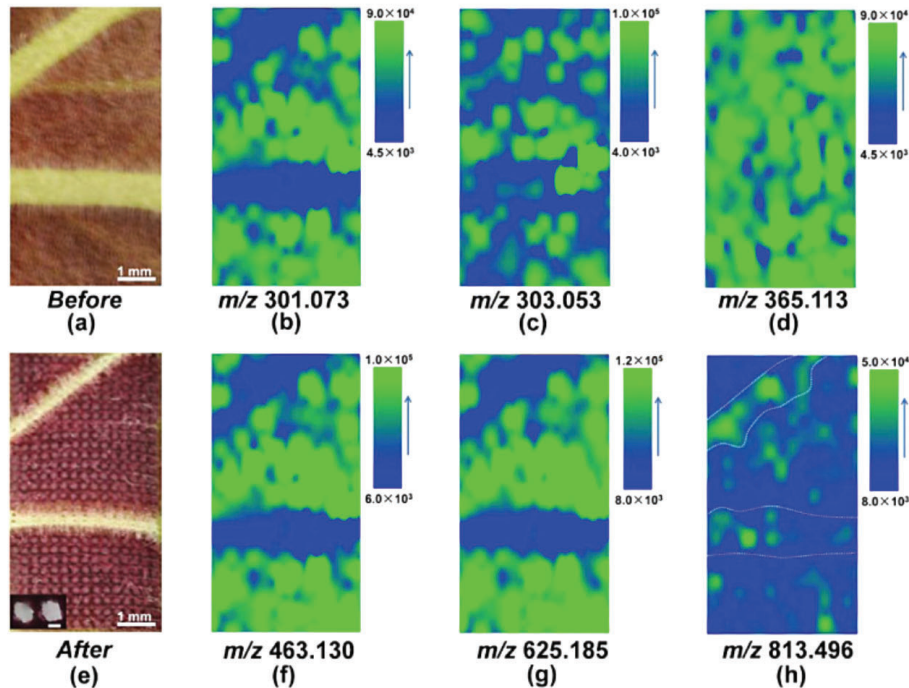
energiaabszorpció ablációhoz vezet, amelyet a fázisrobbanás és a megnövekvő nyomás által a részecskék kilökődése hajt [400, 401]. Az ablált részecskéket az elektroporlasztás befogja, és a mintához kapcsolódó ionok keletkeznek. A kétdimenziós LAESI IMS-t már leírták a metabolit- és lipideloszlások feltérképezésére élő növényekben és patkányagy kriometszetekben [17, 402]. A háromdimenziós LAESI IMS megvalósíthatóságát is demonstrálták növényi levelek esetében ca. 30 μm mélységfelbontással [18]. A kapott molekuláris képek jó korrelációt mutatnak a vizuálisan megfigyelt jellemzőkkel (pl. tarka mintázat) és az ismert biológiai funkciókkal (pl. a klorofill lokalizációja). Közvetlen ionizációs technikaként a hagyományos LAESI MS nem tartalmaz elválasztási lépést, amelyről ismert, hogy javítja a molekuláris azonosíthatóságot a bioanalitikai módszereknél. Hasonlóképpen, további korlátot jelenthet az izobár tömegű vegyületek interferenciája és az összetett mintákban jelentkező erős ionszupresszió [403, 404]. Például a lipidek gyakran interferálnak a többszörösen töltött peptidekkel az m/z 600-1200 tartományban [405]. Ezért előnyösnek tűnik egy on-line elválasztási lépés pl. ion mobilitás tömegspektrometria integrálása a LAESI IMS-be.

Az ionmobilitás-spektrometriát először az 1970-es évek elején vezették be [406]. A gázfázisú ionokat az ütközési keresztmetszetük különbségei alapján választják el úgy, hogy elektromos mezők segítségével puffergázon vezetik át őket [403, 407-409]. A hagyományos elválasztási módszerektől, pl. a folyadékkromatográfiától, a kapilláris elektroforézistől és a gél alapú elválasztásoktól eltérően, amelyek több perces időskálán zajlanak [404], az ionmobilitás tömegspektrometria kellően gyors (az elválasztás jellemzően kevesebb, mint 1 s-ig tart) ahhoz, hogy közvetlen ionizációs, MS és IMS kísérletekkel lehessen kapcsolni [405, 409-416].

Hagyományos LAESI ionmobilitási képalkotási tömegspektrometriás vizsgálatainkat a The George Washington University-n Vértés Ákos professzor laboratóriumában végeztük el. A mérésekhez egy Waters Synapt G2 S Q-TOF tömegspektrométert használtunk, amely egy saját építésű LAESI egységgel volt felszerelve. A LAESI 2940 nm hullámhosszú, Q-kapcsolt 5 ns-os közép-IR lézerimpulzusokat alkalmaz (IR Opolette 100, Opotek Inc., Carlsbad, CA, USA) amelyeket egyetlen plano-konvex lencse (Infrared Optical Products, Farmingdale, NY, USA) fókuszált a minta felületére, hogy ablációs felhőt hozzon létre. A fókuszpont átmérője ca. 150 μm volt. A HPLC minőségű vizet és metanolt az Alfa Aesartól (Ward Hill, MA, USA) szereztük be. A jégecetet a Flukától (München, Németország) vásároltuk. Az egészséges *Pelargonium peltatum* leveleket a növényről való eltávolítás után azonnal, további kezelés nélkül elemeztük. Az egér agymintákat a Children's National Medical Center által biztosított egészséges BALB/c egértörzsből nyertük az intézményi állathasználati és állatgondozási bizottság (IACUC) jóváhagyásának megfelelően. Az egerek központi idegrendszerét 14 hónapos korukban, nyaki diszlokáció után operáltuk ki. Az agymintákat folyékony nitrogénben lehűtött izopentánnal fagyasztottuk, és -80°C -on tároltuk. A -25°C -ra állított kriosztát (CM1900, LEICA Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) segítségével készítettünk szagitális metszeteket (60 μm), amelyeket mikroszkóp tárgylemezekre rögzítettünk, és a további felhasználásig -80°C -on tároltuk.

Amint az a 106. ábra (b), (f) és (g) paneljén látható, az m/z 301,073, 463,130 és 625,185 ionok eloszlása a levél lila területein nagyobb koncentrációt mutat, míg hiányoznak a

sárga színű vénás régiókban. Az m/z 301,073 pontos tömege és a tandem MS mérések alapján a diosmetin, egy O-metilált flavonoid, vagy annak szerkezeti izomerjei jelenlétére utal. Az m/z 463,130 és 625,185 m/z ionok tandem MS vizsgálatai egy m/z 301,072-es fragmentumot mutatott, amely közel állt a levélspektrumban közvetlenül detektált m/z 301,073-as ionhoz. A három ion közötti m/z különbségek alapján, az m/z 463,130-at glükozidként, az m/z 625,185-öt pedig diglukopiranozil-származékként azonosítottuk.

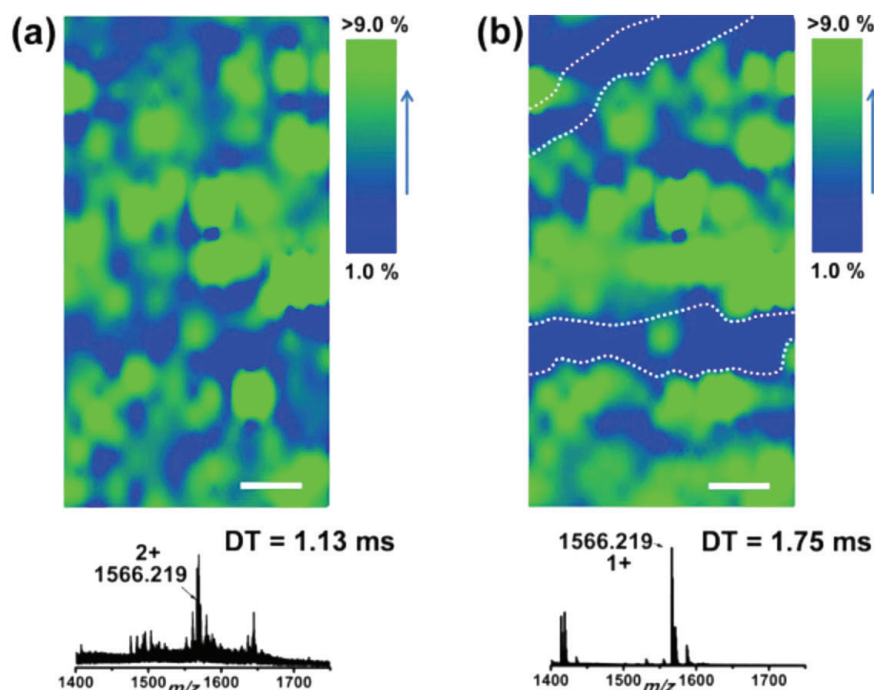


106. ábra: Optikai képek (a) a lézer ablációs mintavételezés előtt és (e) után, valamint ioneloszlások a *P. peltatum* levél abaxiális felületén egy LAESI-IMS-MSI kísérletben. Az (e) panelben lévő betét két ablációs nyomot mutat a szövetben. Méretskála: 100 μm . Az ioneloszlások (b) diosmetin vagy annak szerkezeti izomerei (m/z 301,073), (c) kvercetin vagy szerkezeti izomere (m/z 303,053), (d) nem azonosított diszacharid (m/z 365,113), (f) a diosmetin glükozidja vagy szerkezeti izomerei (m/z 463,130), (g) a diosmetin egy diglukopiranozilszármazéka vagy szerkezeti izomerei (m/z 625,185), és (h) m/z 813,496.

A 106. ábra (c) pontja azonban azt mutatja, hogy a tandem MS által kvercetinként vagy egy szerkezeti izomerként azonosított m/z 303,053-as ion intenzitása nem mutat korrelációt az eloszlásában az optikai képen megfigyelt mintázattal. Hasonlóképpen, a 106. ábra (d) paneljén az m/z 365,113 intenzitáseloszlása egyenletes a különböző színű területeken. Ezzel szemben a 106. ábra (h) az m/z 813,496 ion eloszlását mutatja, amely a vénás régióban valamivel nagyobb gyakoriságúnak tűnik.

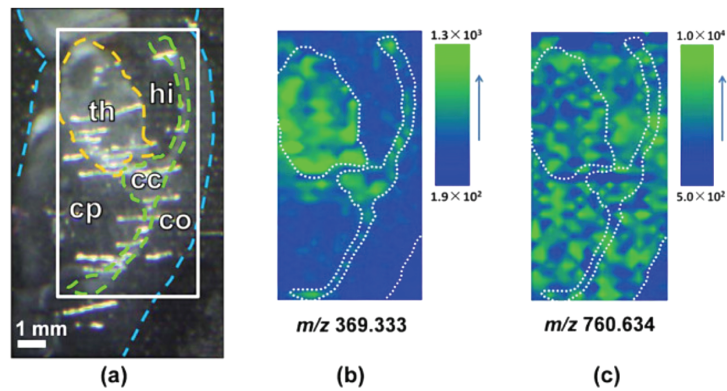
Az ionmobilitás tömegspektrometria azon képessége, hogy meg tudja különböztetni az izobár és az izobárhoz közeli ionokat, lehetővé tette e vegyületek LAESI MS-val történő külön képalkotását. Az 107. ábra az izobárhoz közeli ionok eloszlását szemlélteti az m/z 1566-nál, $DT=1,13$ ms és $DT=1,75$ ms. Az 1,13 ms DT -vel rendelkező kétszeresen töltött ion viszonylag egyenletes eloszlást mutat a vizsgált területen, míg a 1,75 ms DT -vel

jellemezhető egyszeresen töltött ionok gyakorisága alacsonyabbnak tűnik a vénás régiókban. Ez a példa azt mutatja, hogy az ionmobilitással történő szeparáció nélkül az izobár vagy közel izobár ionok elfedhetik a molekuláris eloszlás valódi természetét a képpalkotás során.



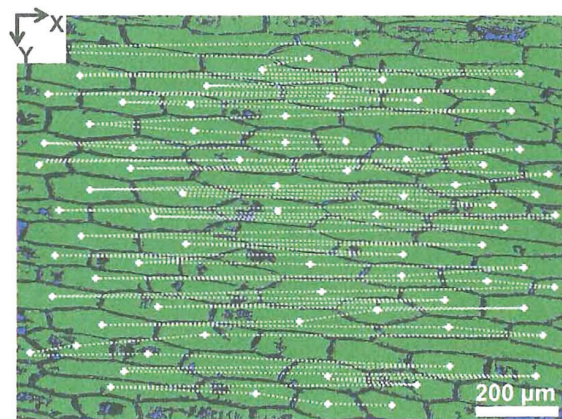
107. ábra: Az IMS által megkülönböztetett két közel izobár ion intenzitáseloszlása. Az (a) panel az m/z 1566,22 $DT=1,13$ ms értékű kettős töltésű ion eloszlását mutatja, míg a (b) panel az m/z 1566,22 m/z $DT=1,75$ ms értékű egyszeresen töltött ion eloszlását szemlélteti. Méretskála: 1 mm. A hamis színskála a képpontonkénti ionszámot mutatja a kép legfényesebb képpontjának százalékában.

Az egér CNS vizsgálatának eredményeit a 108. ábrán mutatom, ahol az m/z 369,333 ion térbeli eloszlása nagyobb intenzitást mutat a fehérállományban, különösen a corpus callosum és a thalamus régióiban, mint a szürkeállományban. Korábbi eredmények alapján az m/z 369,333 ion a koleszterin $[M-H_2O+H]^+$ fragmentumának felel meg [417]. A koleszterin nagyobb mennyiségét a fehérállományban kimutató eredményünk összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal [418-420]. Ezzel szemben a korábbi vizsgálatokban a PC (34:1) $[M+H]^+$ -jeként azonosított m/z 760,634 [417] viszonylag egyenletes intenzitáseloszlást mutat a teljes szöveti metszetben, ami összhangban van a korábbi MALDI MS-sel végzett vizsgálatokkal [415].



108. ábra: Optikai kép az egér agy szagittális metszetéről, a cortex (co), a corpus callosum (cc), a hippocampus (hi), a thalamus (th) és a putamen caudatus (cp) anatómiai régióit ábrázoló vonalakkal. A **(b)** koleszterin $[M-H_2O+H]^+$ fragmentum esetében a thalamusban és a corpus callosumban nagyobb intenzitást mutatnak, míg a **(c)** m/z 760,634 (PC (34:1)) esetében egyenletes eloszlás figyelhető meg. Méretskála: 1 mm.

Másik tanulmányunkban az automatizált sejtenkénti képalkotás lehetőségeit vizsgáltuk LAESI MS segítségével *Allium cepa* tipikusan egy sejt vastagságú epidermális mintáján [XXXI]. Az optikai mikroszkópos képekből származó sejtfelismerésre épülő technikánál az egyes sejtek ablációjához a sejtek középpontjának koordinátáit képfeldolgozással határoztuk meg. Egy vezérlő programot fejlesztettünk ki, amely ezeket a koordinátákat bemenetként használta a lézer száloptikájának pozicionálásához és az azt követő ablációhoz (109. ábra).

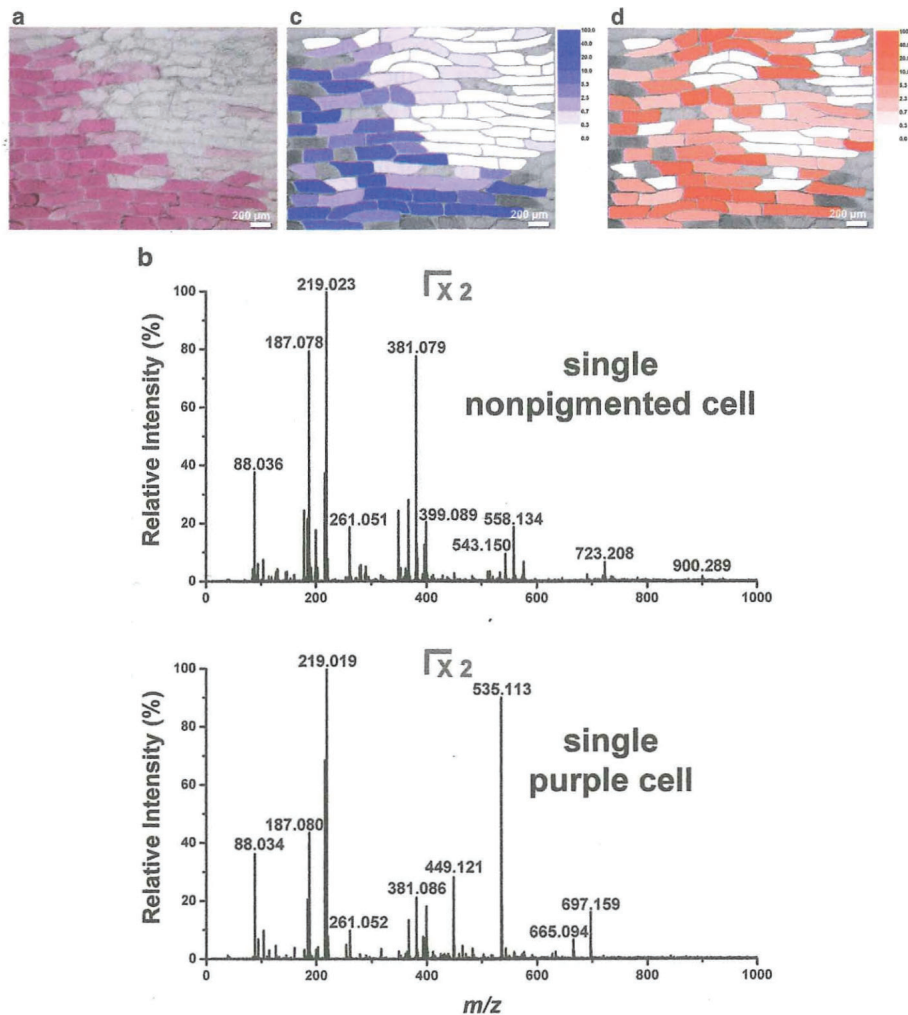


109. ábra: A sejtről-sejtre történő szkennelés és lézer abláció útvonala.

Az egyes sejtek ablációs eseményei értékelhető tömegspektrumot eredményeztek, amelyeket a 110. ábra szemléltet.

Az egyes ablált sejtek ionintenzitását meghatároztuk, hogy sejtenként hamis színű molekuláris térképet készíthessünk, amely tükrözi a metabolitok eloszlását a szövetben. A 110.(c) és (d) panel a kiválasztott ionok (m/z 535,113 és 543,159) sejtenkénti molekuláris képeit mutatja, a nem pigmentált és a lila színű sejtek jelentős különbségeket mutatnak. A pigmenteloszlás erős korrelációja a cianidin-malonil-glükózid (m/z 535,113) eloszlásával validálja a sejtről-sejtre alkalmazott képalkotási megközelítésünket. Ugyan a vizsgált növényi sejtek több száz mikrométer nagyságúak, de eredményeink

bizonyították, hogy a száloptikán keresztül történő lézeres abláció eredményes lehet a sejtszintű képalkotási tömegspektrometriás elképzelések megvalósítására.



110. ábra: (a) Az *Allium cepa* epidermális szövetének mikroszkópos képe, amelyen nem pigmentált és lila sejtek láthatók. (b) Tömegspektrumok egyetlen nem pigmentált sejtől (felső panel) és egyetlen lila sejtől (alsó panel). (c) A cianidin-malonil-glükózid (m/z 535,113) molekuláris sejt felbontású képe összhangban van a lila színű sejtek eloszlásával. (d) A triszacharid (m/z 543,159) sejtenkénti iontérképe egyenletesebb eloszlást mutat. Méretskála: 200 μm .

A lézer abláció hatékonyságának növelése és kutatási lehetőségeink kiterjesztése érdekében a PTE ÁOK Biofizika Intézetével 2012-ben közösen megépítettünk egy femtoszekundumos lézerrel (Spitfire Ace 100 fs) szerelt fsLAESI berendezést. Tudomásunk szerint ez volt az első olyan fsLAESI MS/MS berendezés, amely komolyabb fragmentáció nélkül képes volt detektálni lipideket, peptideket és kisebb tömegű fehérjéket közvetlenül a szöveti felszínről.

A fsLA igen elterjedt és hatékony mintavételezésnek számít az elemanalízisben, így számos atomspektroszkópiás módszer pl. a lézerindukált plazmaspektroszkópia alkalmazza [1]. Az fsLA-t az ezredforduló óta használják anyag megmunkálásra [421] és rutin mikrosebészeti eljárások, műtétek elvégzésére, ahol a ns-os impulzusnyalábbal

elvégzett beavatkozásokhoz képest jóval tisztább felszint, pontosabb vágást tesz lehetővé [422-425]. Kísérletekben tesztelték a 75 fs, 800 nm-es fsLA alkalmazhatóságát szarvasmarha szaruhártyájának nagy pontosságú vágására. Az ablációt követően MALDI MS-sel vizsgálták a foszfolipidek és a 6 kDa-nál kisebb tömegű peptidek termikus károsodását. A kontroll és a besugárzott szövetmetszetek hasonló tömegspektrumot mutattak, ami azt jelzi, hogy az fsLA olyan módon végezhető el, hogy viszonylag kevés kémiai károsodást okoz [426].

Az fsLDI MS-sel történő képképzési tömegspektrometria lehetőségeit is megvizsgálták humán hasnyálmirigy szövetminták lipidösszetételének feltérképezése segítségével [427]. Az analízis során ca. 10 μm vastagságú szövetmetszeteket ITO bevonatú üveglemezek felületére helyezve vették fel az iontérképet, amelyek mutattak ugyan lokális változásokat, azonban a detektált tömegek többnyire atípikus lipid fragmentumok voltak [428]. A túlzott molekuláris fragmentáció szintén aggodalomra ad okot a vákuumot vagy extrém UV ns lézert használó LA MS esetében, bár mindkettő nagy potenciállal rendelkezik a szubmikronos térbeli felbontás elérése érdekében az MS képképzésben [429-432]. A femtoszekundumos lézerek tömegspektrometriás alkalmazásának egyik legígéretesebb alkalmazási területe a posztionizációra való használat. A 10,5 eV-os posztionizációval párosított fsLDPI MS-t különböző intakt kismolekulatömegű vegyületek kimutatására használták szövetekben és biofilmekben [433-435]. A fragmentáció elkerülése érdekében a lézer ablációt követő másodlagos elektroporlasztásos ionizáció alkalmazása hatékony kombinációnak tűnik [436].

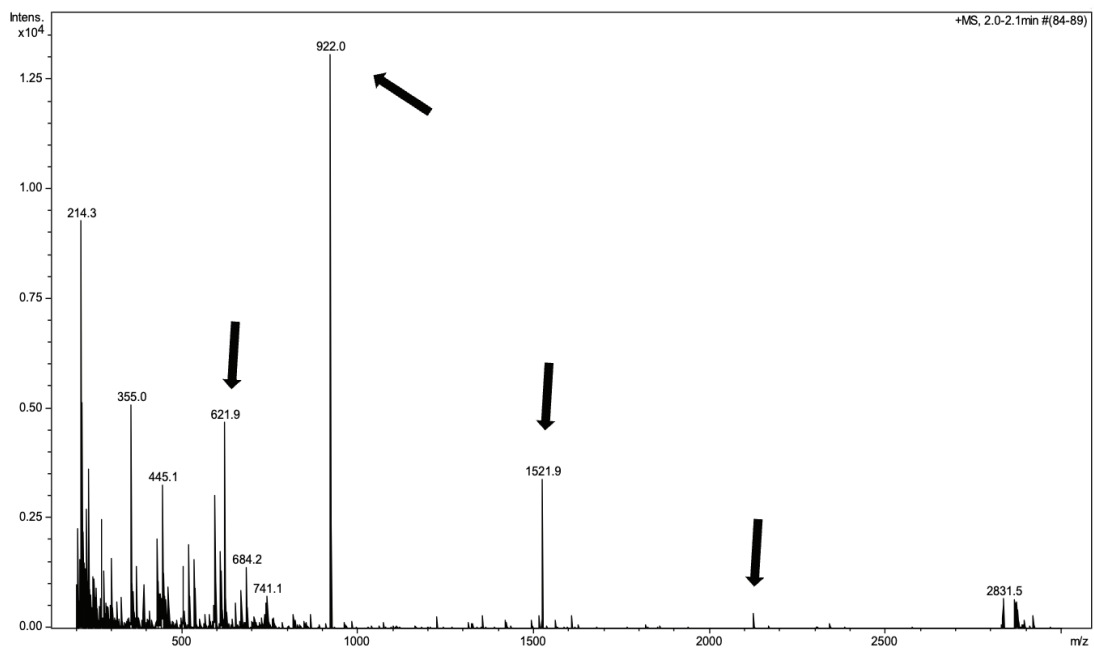
Az általunk összeállított berendezés felépítését a 111. ábra mutatja.

A vizsgálatok során elsőként az LC MS vizsgálatoknál is alkalmazott kalibrációs oldat (Agilent low calibration mix) tömegspektrumát vettük fel (112. ábra). A mérések alkalmával az oldat 20 μl -ét üveg tárgylemezre cseppentettük, majd a femtoszekundumos lézernyaláb fókuszpontjába helyeztük. Másodlagos ionizációként egy kereskedelmi forgalomban kapható Bruker ESI ionforrást alkalmaztunk. A tömegspektrumokat és az MS/MS fragmentációkat egy Bruker HCT ioncsapdás tömegspektrométerrel pozitív módban rögzítettük.

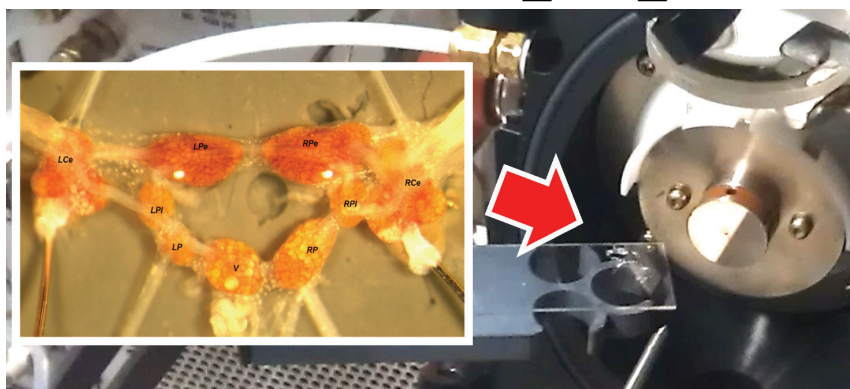
Eredményeink jól reprezentálják, hogy kisebb fragmentáció mellett a referencia oldat jellemző komponensei detektálhatók voltak. A kalibráló oldat vonatkozásában a vizsgálati módszer kimutatási határa alsó femtomol tartományra tehető.



111. ábra: A munkacsoportom által megépített fsLAESI rendszer kísérleti elrendezése.

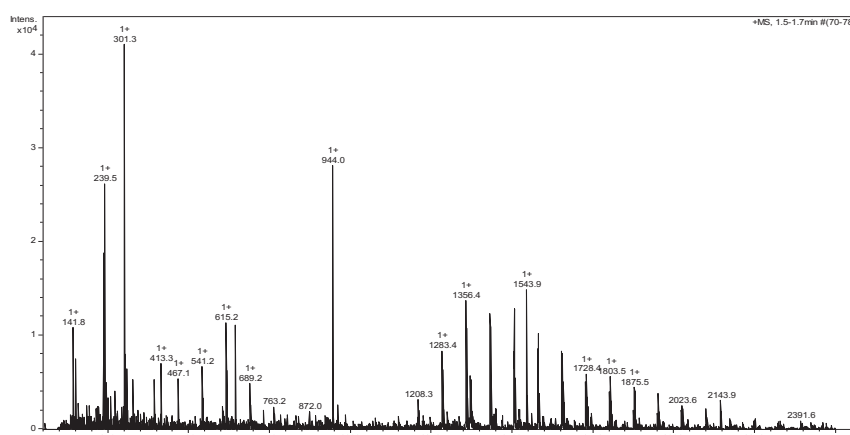


112. ábra: A kalibrációs referencia oldat (Agilent low concentration tuning mix) fsLAESI MS reprezentatív tömegspektruma. A nyilak az azonosított referenciacsúcsokat mutatják (m/z 622, 922, 1522, 2122).

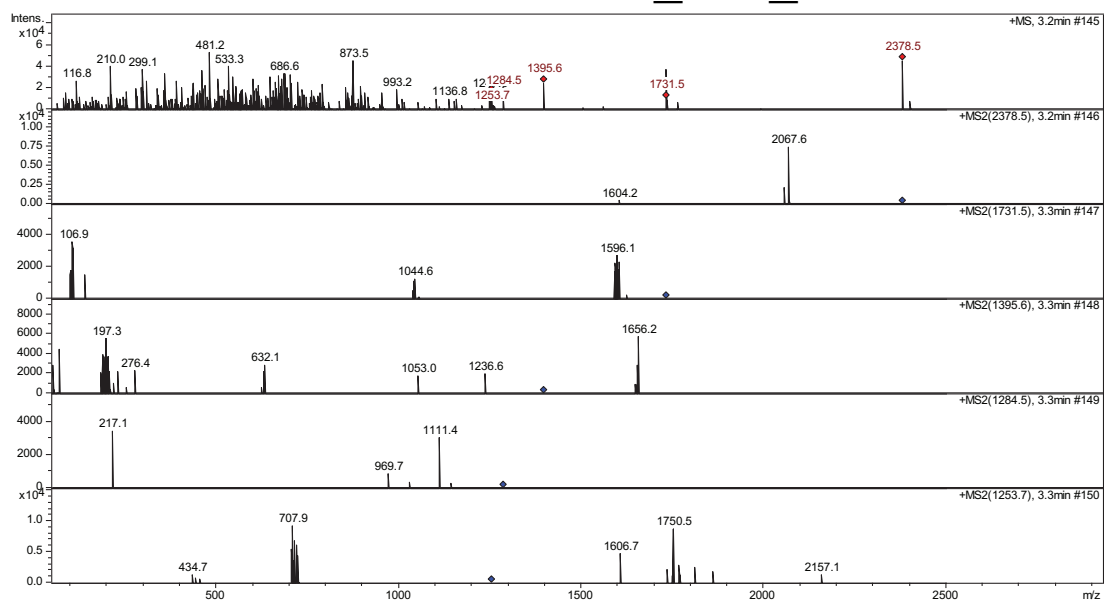


113. ábra: *Helix* idegrendszerének fsLAESI vizsgálata.

Biológiai mintaként a korábbi MALDI TOF MS vizsgálataink során megismert *Helix pomatia* központi idegrendszerét használtuk. A CNS mintát az üveglemezre helyeztük (113. ábra) és az ESI forrás bekapcsolása után a lézernyaláb fókuszpontjába mozgattuk. A vizsgálatok eredményeként kapott reprezentatív tömegspektrumot a 114. ábra mutatja. Látható, hogy a vizsgált tömegtartományon belül csúcsgazdag, főként egyszeres töltésű ionokat tartalmazó spektrumot kaptunk. A spektrumon lipidek és peptidek egyaránt jelentkeznek, szerkezetük igazolására MS/MS vizsgálatokat is végezhetünk (115. ábra). A módszer képalkotási alkalmazása és további fejlesztése közeli terveink között szerepel.



114. ábra: *Helix* CNS közvetlen fsLAESI MS vizsgálatának reprezentatív tömegspektrumja.



115. ábra: CD-1 egér agyminta fsLAESI MS és MS/MS tömegspektrumjai. A kijelölt prekursorionok: m/z 1253,7, m/z 1284,5, m/z 1395,6, m/z 1731,5 és m/z 2378,5.

6. Legfontosabb eredményeim összefoglalása

Azt mondják, hogy gyermekeink a Z, de leginkább az alfa generáció tagjai olyan emberek, akik minden kérdésükre azonnal választ akarnak kapni, illetve minden válasza azonnali reakcióval visszajelzést adnak. Ilyen értelemben a lézer ablációs tömegspektrometria az analitikai kémia alfa generációs gyermeke. Ugyan életkorukat tekintve az LA módszerek akár 50-60 éves múlta tekintenek vissza, mégis a minták vizsgálata során szinte azonnal megadják a kérdéseinkre legalább azt a választ, hogy jó úton haladunk-e. A MALDI TOF MS alkalmazása során a felcsöpögtetett minta és mátrix kristályosodása után gyakorlatilag azonnal elének tárul a várva-várt tömegspektrum. A minimális mintaelőkészítési igény azonban rejt veszélyeket is a komplex összetételű biológiai és klinikai minták vizsgálata során. Munkánkban gyakran találkozhattunk nem megfelelő kristályszerkezettel, magas sókoncentrációval vagy erős ionszupressziós hatásokkal, amik rontják az érzékenységet és a spektrális minőséget. Mégis, ahogy azt egykoron Burger professzor úr tanította, egy analitikus számára, aki biológiai, klinikai mintákkal foglalkozik a legjobb mintaelőkészítés az, amikor nincs mintaelőkészítés. Ez sajnos csak nagyon ritkán valósítható meg, de azt leszögezhetjük, hogy a mintavétel és a minták feldolgozása során jelentős analitikai bizonytalanságot viszünk a rendszerbe.

Értekezésem a lézeres mintabevitelre épülő tömegspektrometria, ezen belül is elsősorban a MALDI TOF MS alkalmazási lehetőségeit tárja fel a biomolekulák vizsgálatában. Munkacsoportunkban különleges, hazánkban egyedülálló lehetőségünk a képalkotási tömegspektrometria használata, amely heterogén szöveti felépítésű minták molekuláris feltérképezésére kiváló eszköznek bizonyult.

A disszertációmban bemutatott kutatási eredmények 3 fő témakör köré rendeződnek. Munkám során új módszereket dolgoztam ki és optimalizáltam különböző biológiai és klinikai kérdések molekuláris megválaszolása érdekében. Az első tématerület a MALDI mostohagyerekének számító kismolekulás tömegspektrometriai vizsgálatok lehetőségeinek feltárása és a lehetőségek kiaknázása köré csoportosul. A második részben a bioaktív peptidok és proteinek vizsgálatának lézer ablációval történő analízisére fókuszálok. A módszerfejlesztések és analitikai eredményeink főként olyan együttműködési projektek tömegspektrometriás támogatásaként születtek meg, amelyek a PTE ÁOK kutatási portfóliójában meghatározó jelentőséggel bírtak/bírnak. Dolgozatomban ismertetett harmadik kutatási területemet, a lézer ablációs biomolekuláris tömegspektrometria, illetve a MALDI MS jelenleg talán legizgalmasabb és legdinamikusabban fejlődő irányzatának a képalkotási tömegspektrometriának szenteltem, mivel elkötelezetten hiszek abban, hogy az IMS által szolgáltatott szövet- és sejtspecifikus molekuláris eredmények meghatározóak lesznek a klinikai diagnosztika és az „omikák” jövőbeni fejlődésében.

Az összefoglalásban törekedtem arra, hogy kiemeljem a csoportban végzett biokémiai, orvosi biológiai kutatások során konkrétan általam elvégzett fejlesztéseket, bemutatott tudományos munkásságom eredményeit.

6.1. Kis molekulatömegű vegyületek MALDI TOF MS vizsgálata

A metabolomika előttünk álló évtizedeiben a kis molekulatömegű vegyületek (<800 Da) rendszerbiológiai szemléletű, univerzális, érzékeny, de kellően specifikus vizsgálata

nélkülözhetetlen tényező lesz. A komplex biológiai és klinikai minták közvetlen analizésére alkalmas *in-situ* deszorpciós és lézer ablációs tömegspektrometriás technikák újra hangsúlyt kaphatnak a jövőbeni state-of-the-art kutatásokban. Az alacsony molekulatömegű vegyületek MALDI vizsgálata nem egyszerű feladat, hiszen meg kell küzdenünk a mátrix okozta spektrális interferencia és a nem kívánt ionszupresszió kérdésével. A megfelelő mátrix vagy felület kiválasztása alapjaiban határozza meg a kapott végeredmény minőségét, értékelhetőségét. Munkám során hagyományosan használt (pl. CHCA, DHBA, SA, THAP) és fullerén (C₆₀, C₇₀) mátrixokat, illetve mátrixmentes ionizációt (LDI) is teszteltem kis molekulatömegű vegyületek lézer ablációs tömegspektrometriás vizsgálataira.

Elsőként dolgoztam ki eljárást a fullerének MALDI mátrixként történő alkalmazására összetett biológiai minták bioaktív komponenseinek vizsgálata érdekében. A fullerének, elsősorban a C₇₀ hatékony mátrixnak bizonyult kis molekulatömegű vegyületek MALDI TOF MS vizsgálatában. Toluolos oldatában vékony réteggként a mintatartóra szárítva, vagy „szendvics” technikában használva nem csupán az alacsony tömegtartományban tapasztalható mátrix interferenciát csökkenti, de szerves oldószerekben oldódó vegyületekkel elegyítve és a C₇₀/minta keveréket a mintatartóra cseppentve rendkívül hatékony MALDI mátrix apoláris vegyületek vizsgálatára.

A szteroidok tömegspektrometriás vizsgálata, korlátozott illékonyaságuk és ionizálhatóságuk miatt nem egyszerű analitikai feladat. Általában kémiai derivatizálószer alkalmazása szükséges a GC/LC MS analízisekhez, azonban a kémiai módosítás különösen biológiai mátrixban számos hibalehetőséggel terhelt. Ennek a problémának megoldására új, kémiai átalakítást nem igénylő kvalitatív analitikai módszert dolgoztam ki szteroid hormonok MALDI TOF MS vizsgálatára C₇₀ fullerén mátrixként történő alkalmazása segítségével. A módszerrel sikeresen detektáltam az öszttron, öszttradiol, öszttriol, progeszteron és tesztoszteron kvázimolekulaion csúcsait 38 és 74 pmol/spot koncentráció tartományban. Az új analitikai módszer alkalmazhatóságát változatos szerkezetű szintetikus szteránvázis vegyületeken és biológiai mintán (vizelet) is igazoltam. A C₇₀ fullerén mátrix jelenlétében elvégzett MALDI TOF/TOF MS vizsgálatok alkalmasak voltak a szintetizált szteroidvegyületek szerkezetének gyors, mintaelőkészítést nem igénylő vizsgálatára és igazolására. Az új, nagy mintaáteresztőképességű technika segítségével megállapítottam természetes vizeink (Duna, Velencei-tó, Balaton) hormonális szennyezettségét az ösztrogének és az androgének vonatkozásában. Kvalitatív eredményeimet LC MS kvantitatív vizsgálatokkal egészítettem ki, amelynek eredményei jól korreláltak más kutatócsoportok adataival.

Fitoösztrogének, polifenolok és antocianinok vizsgálata során elsőként igazoltam a *transz*-rezveratrol fotoizomerizációja során keletkező 3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén jelenlétét, amely a *cisz*-rezveratrol és a már ismert fenantrén származék mellett keletkezett. Megvizsgáltam a mátrixmentes lézerdeszorpciós ionizáció hatásait a vörösborsban található fenolos komponensek fragmentációjára. Az LDI módszer alkalmasnak bizonyult a *transz*-rezveratrol és glükozidjának (piceid) kimutatására, de erős fragmentációt mutatott a kvercetin, rutin, malvidin és malvidin-galaktozid esetében. A MALDI PSD TOF/TOF tömegspektrumok elemzése során meghatároztam a lehetséges

fragmentációs folyamatokat és azonosítottam a keletkezett fragmens ionokat. Tudomásom szerint a mi kutatócsoportunk végzett először ilyen jellegű lézer ablációs vizsgálatokat vörösbor polifenolok vizsgálatára. A mintatartón a magas lézerfluencia hatására bekövetkező szabályozatlan fragmentáció elkerülése érdekében megvizsgáltam a hagyományos (CHCA, SA, DHBA) és a C₇₀ fullerén mátrixok alkalmazásának lehetőségét. Szőlőhéj kivonatok analízise során a malvidin flavilium kationja minden mintában és minden mátrix esetén detektálható volt. A legjobb eredményeket a DHBA alkalmazása során kaptam. A C₇₀ fullerén mátrix segítségével az antocianinok aglikon formáinak kimutatása volt sikeres, és jól megfigyelhető volt a mátrix interferencia csökkenése az alacsony tömegtartományban. Eredményeim alapján a MALDI TOF MS főként a DHBA és a C₇₀ mátrixként történő alkalmazása segítségével alkalmas vörösborok és szőlőhéj kivonatok gyors, nagyátersztőképességű analízisére és ujjlenyomat azonosítására. A felsorolt mátrixokon kívül további vizsgálatokat végeztem a THAP mátrix használatával kapcsolatban. A szilárd fázisú extrakcióval tisztított borkivonatok vizsgálatára a MALDI TOF MS és a MALDI TOF/TOF MS vizsgálatok egyaránt hatékonyak bizonyultak. A THAP mátrix alkalmazása minimális spontán bomlást eredményezett, viszont a tandem MS vizsgálatoknál a PSD fragmentációt kellő mértékben támogatta. A MALDI vizsgálatok során 22 fenolos komponenst azonosítottunk, amelyek öt csoportba tartoztak úgy mint: antociánok, vitizin típusú antociánok, hidroxifenil-piranoantociánok, flavanil-piranoantociánok és acetaldehid-mediált flavol-antocián adduktok. A borextraktumok ujjlenyomat vizsgálata alapján megállapítottam, hogy mind évszázadok mind fajta alapján elkülöníthetők a vizsgált borok és az előállítási technológiának is fontos szerepe van a polifenol összetétel kialakulása szempontjából.

6.2. Bioaktív peptidek és proteinek MALDI vizsgálata

A peptidek és fehérjék MALDI TOF MS vizsgálatai során főként klinikai vonatkozású vagy klinikai potenciállal rendelkező mintákat vettem górcső alá.

Elsőként sikerült a PACAP (hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid) 38 és 27 aminosavból felépülő formáinak tömegspektrometriára épülő detektálását kidolgoznom. Munkám során elvégeztem a módszer optimalizálását, valamint felderítettem és kiküszöböltem a polipeptid speciális tulajdonságaiból (fiziológias stabilitás, adszorpciós képesség) eredő analitikai problémákat. A kvalitatív MALDI TOF MS eljárás segítségével számos klinikai és biológiai közegből mutattam ki elsőként a polipeptid jelenlétét. Tandem tömegspektrometriás vizsgálattal elvégeztem a PACAP-38 és PACAP-27 aminosavszekvenciájának azonosítását a mintaközegekben. Kimutattuk, hogy a PACAP-38 mennyisége szignifikánsan megemelkedik a csecsemőjüket szoptató nők vérében, valamint, hogy az anyatej PACAP koncentrációja mintegy 10-szer nagyobb a vérplazmában mért értéknél. Eredményeink a csecsemőkori táplálás fontosságára és a neuropeptid korai idegrendszeri fejlődésben betöltött szerepére utalnak. Kutatásaim során megvizsgáltam a PACAP fertilitásra, receptivitásra és meddőségre gyakorolt hatásait. Jelenlétét kimutattam a tüszőfolyadékban, de nem detektáltam méhnyakváladékban, magzatvízben, szeminális plazmában. A peptid jelenléte a tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek metabolizmusában betöltött szerepére utalhat. A PACAP nagy mennyiségben

jelenik meg a herékben azonban a szemínális plazmában nem volt kimutatható a jelenléte. Kísérletekkel bizonyítottam, hogy PACAP KO egérben a spermiumok motilitása csökken, ami szintetikus PACAP-38 hatására javítható volt.

Elsőként azonosítottam tömegspektrometriával (MALDI TOF MS és nanoDESI Orbitrap MS/MS) a PACAP-38 endogén jelenlétét humán és egér könnyben. Eredményeinket a szárazszem szindróma potenciális kezelésének kidolgozásában hasznosítottuk, ugyanis PACAP-38 tartalmú szemcsepp hatására a könny kiválasztás mértéke szignifikánsan növelhető volt a kísérleti állatokban. A neuropeptid tartalmú szemcsepp nem csupán a könnytermelődést stimulálta, de jelentősen visszaszorította a szindrómát kísérő patológiás elváltozásokat is. Eredményeink alapján a PACAP biokémiai hatásának valószínűsíthető mechanizmusa az AC/cAMP/PKA kaszkádon keresztül történik, amelynek aktiválásával serkenti az AQP5 transzlokációját a citoszolból a könnymirigy acinális sejtek membránjába, ami a könnyszekréció növekedését eredményezi. A PACAP jelenléte nem volt detektálható orrváladékban, nyálban és csarnokvízben. A PACAP-38 szérumban való jelenlétének igazolására elvégeztem a minták „on-plate” triptikus emésztését és a triptikus peptidek azonosítását MALDI TOF/TOF MS vizsgálatokkal. Éti csiga és nagy mocsári csiga hemolimfájának és központi idegrendszerének vizsgálata során PACAP-27 jelenlétét detektáltam. Vizsgálataim során elsőként mutattam ki PACAP-szerű peptid jelenlétét a *Lymnaea* idegrendszerében, illetve az AC/cAMP/PKA aktivációban és a hosszú távú memória kialakulásában való lehetséges szerepét a klasszikus kondicionálás során.

Fehérjeanalitikai vizsgálatokkal meghatároztam a PACAP génkiütött (KO) egerek fehérjekészletének expressziós változásait. Eredményeimből kiderült, hogy határozott különbség mutatható ki a vad és a PACAP KO egerek proteomikai jellemzői között. Vizsgálataink rávilágítottak a PACAP-hiányos egerek növekedett stresszhatásokkal szembeni sebezhetőségére és az öregedés fokozott mértékére. Eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP KO állatokban az ATP-szintáz szint emelkedése egy kompenzációs mechanizmus eredménye lehet, mely a sérült energia egyensúly kompenzálására szolgál stresszmentes körülmények között.

MALDI TOF MS vizsgálatokkal azonosítottam hibernációs, évszakfüggő ciklikusságot mutató neuropeptideket éti csiga idegrendszerében és hemolimfájában. Az agyi homogenátumban 79 peptidet azonosítottam, amelyek közül 11-et kizárólag vagy következetesen magasabb intenzitással detektáltam a hibernált állatokban. Ezenkívül 30 peptidcsúcsot mutattam ki a hibernált csigák hemolimfa mintáiból, ahol 13 vegyület csak a hibernált állatokban volt jelen. Az agyi homogenátumban egy új, aktivitásfüggő neuropeptidet azonosítottam, amelynek aminosavszekvenciája: GSGASGSGSMPATTS. A peptidet szignifikánsan magasabb koncentrációban figyeltem meg az aktív állatokban, ami arra utal, hogy a neuropeptid valószínűleg részt vesz az aktív állapot kialakulásában és fenntartásában.

Módszert dolgoztam ki fej-nyaki laphámkarcinóma során expresszáldó fehérjék, mint diagnosztikailag jelentős potenciális tumorbiomarkerek azonosítása és kimutatása érdekében. Kutatásaim során eljárást dolgoztam ki a nem stimulált nyálminták MALDI TOF/TOF MS vizsgálatára. A detektált fehérjék közül az annexin 1 és a peroxiredoxin-2 kivétel nélkül minden tumoros nyálmintában detektálható volt. A továbbiakban a

nyálminták tripszinnel történő emésztése után a két fehérje 1-1 diagnosztikus jellegű triptikus peptidjét (m/z 1605,96 és m/z 1734,86) detektáltam. A két peptid együttes jelenléte minden tumoros nyálmintában kimutatható volt míg az egészséges önkéntesek nyálmintáiból hiányzott.

A korai diagnosztikai lehetőségek feltárása érdekében vizsgálatokat végeztem diabetes melitusban szenvedő betegek nyálmintáin. Eredményeink azt mutatták, hogy minden diabéteszes beteg nyálmintájában találtunk laphámkarcinóma sejtek által expresszált fehérjéket, bár a betegeknek nem diagnosztizáltak malignitást vagy precancer állapotot. A megnövekedett annexin 1, peroxiredoxin-2 és tirozin-protein kináz jelenlétét mindegyik vizsgált diabéteszes beteg nyálmintájában azonosítottam. Eredményeink tükrében feltételezzük, hogy a diabetes melitus nem csupán egy precancerózus állapot, de valószínűsíthetően premalignus állapotnak tekinthető. Megállapítottuk továbbá, hogy azoknál a betegeknek, akik 5 vagy annál több éve szenvednek diabéteszben magasabb arányban fordul elő a peroxiredoxin-2 biomarker, mint azoknál, akik 5 évnél rövidebb ideje cukorbetegségben szenvednek.

Először mutattam ki a fej-nyaki laphámkarcinóma esetén detektálható megnövekedett peptidáz/poteáz aktivitást a betegek nyálmintáiban. Megfigyelésemre építve létrehoztam egy olyan célkészüléket, amely ca. 7-8 perc alatt képes a HNSCC kimutatására nyálmintákból. A készülék klinikai teljesítményvizsgálata jelenleg folyik 10000 fő bevonásával.

Elsőként azonosítottam 2000 éves oszteoszarkómás csontleletekből tumorbiomarker fehérjéket. Az oszteoszarkóma egy ritka előfordulású elsődleges csonttumor, amelyre korai halálozás jellemző. Vizsgálataim során az annexin A10 és a vimentin jelenléte igazolható volt a vizsgált csontmintákból.

Elsőként dolgoztam ki eljárást száj- és ajakhasadék során expresszáldó fehérjék (pl. dermokin, TGF β 3) kimutatása érdekében betegek nyálmintáiból. A vizsgálataim során kimutatott jelentős dermokin expresszió valószínűleg a hasadék során aktiválódó keratinocitáknak tulajdonítható.

6.3. Képzalkotási tömegspektrometria

Hazánkban én honosítottam meg a képzalkotási tömegspektrometria alkalmazását, amit jelenleg is tanszékünk zászlóshajójának tekintek. Munkacsoportunk viszonylag korán ca. 14 éve kapcsolódott be a MALDI IMS vizsgálatok kidolgozásába és fejlesztésébe. 2011-ben az EU által finanszírozott COST Imaging Mass Spectrometry paneljének indulásakor csatlakoztam a szervezethez. Többször voltam a témával tanulmányúton a Bruker Daltonics, a Waters és a Thermo Scientific megfelelő üzemegységeiben és demolaborjaiban. Munkacsoportomban kifejlesztettünk egy piezoelektromos mátrixdepozíciós berendezést, amely kiválóan alkalmas a szövetmetszetek mátrixszal való bevonására és a vegyületek felszíni extrakciójára. Alkalmazásával az igen jónak számító 10-20 mikronos térbeli felbontás rutinszerűen elérhető. A képzalkotási tömegspektrometriával kapcsolatban együttműködést kezdeményeztem Ingela Lanekoff professzorral (Uppsalla University), Prof. Ron Heeren-nel (Maastricht) és Vértés Ákos professzorral (George Washington University).

Munkám során elvégeztem a HNSCC szöveti heterogenitásának molekuláris leképezését MALDI TOF IMS segítségével. Eredményeim alapján az S100A8 és S100A9 fehérjék egyértelműen expresszálódtak a malignitást mutató neoplasztikus régióban, míg az egészséges szöveti struktúrákban nem voltak kimutathatók. A két fehérjét elsőként mutattam ki mint potenciális tumorbiomarkert epitheliális eredetű laphámkarcinóma esetében. Korábban több tanulmány és tankönyv is cáfolta a calgranulinok expresszióját epitheliális eredetű tumorok esetében. Vizsgálataim eredményét azóta több munkacsoport is megerősítette nyálminták vizsgálata által. Tömegspektrometriás eredményeinket statisztikai módszerekkel és immunhisztokémiával validáltam. Az S100 A8 és A9 fehérjék jelenléte kimutatható volt a mintában található hiperplasztikus epitheliumban, amely a tumorigenezis során egy korai, préccancer expressziót feltételez. Vizsgálataink kiterjedtek a HNSCC-ban megjelenő lipidek lokális eloszlásának és kvantitatív változásainak feltérképezésére, amelynek során több, mint 300 lipid molekulát azonosítottunk. Az egészséges szövetben az LPC (16:0) és az LPC (18:2) expresszálódott, míg specifikus tumor biomarkerként a PC (32:1) molekulát detektáltuk. A lipidek eloszlás-különbségeit statisztikailag igazoltuk, valamint a LPC-t bontó lizofoszfolipid lipáz A1 immunhisztokémiai vizsgálatával erősítettük meg eredményeinket. A lipid markerek klinikai alkalmazhatóságát preoperatív szövetbiopsziák vizsgálatával mutattuk be.

Jelölésmentes szemikvantitatív proteomikai vizsgálatokat végeztünk HNSCC-val diagnosztizált betegek FFPE szövetmetszeteinek felhasználásával. A minták vizsgálatával 1164 fehérjét azonosítottunk, amelyek közül 18 mutatott statisztikailag szignifikáns változást. Nyolc fehérje mutatott szignifikánsan nagyobb mennyiséget a neoplasztikus régióban, ezek a: tenascin, transmembrane emp24 domain-containing protein 2, cytoplasmatic dynein light chain 1, coactosin-like protein, small proline-rich protein 2D, nucleolin, U5 small nuclear RNP 200-kDa helicase és a fatty aldehyde dehydrogenase voltak. A desmoglein-1 és a keratin Type I cytoskeleton 9 mennyisége csökkent a tumorban.

Elsőként dolgoztam ki eljárást humán hereszövetek MALDI TOF IMS vizsgálatára annak érdekében, hogy a nem-obstruktív azoospermia leggyakoribb okának a Sertoli cell only szindrómának lipidomikai vonatkozásait megismerjük. Elégtelen és egészséges spermatogenezist mutató hereszövetek 15 mikronos metszeteit vizsgáltam a lipidek lokális eloszlásának meghatározása érdekében. Eredményeim alapján a szfingomielinek, foszfatidil-kolinok, glicerofoszfatidil-kolinok, plazmalogének és foszfatidil-etanolaminok lokális eloszlása és expressziós szintje jelentősen eltér az egészséges és SCOS hereszövetben. A legjelentősebb különbségek az SM (16:0) és PC (16:0, 20:4) lipidek eloszlásában mutatkozott. Az SM expressziója szignifikánsan magasabb volt az egészséges spermatogenezist mutató mintákban, míg a PC komponens az SCOS mintákban mutatott magasabb szintet. Egyértelmű kapcsolatot mutattam ki a SCOS súlyosságára vonatkozó Johnsen pontozási rendszer és a foszfolipidek lokális eloszlása között. Eredményeimre épülve a jövőben a szeménális plazmából történő lipidomikai analízis segítheti a hereszövetből történő műtéti spermiumnyerés sikerességét.

Elsőként dolgoztam ki eljárást az IVF-et kísérő korai embrionális fejlődés térbeli és időbeni változásainak molekuláris feltérképezése érdekében. A MALDI TOF IMS

elemzések során különböző embrionális korban lévő egérembriók foszfatidil-kolin változásait határoztam meg. Vizsgálataim megerősítették, hogy az embrionális implantáció során és az embriók fejlődésének korai szakaszában jelentős időbeni és térbeli változások mutathatók ki a foszfolipidek eloszlásában. Az is kijelenthető, hogy az IVF beavatkozás szignifikánsan megváltoztatja, átalakítja a foszfatidil-kolin lipidspecieszek lokális expresszióit. Vizsgálatomban a túlnyomórészt OA-t tartalmazó PC (34:1) és PC (36:1) magas intenzitást mutatott az uterus különböző részein a periimplantációs időszakban, mind normál, mind IVF terhességben. A PC (36:1)-et a mezometriális deciduában figyeltem meg IVF-terhesség alatt, de a normál terhességben szinte hiányzott. Ez a szembetűnő különbség az OA-tartalmú lipidek lehetséges szerepére utal a korai embrionális fejlődésben, és amelyek patobiokémiai szerepet játszhatnak az IVF korai embrionális fejlődésében. A többszörösen telítetlen zsírsav tartalmú PC-k mind térbeli, mind időbeni különbségeket mutattak a periimplantációs periódusban mindkét csoportban. Figyelemre méltó, hogy a legnagyobb eltérést a normál és az IVF csoport között az embrionális 8,5. napon figyeltük meg a PC (36:2), PC (36:4), PC (38:4) és PC (40:6) intenzitásában.

Új eljárást dolgoztam ki neuropeptidek sejtszintű lokális eloszlásának tömegspektrometriás vizsgálatára. Tanulmányunkban mutattuk be először a *Helix* CNS FMRFa lokális eloszlását ellenanyag használata nélkül. Képkalkotási tömegspektrometriás vizsgálataim során sejtszintű, néhány mikrométeres (ca. 5 μ m) térbeli felbontással térképeztük fel az m/z 599,37 (FMRFa) tartalmú neuronok eloszlását közvetlenül a CNS ganglionjaiban. Eredményeim szerint az FMRFa túlnyomórészt a CNS agyi ganglionok, a pedális ganglionok és a jobb oldali parietális ganglionok pro-, mezo- és postcerebrális régióiban található neuroncsoportokban lokalizálódott.

Elsőként végeztem el egy neuron feltöltését fluoreszcens festék és MALDI mátrix elegyével, annak érdekében, hogy a lézerfluencia a feltöltött sejtben összpontosulva ott lokális ablációt és ionizációt hozzon létre. A kifejlesztett módszer alkalmasnak bizonyult az FMRFa neuropeptid eloszlásának egysejt-szintű detektálására.

Lézer ablációs elektroporlasztásos ionizációra épülő ionmobilitási képkalkotási tömegspektrometria segítségével növényi levél és egér agymintákat elemeztünk annak érdekében, hogy bemutassuk a közeli m/z értékű komponensek elkülönítésének lehetőségeit. Az ionmobilitás, mint extrém gyors szeparációs technika alkalmasnak bizonyult a mintákban jelenlévő izobár vagy közel izobár tömegű metabolitok és lipidek szétválasztására, így azok lokalizációja külön-külön feltérképezhető volt. Eljárást dolgoztunk ki automatizált sejtfelismerésen alapuló pozicionálásra épülő sejtszintű képkalkotási LAESI vizsgálatra. Munkánk során *Allium cepa* epidermiszének pigment eloszlását határoztuk meg sejtről-sejtre.

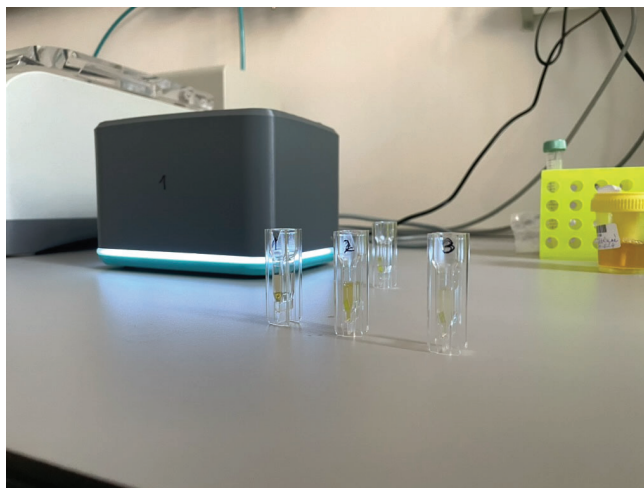
Elsőként építettem meg egy olyan fsLAESI MS/MS készüléket, amely alkalmas volt m/z 200 és m/z 3000 tartományon belül lipidek és peptidek vizsgálatára. A berendezés segítségével megvizsgáltam a *Helix pomatia* központi idegrendszerét, amelyben számos bioaktív vegyületet detektáltam. A tömegspektrometriás vizsgálatok során kísérletet tettem néhány komponens tandem tömegspektrometriás azonosítására.

7. Kutatási eredmények ipari, klinikai diagnosztikai hasznosítása

A két évtizedes kutatás-fejlesztés-innováció során számos ipari problémával szembesültem. Ebben a fejezetben a teljesség igénye nélkül felvázolom kutatási eredményeim piaci hasznosításának néhány példáját. Az itt felsorolt projektek mindegyikében ötletgazdaként és szakmai vezetőként vettem/veszek részt a megvalósításban.

2003-ban vettem fel a kapcsolatot a villányi borászatokkal annak érdekében, hogy a vörösborkban található polifenolokat és antocianinokat vizsgálatok tárgyává tegyük, később ezt a kört kiterjesztettük a szekszárdi, egri, tokaji és macedoniai borrhégiókra. A gyümölcsöző együttműködésből nem csupán tudományos közlemények születtek, de a Bock és Polgár Pincészetek eredményeinket marketing célra is felhasználták. Ennél jelentősebb innovációs eredmény a Gere és Bock Pincészetekben létrehozott szőlőmagőrlemények, amelyek kifejlesztése munkacsoportomban történt. 2016 és 2018 között egy GINOP pályázat keretében irányítottam a megnövelt biológiai hasznosulással rendelkező Bock szőlőmagőrlemény tabletta tervezését, létrehozását, élettani vizsgálatait és a gyártóüzem megvalósítását. A termékek jelenleg is a nemzetközi és hazai kereskedelmi forgalomban elérhetőek.

Nyálproteomikai vizsgálataimra alapozva, egy ipari GINOP pályázati forrásból támogatva kidolgoztam egy olyan célkészüléket, amely alkalmas fej-nyaki tumoros elváltozásokat detektálni ca. 1 cm³ nyálmintából (116. ábra). Az eljárás mintegy 7-8 percet vesz igénybe és szűrővizsgálatként szinte bármilyen körülmények között bárhol elvégezhető. A diagnosztikai módszer tesztelése 600 fő bevonásával kiváló eredményekkel lezajlott, jelenleg az NNGYK IVD engedélyeztetési eljárás és egy 10000 fős klinikai teljesítőképességi vizsgálat folyik a szűrővizsgálattal kapcsolatban. Az eljárás hazai és nemzetközi szabadalmakkal védett [XXXV, XXXVI, XXXVII].



116. ábra: Fej-nyaki tumoros állapotok kimutatására fejlesztett nyáldiagnosztikai készülék prototípusa.

mark.laszlo_314_25

A pécsi Rovitex Kft.-vel nyert GINOP pályázat keretében antibakteriális tulajdonságú lakástextileket fejlesztettem ki. A termékek kereskedelmi forgalomban kaphatók. Projektünk folytatásaként egy KFI támogatásból teljesen egyedülálló, levegőtisztításra és pollenmegkötésre alkalmas függönyt, illetve egyéb lakástextíliákat hozok létre.

A pécsi Karma kesztyűvel 2019-ben a COVID-19 pandémia idején létrehoztam egy antibakteriális bőrimpregnáló készítményt, amely segítségével megalkottam a világ első bizonyítottan biocid felületű bőrkesztyű családját, amely jelenleg is nemzetközi kereskedelemben kapható.

KFI pályázat keretében kidolgoztam egy olyan eljárást, amely alkalmas részecskék fizikai elkülönítésére és azok „omika-kompatibilis” mintaelőkészítésére akár „single cell” felbontásban. A találmány alkalmas flow-citométerrel, sejtszorterrel, folyadékkromatográfiával, tömegspektrometriával való közvetlen on-line kapcsolásra. Az eljárásra hazai és nemzetközi szabadalmi védettséggel rendelkezünk [XXXVIII, XXXIX, XL].

Ipari KFI pályázat keretében kifejlesztettem egy merőben új koncepción alapuló, állattenyésztésben alkalmazható embrionális tápoldatot, amely a sikeres terhesség kialakulásának arányát 20%-ról ca. 60%-ra emelte az IVF beavatkozások során. Ennek a projektnek folytatásaként, a korai fázisú embrionális fejlődéssel kapcsolatos molekuláris eredményeimre építve egy GINOP pályázat keretén belül embrionális tenyésztésre alkalmas automatizálható berendezést hozok létre, amely alkalmas a spermiumok és a petesejtek minőségi elemzésére és szelekciójára, a fertilizáció elvégzésére és a blasztociszta felnevelésére a beültetés előtt. Végül a 3 vagy 5 napos embriót a berendezés egy beültető kapillárisba fagyasztja és így tárolja el a felhasználásig.

8. Köszönetnyilvánítás

„Ha másoknál messzebbre láttam, az azért volt, mert óriások vállán álltam.”

Sir Isaac Newton

Az akadémiai doktori értekezés minden kutató életében egy fordulópont, amikor átgondolhatja az addigi eredményeit és kudarcait. Az ember szinte újra éli az egykori baráti beszélgetéseket, eszmecseréket, a kísérletek tervezésének izgalmait a várva-várt eredményeket. Két évtized alatt sok kolléga, mentor, tanítvány, együttműködő partner jött és ment, de egy közös van mindben, hogy nagyon hálás vagyok, hogy hosszabb-rövidebb ideig összesodort minket a sors és részesei lehettünk egymás életének.

Mindenekelőtt hálásan köszönöm feleségemnek és öt fiamnak a megértést és támogatást, hogy mindig alkalmazkodva a körülményekhez és elfogadva azokat segítették tudományos munkám és próbáltak otthon egyensúlyt és harmóniát teremteni.

Köszönöm édesanyámnak a támogatást és a hitet, amit belém vetett. Hálás vagyok tanáraimnak, egyetemi oktatóimnak (SZTE), barátaimnak. Köszönöm Dr. Marcsik Antónia fáradhatatlan támogatását és Pidl István barátságát.

Tudományos pályafutásom és szakmai eredményeim teljes egészében a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetéhez kötődnek, ahol Prof. Ohmacht Róbert és Prof. Sümegi Balázs teremtették meg számomra a lehetőséget és mindenben segítették, ösztönözték munkámat jó szóval és baráti kritikával egyaránt. Szeretném megköszönni a támogatást és bizalmat egykori és jelenlegi intézetvezetőimnek Prof. Tóth Gyulának és Prof. ifj. Gallyas Ferencnek.

Az egyetemen Prof. Bajnóczky István barátom, mentorom tette felejthetlenné az éjszakába nyúló közös munkát és közös operahallgatással lendített át a mélypontokon, soha nem feledem emlékét.

Hálás vagyok Dr. Vértes Ákos professzornak (The George Washington University) a LAESI vizsgálatokat érintő együttműködésért, és hogy megtisztelt azzal, hogy néhány hétre befogadott laboratóriumába és otthonába. Köszönöm Dr. Ingela Lanekoff professzor támogatását a nanoDESI mérésekben, szakmai segítségére mindig számíthattam.

Hálás vagyok azért, hogy Prof. Felinger Attila, Prof. Galbács Gábor, , Dr. Lelik László, Prof. Vékey Károly és Prof. Záray Gyula szabadidejüket feláldozva átnézték és véleményezték disszertációm első munkaverzióját. Szeretném megköszönni hasznos szakmai tanácsaikat és önzetlen segítségüket.

Köszönöm egykori és jelenlegi szakdolgozó, TDK és PhD hallgatóimnak a közös munkát a sok-sok segítséget és az örömteli pillanatokat. Hálás vagyok Dr. Avar Péternek, Dr. Bánkuti Stefániának, Dr. Bóna Ágnesnek, Dr. Brubel Rékának, Dr. Burián Andrásnak, Gitta Stefániának, Dr. Jancsik Veronikának, Dr. Járai Tamásnak, Dr. Maász Gábornak, Dr. Pápai Zoltánnak, Dr. Patonai Zoltánnak, Dr. Pusztai Viktóriának, Réti Máténak és Dr. Sulc Alexandrának.

Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet összes dolgozójának. Köszönöm munkacsoportom és tanszékem összes tagjának az inspiráló légkört és a szakmai támogatást. Különösen hálás vagyok Dr. Bognár Zitának, Dr. Hocsák

mark.laszlo_314_25

Enikőnek, Horváth Anitának, Schmidt Jánosnak, Dr. Szabó Évának, Dr. Szabó Zoltánnak, Szilágyi Gábornak, Dr. Takátsy Anikónak és Dr. Veres Balázsnak.

Köszönöm Prof. Reglődi Dórának és Prof. Helyes Zsuzsannának, Dr. Tamás Andreának, Dr. Pirger Zsoltnak, László Zitának, Zrínyi Zitának, Prof. Kilár Ferencnek, Dr. Kilár Anikónak, Dr. Dörnyei Ágnesnek, Dr. Turiák Lillának, Dr. Lukács Andrásnak, Prof. Nyitrai Miklósnak, Prof. Janáky Tamásnak és Prof. Wölfling Jánosnak a szakmai együttműködést és a közös élményeket. Hálás vagyok a Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium dolgozóinak, elsősorban Bencsik Péter Ildikónak, Prof. Bódis Józsefnek, Prof. Kovács L. Gábornak és az andrológiai team tagjainak: Dr. Balló Andrásnak, Dr. Czétány Péternek, Dr. Máté Gábornak és Dr. Szántó Árpád igazgató úrnak.

Hálás vagyok a betegeknek, akik hozzájárultak ahhoz, hogy mintájukat tudományos vizsgálatok céljaira használjuk fel. Köszönettel tartozok minden olyan elméleti és klinikai intézetben dolgozónak, aki hozzájárult a mintagyűjtés, szállítás, tárolás megszervezéséhez és megvalósításához.

Köszönetet mondok mindazoknak a név szerint most nem említett hazai és külföldi kollégáknak, akikkel együtt dolgozhattam, együtt gondolkodhattam és hozzájárultak eredményeinkhez.

Végül, de nem utolsó sorban nem születhettek volna meg eredményeink az ipari partnerek és a pályázati támogatások nélkül, ezúton is hálásan köszönöm a bizalmat és a támogatást.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

(*első vagy utolsó szerzőként)

9.1.1. Közlemények referált szakfolyóiratokban

- [I] Montskó G, Pour Nikfardjam MS, Szabó Z, Böddi K, Lóránd T, Ohmacht R, **Márk L***: Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS, *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* 196:44-50. (2008)
- [II] Montsko G, Vaczy A, Maasz G, Mernyak E, Frank E, Bay C, Kadar Z, Ohmacht R, Wolfling J, **Mark L***: Analysis of nonderivatized steroids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using C70 fullerene as matrix, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:869-874. (2009)
- [III] Börzsei R, **Márk L***, Tamás A, Bagoly T, Bay Cs, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Nemeth J, Szauer E, Helyes Z, Reglodi D: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk, *European Journal of Endocrinology* 160:561-565. (2009)
- [IV] Pirger Z, Lubics A, Reglodi D, Laszlo Z, **Mark L**, Kiss T: Mass spectrometric analysis of activity-dependent changes of neuropeptide profile in the snail, *Helix pomatia*, *Neuropeptides* 44:475-483. (2010)
- [V] Horváth G, **Márk L**, Brubel R, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Z, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D: Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro, *Neuroscience Letters* 469:70-74. (2010)
- [VI] Pirger Z, Kiss T, László Z, G-Tóth L, Váczy A, **Márk L***: Modern tömegspektrometriai módszerek (MALDI TOF és LC-ESI MS) alkalmazása a vizek hormontartalmának kimutatására, *Hidrológiai Közlöny* 90:117-119. (2010)
- [VII] Pirger Z, Laszlo Z, Hiripi L, Hernadi L, Toth G, Lubics A, Reglodi D, Kemenes G, **Mark L***: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors are present and biochemically active in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, *Journal of Molecular Neuroscience* 42:464-471. (2010)
- [VIII] Brubel R, Reglodi D, Jambor E, Koppan M, Varnagy A, Biro Z, Kiss P, Gaal V, Matkovits A, Farkas J, Lubics A, Bodis J, Bay C, Veszpremi B, Tamas A, Nemeth J, **Mark L***: Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 46:189-194. (2011)

- [IX] Ivanova V, Dörnyei Á, Stefova M, Stafilov T, Vojnoski B, Kilár F, **Márk L***: Rapid MALDI-TOF-MS detection of anthocyanins in wine and grape using different matrices, *Food Analytical Methods* 4:108-115. (2011)
- [X] **Mark L***, Maasz G, Pirger Z: High resolution spatial distribution of neuropeptides by MALDI imaging mass spectrometry in the terrestrial snail, *Helix pomatia*, *Acta Biologica Hungarica* (1983-2018) 63:113-122. (2012)
- [XI] Szántó I, **Márk L**, Bóna Á, Maász G, Sándor B, Gelencsér G, Turi Zs, Gallyas F: High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: A pilot study, *Technology in Cancer Research & Treatment* 11:181-188. (2012)
- [XII] Járαι T, Maász G, Burián A, Bóna Á, Jámbor É, Gerlinger I, **Márk L***: Mass spectrometry-based salivary proteomics for discovery of head and neck squamous cell carcinoma, *Pathology and Oncology Research* 18:623-628. (2012)
- [XIII] Szabo GT, Tihanyi R, Csulak F, Jambor E, Bona A, Szabo G, **Mark L***: Comparative salivary proteomics of cleft palate patients, *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 49:519-523. (2012)
- [XIV] Jancsik VA, **Mark L**, Gelencser G, Olasz L: Nyálból izolált szájüregi laphámkarcinóma biomarkerek vizsgálata 2-es típusú diabéteszes betegekben, *Fogorvosi Szemle* 106:109-115. (2013)
- [XV] Maasz G, Pirger Z, Reglodi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyak A, Hashimoto H, Avar P, Jambor E, Tamas A, Gaszner B, **Mark L***: Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis, *Journal of Molecular Neuroscience* 54:310-319. (2014)
- [XVI] Bóna Á, Pápai Z, Maász G, Tóth GA, Jámbor É, Schmidt J, Tóth C, Farkas C, **Márk L***: Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma, *PLOS ONE* 9:e87215. (2014)
- [XVII] Petropulos IV, Dörnyei Á, Stefova M, Stafilov T, Vojnoski B, **Márk L**, Hermosín-Gutiérrez I, Kilár F: Application of a novel small-scale sample cleanup procedure prior to MALDI-TOF-MS for rapid pigment fingerprinting of red wines, *Food Analytical Methods* 7:820-827. (2014)
- [XVIII] Jancsik V, Gelencsér G, Maász G, Schmidt J, Molnár G, Wittmann I, Olasz L, **Márk L***: Salivary proteomic analysis of diabetic patients for possible oral squamous cell carcinoma biomarkers, *Pathology and Oncology Research* 20:591-595. (2014)
- [XIX] Li H, Smith BK, **Márk L**, Nemes P, Nazarian J, Vertes A: Ambient molecular imaging by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation, *International Journal of Mass Spectrometry* 377:681-689. (2015)
- [XX] Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, **Mark L**, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S:

PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion, *Nature Communications* 7: 12034-12047. (2016)

- [XXI] Maasz G, Schmidt J, Avar P, **Mark L***: Automated SPE and nanoLC–MS analysis of somatostatin, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 40:400-406. (2017)
- [XXII] Schmidt J, Kajtár B, Juhász K, Péter M, Járαι T, Burián A, Kereskai L, Gerlinger I, Tornóczky T, Balogh G, Vigh L, **Márk L***, Balogi Z: Lipid and protein tumor markers for head and neck squamous cell carcinoma identified by imaging mass spectrometry, *Oncotarget* 11:2702-2717. (2020)
- [XXIII] Burian A, Lujber L, Gerlinger I, Jarai T, Orosz E, Turiak L, Acs A, Hegedus Z, Konigne Peter A, Tornoczky T, Gombos K, **Mark L***: Label-free semiquantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics analysis of laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinoma on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples - a pilot study, *Pathology and Oncology Research* 26:2801-2807. (2020)
- [XXIV] Sulc A, Czétány P, Máté G, Balló A, Semjén D, Szántó Á, **Márk L***: MALDI imaging mass spectrometry reveals lipid alterations in physiological and Sertoli cell-only syndrome human testicular tissue sections, *International Journal of Molecular Sciences* 25:8358-8369. (2024)
- [XXV] Gitta S, Szabó É, Sulc A, Czétány P, Máté G, Balló A, Csabai T, Szántó Á, **Márk L***: Investigation of phosphatidylcholine by MALDI imaging mass spectrometry in normal and IVF early-stage embryos, *International Journal of Molecular Sciences* 25:7423-7434. (2024)

9.1.2. Összefoglaló művek

- [XXVI] Czétány P, Gitta S, Balló A, Sulc A, Máté G, Szántó Á, **Márk L***: Application of mass spectrometry imaging in uro-oncology: discovering potential biomarkers, *Life-Basel* 12:366-376. (2022)
- [XXVII] Gitta S, **Márk L**, Szentpéteri JL, Szabó É: Lipid changes in the peri-implantation period with mass spectrometry imaging: a systematic review, *Life* 13:169. (2023)

9.1.3. Az értekezés témájához kapcsolódó könyvfejezetek

- [XXVIII] Talián CG, **Márk L**, Melegh B: Tömegspektrometria, In: Debreczeni, L; Kovacs, GL (szerk.) Gyakorlati laboratóriumi medicina, Budapest, Magyarország: Literatura Medica Kiadó Kft. 477-492. (2008)
- [XXIX] **Márk L***: A proteomika kutatási eredményei a jelen és a jövő klinikai laboratóriumában, In: Ludány A (szerk.) A fehérjekutatás modern módszertana, Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó 361-364. (2008)

- [XXX] **Márk L***: Tömegspektrometria, In: Ludány, Andrea (szerk.) A fehérjekutatás modern módszertana, Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó 175-187. (2011)
- [XXXI] Li H, Smith BK, Shrestha B, **Mark L**, Vertes A: Automated cell-by-cell tissue imaging and single-cell analysis for targeted morphologies by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry, In: He, L (szerk.) Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules, New York, Amerikai Egyesült Államok: Springer Science+Business Media 117-127. (2015)
- [XXXII] **Márk L***: Lézerdeszorpciós tömegspektrometria, In: Csősz É (szerk.) Bevezetés a proteomikába: a fehérjék korszerű vizsgálata, Budapest, Magyarország: Semmelweis Egyetem 150-157. (2023)

9.1.4. Az értekezésben szereplő szabadalmak, mintaoltalmak

- [XXXIII] Pirger Z, Kiss T, **Mark L**: Activity-dependent peptide: Version: B3EWK7.1 GI:395406806, B3EWK7, Ügyszám: GI:395406806
- [XXXIV] **Mark L**, Schmidt J, Maasz G: Moduláris, automatizált mintaelőkészítő berendezés, HU201300147-A1
- [XXXV] **Márk L**: In vitro eljárás rosszindulatú állapotok diagnosztizálására, HU1800440A2
- [XXXVI] **Márk L**: Simple, non-invasive method for diagnosing oral cancer, WO2020128546A1
- [XXXVII] **Márk L**: In vitro method for the diagnosis of malignant conditions, EP3671213A1
- [XXXVIII] **Márk L**: Appareil et procede de separation de particules, EP4394350A1/fr
- [XXXIX] **Márk L**: Vorrichtung und verfahren zur trennung von partikeln, EP4394350A1/de
- [XL] **Márk L**: Apparatus and method for separating particles, EP4394350A1/en

9.2. Az értekezésben nem, vagy nem részletesen tárgyalt, a témához szorosabban kapcsolódó egyéb saját közlemények

- [XLI] Braun T, Rausch H, Biró PL, Zsoldos É, Ohmacht R, **Márk L***: The survivability of polycrystalline C60 to high speed vibration milling, *Chemical Physics Letters* 375:522-524. (2003)
- [XLII] **Mark L***, Nikfardjam MSP, Avar P, Ohmacht R: A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines, *Journal of Chromatographic Science* 43:445-449. (2005)
- [XLIII] Nikfardjam MSP, **Márk L**, Avar P, Figler M, Ohmacht R: Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region *Food Chemistry* 98:453-462. (2006)
- [XLIV] Avar P, Nikfardjam MSP, Kunsági-Máté S, Montskó G, Szabó Z, Böddi K, Ohmacht R, **Márk L***: Investigation of phenolic components of Hungarian wines, *International Journal of Molecular Sciences* 8:1028-1038. (2007)
- [XLV] Braun T, **Márk L**, Ohmacht, R, Sharma U: Olive oil as a biocompatible solvent for pristine C₆₀, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* 15:311–314. (2007)
- [XLVI] Helyes Z, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, **Márk L**, Reglődi D: Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat, *Peptides* 28:1847-1855. (2007)
- [XLVII] Hernádi L, Pirger Z, Kiss T, Németh J, **Márk L**, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Tóth G, Shioda S, Reglodi D: The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor in the snail *Helix pomatia*, *Neuroscience* 155:387-402. (2008)
- [XLVIII] Gaál V, **Márk L**, Kiss P, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Toth G, Reglodi D: Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins, *Journal of Molecular Neuroscience* 36:321-329. (2008)
- [XLIX] Wölfling J, Mernyák E, Bikádi Z, Hazai E, **Márk L**, Schneider G: Steroidal δ -alkenyl oximes as ambident nucleophiles: electrophile-induced formation of oxazepane derivatives in the bis-estrone series, *Letters in Organic Chemistry* 5:17-21. (2008)
- [L] Mernyak E, Kozma E, Hetenyi A, **Mark L**, Schneider G, Wolfling J: Stereoselective synthesis of spiro and condensed pyrazolines of steroidal α,β -unsaturated ketones and nitrilimines by 1,3-dipolar cycloaddition, *Steroids* 74:520-525. (2009)
- [LI] Mernyak E, **Mark L**, Frank E, Schneider G, Wolfling J: Electrophile-induced generation of cyclic azomethine imines from steroidal δ -alkenyl hydrazones, *Steroids* 74:474-482. (2009)
- [LII] Palfi A, Bartha E, Copf L, **Mark L**, Gallyas F, Veres B, Kalman E, Pajor L, Toth K, Ohmacht R, Sumegi B: Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C α/β II, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20:418-425. (2009)

- [LIII] Rabai M, Toth A, Kenyeres P, **Mark L**, Marton Z, Juricskay I, Toth K, Czopf L: In vitro hemorheological effects of red wine and alcohol-free red wine extract, *Clinical hemorheology and microcirculation* 44:227-236. (2010)
- [LIV] Ivanova V, Stefova M, Vojnoski B, Dörnyei Á, **Márk L**, Dimovska V, Stafilov T, Kilár F: Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening, *Food Research International* 44:2851-2860. (2011)
- [LV] Brubel R, Horvath G, Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Kiss P, Laszlo E, Nemeth J, **Mark L**, Szakaly P: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney, *Transplantation Proceedings* 43:1297-1299. (2011)
- [LVI] Brubel R, Kiss P, Vincze A, Varga A, Varnagy, A, Bodis J, **Mark L**, Jambor E, Maasz G, Hahimoto H, Helyes Z, Toth G, Tamas A, Koppan M, Reglodi D: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm motility, *Journal of Molecular Neuroscience* 48: 623-630. (2012)
- [LVII] Koppan M, Várnagy Á, Reglődi D, Brubel R, Németh J, Tamás A, **Márk L**, Bódis J: Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment, *Journal of Molecular Neuroscience* 48:617-622. (2012)
- [LVIII] Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Németh J, **Márk L**, Brubel R, Reglődi D, Párdutz Á, Szolcsányi J, Vécsei L, Tajti J: Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system, *Peptides* 33:307-316. (2012)
- [LIX] Mernyak E, Huber J, Szabo J, Schneider G, Hetenyi A, **Mark L**, Maasz G, Berenyi A, Kovacs I, Minorics R, Zupkó I, Wölfling J: Cycloaddition of steroidal cyclic nitrones to C=N dipolarophiles: stereoselective synthesis and antiproliferative effects of oxadiazolidinones in the estrone series, *Steroids* 78:1021-1028. (2013)
- [LX] Csanaky K, Reglődi D, Bánki E, Tarcai I, **Márk L**, Helyes Z, Ertl T, Gyarmati J, Horváth K, Sántik L, Tamás A: Examination of PACAP38-like immunoreactivity in different milk and infant formula samples, *Acta Physiologica Hungarica* 100:28-36. (2013)
- [LXI] Lutz Z, Orban K, Bona A, **Mark L**, Maasz G, Prokai L, Seress L, Lorand T: Mannich ketones as possible antimycobacterial agents, *Archiv der Pharmazie* 350: e1700102. (2017)
- [LXII] Turiak L, Kaszás B, Katona K, Lacza Á, **Márk L**, Vékey K, Drahos L, Tornóczy T: Localized amyloidosis of the upper aerodigestive tract : complex analysis of the cellular infiltrate and the amyloid mass, *Analytical Cellular Pathology* 2019: 6165140. (2019)

9.3. Felhasznált irodalom

- [1] Galbács G: Lézer és plazma alapú analitikai atomspektrometriai módszerek fejlesztése. *MTA Doktori értekezés* (2012)
- [2] Vertes A, Juhasz P, Matus L: Peak shape determination in laser microprobe mass analysis. *International Journal of Mass Spectrometry and ion processes* 73:109-125. (1986)
- [3] Chichkov BN, Momma C, Nolte S, Von Alvensleben F, Tünnermann A: Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A* 63: 109-115. (1996)
- [4] Günther D, Horn I, Hattendorf B: Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 368, 4-14. (2000)
- [5] Russo RE, Mao XL, Liu H, Gonzalez JJ, Mao SS: Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta* 57: 425-451 (2002)
- [6] Russo RE, Mao XL, Yoo J, Gonzalez JJ: Laser ablation. In: Singh JP, Thakur SN (eds) *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (Second Edition)*. Elsevier, 41-70. (2007)
- [7] Phipps CR: *A lézeres abláció és alkalmazásai*. Springer (2007)
- [8] Miller JC: *Laser ablation: principles and applications*. Springer Science & Business Media (2013)
- [9] Russo RE, Mao X., Gonzalez J.J., Zorba V., Yoo J: Laser ablation in analytical chemistry. *Analytical Chemistry* 85:6162-6177. (2013)
- [10] Harilal SS, Freeman JR, Diwakar PK, Hassanein A: Femtosecond laser ablation: fundamentals and applications In: Musazzi S, Perini U (eds) *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. Springer Series in Optical Sciences, vol 182. Springer, Berlin, Heidelberg. (2014)
- [11] Inogamov NA, Petrov YV, Khokhlov VA, Zhakhovskii VV Laser ablation: physical concepts and applications. *High Temperature* 58: 632-646. (2020)
- [12] Georgiou S, Koubenakis A: Laser-induced material ejection from model molecular solids and liquids: mechanisms, implications, and applications. *Chemical Reviews* 103:349-394. (2003)
- [13] Vertes A: Laser desorption of large molecules: mechanisms and models, In: Standing KG, Ens W: (eds) *Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules*. Springer New York 275-286. (1991)
- [14] Vertes A, Irinyi G, Gijbels R: Hydrodynamic model of matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 65:2389-2393. (1993)
- [15] Zhigilei LV, Kodali PB, Garrison BJ: A microscopic view of laser ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* 102:2845-2853. (1998)
- [16] Nemes P, Vertes A: Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79:8098-8106. (2007)

- [17] Nemes P, Barton AA, Li Y, Vertes A: Ambient molecular imaging and depth profiling of live tissue by infrared laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80:4574-4582. (2008)
- [18] Nemes P, Barton AA, Vertes A: Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 81:6668-6675. (2009)
- [19] Judge EJ, Brady JJ, Dalton D, Levis RJ: Analysis of pharmaceutical compounds from glass, fabric, steel, and wood surfaces at atmospheric pressure using spatially resolved, nonresonant femtosecond laser vaporization electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 82:3231-3238. (2010)
- [20] Galhena AS, Harris GA, Nyadong L, Murray KK, Fernandez FM: Small molecule ambient mass spectrometry imaging by infrared laser ablation metastable-induced chemical ionization. *Analytical Chemistry* 82:2178-2181. (2010)
- [21] Shelley JT, Ray SJ, Hieftje GM: Laser ablation coupled to a flowing atmospheric pressure afterglow for ambient mass spectral imaging. *Analytical Chemistry* 80:8308-8313. (2008)
- [22] Sampson, JS, Hawkrige, AM, Muddiman, DC: Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17: 1712-1716. (2006)
- [23] Vastola FJ, Given P H, Dutcher RR, Pirone AJ: (1970). A laser-micropyrolysis system for the study of organic sediments and inclusions. In: Hobson GD, Speers GC (eds) *Advances in organic geochemistry* 427. (1970)
- [24] Mumma RO, Vastola FJ: Analysis of organic salts by laser ionization mass spectrometry. Sulfonates, sulfates and thiosulfates. *Journal of Mass Spectrometry* 6:1373-1376. (1972)
- [25] Hillenkamp F, Unsöld E, Kaufmann R, Nitsche R: Laser microprobe mass analysis of organic materials. *Nature* 256:119-120. (1975)
- [26] Posthumus MA, Kistemaker PG, Meuzelaar HLC, Ten Noever de Brauw M C: Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Analytical chemistry* 50:985-991. (1978)
- [27] Stoll R, Röllgen FW: Laser desorption mass spectrometry of thermally labile compounds using a continuous wave CO₂ laser. *Organic Mass Spectrometry*, 14: 642-645. (1979)
- [28] Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F: Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* 57:2935-2939. (1985)
- [29] Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F: Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78:53-68. (1987)

- [30] Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2299-2301. (1988)
- [31] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2:151-153. (1988)
- [32] Hakansson P, Kamensky I, Sundqvist B, Fohlmann J, Peterson P, McNeal CJ, Macfarlane RD: Iodine-127-plasma desorption mass spectrometry of insulin. *Journal of American Chemical Society* 104:2948-2949. (1982)
- [33] Sundqvist B, Kamensky I, Hakansson P, Kjellberg J, Salehpour M, Widdiyasekera S, Fohlmann J, Peterson PA, Roepstorff P: Californium-252 plasma desorption time of flight mass spectroscopy of proteins. *Biomedical Mass Spectrometry* 11:242-257. (1984)
- [34] Barber M, Green BN: The analysis of small proteins in the molecular weight range 10–24 kDa by magnetic sector mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1:80-83. (1987)
- [35] Karas M, Bahr U: Laser desorption ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Trends in Analytical Chemistry* 9: 321-325. (1990)
- [36] Dreisewerd K: The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews* 103:395-425. (2003)
- [37] Georgiou S, Hillenkamp F: Introduction: Laser ablation of molecular substrates. *Chemical Reviews* 103:317-319. (2003)
- [38] Zhigilei LV, Leveugle E, Garrison BJ, Yingling YG, Zeifman MI: Computer simulations of laser ablation of molecular substrates. *Chemical Reviews* 103:321-347. (2003)
- [39] Karas M, Krüger R: Ion Formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews* 103:427-439. (2003)
- [40] Knochenmuss R, Zenobi R: MALDI Ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews* 103:441-452. (2003)
- [41] Vertes A, Juhasz P, Jani P, Czitrovszky A: Kinetic energy distribution of ions generated by laser ionization sources. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 83:45-70. (1988)
- [42] Vertes A, Juhasz P, Dewolf M, Gijbels R: The role of energy deposition processes in the understanding of laser microprobe analysis mechanisms. *Scanning Microscopy* 2:1853-1877. (1988)
- [43] Vertes A, Juhasz P, Dewolf M, Gijbels R: Hydrodynamic modelling of laser plasma ionization processes. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 94:63-85. (1989)
- [44] Vertes A, Dewolf M, Juhasz P, Gijbels R: Threshold conditions of plasma ignition in laser ionization mass-spectrometry of solids. *Analytical Chemistry* 61:1029-1035. (1989)

- [45] Vertes A, Juhasz P, Gijbels R: Ion-molecule reaction-rates in laser generated plumes. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 334:682-682. (1989)
- [46] Vertes A, Levine RD: Sublimation versus fragmentation in matrix-assisted laser desorption. *Chemical Physics Letters* 171:284-290. (1990)
- [47] Vertes A, Balazs L, Gijbels R: Matrix-assisted laser desorption of peptides in transmission geometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4:263-266. (1990)
- [48] Vertes A, Gijbels R, Levine RD: Homogeneous bottleneck model of matrix-assisted ultraviolet laser desorption of large molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4:283-233. (1990)
- [49] Ingendoh A, Karas M, Hillenkamp F, Giessmann U: Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 131:345-354. (1994)
- [50] Dreisewerd K, Schürenberg M, Karas M, Hillenkamp F: Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 141: 127-148. (1995)
- [51] Zhou J, Ens W, Standing KG, Verentchikov A: Kinetic energy measurements of molecular ions ejected into an electric field by matrix-assisted laser desorption. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6:671-678. (1992)
- [52] Juhasz P, Vestal ML, Martin SA: On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8:209-217. (1997)
- [53] Glückmann M, Karas M: The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry* 34:467-477. (1999)
- [54] Luo G, Chen Y, Siuzdak G, VertesA: Surface modification and laser pulse length effects on internal energy transfer in DIOS. *Journal of Physical Chemistry B* 109:24450-24456. (2005)
- [55] Go EP, Apon JV, Luo GH, Saghatelian A, Daniels RH, Sahi V, Dubrow R, Cravatt BF, Vertes A, Siuzdak G: Desorption/ionization on silicon nanowires. *Analytical Chemistry* 77:1641-1646. (2005)
- [56] Morris NJ, Anderson H, Thibeault V, Vertes A, PowellaMJ, TRazunguzwaa TT: Laser desorption ionization (LDI) silicon nanopost array chips fabricated using deep UV projection lithography and deep reactive ion etching. *Royal Chemical Society Advances* 5:72051-72057. (2015)
- [57] Shen, TL, Allison J: Interpretation of matrix-assisted laser desorption/ionization postsource decay spectra of charge-derivatized peptides: some examples of tris [(2, 4, 6-trimethoxyphenyl) phosphonium]-tagged proteolytic digestion products of phosphoenolpyruvate

- carboxykinase. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11:145-152. (2000)
- [58] Asara, J M, Allison J: Enhanced detection of oligonucleotides in UV MALDI MS using the tetraamine spermine as a matrix additive. *Analytical Chemistry* 71:2866-2870. (1999)
- [59] Asara, JM, Allison J: Enhanced detection of phosphopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10:35-44. (1999)
- [60] Calba PJ, Muller JF, Inouye M: H-atom transfer following analyte photoionization in matrix-assisted laser desorption/ionization processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12:1727-1731. (1998)
- [61] Stöckigt D: The Mechanism of the Gas-Phase Ion–Molecule Reaction between Al^+ and Ethanol. *Journal of Physical Chemistry A*, 102:10493–10500. (1998)
- [62] Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai S, Yazaki Y, Suzuki T: Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 58:883-896.(2020)
- [63] Colby SM, King TB, Reilly JP, Lubman DM: Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8:865. (1994)
- [64] Darie-Ion L, Whitham D, Jayathirtha M, Rai Y, Neagu AN, Darie CC, Petre BA: Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research. *Molecules* 27:6196-6219. (2022)
- [65] Wang J, Zhao J, Nie S, Xie M, Li S: MALDI mass spectrometry in food carbohydrates analysis: a review of recent researches. *Food Chemistry* 399:133968-133979. (2023)
- [66] Moore JL, Charkoftaki G: A Guide to MALDI Imaging Mass Spectrometry for Tissues. *Journal of Proteome Research* 22:3401-3417. (2023)
- [67] de Almeida CM, Dos Santos NA, Lacerda V Jr, Ma X, Fernández FM, Romão W: Applications of MALDI mass spectrometry in forensic science. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 416:5255-5280. (2024)
- [68] Song D, Dong K, Liu S, Fu S, Zhao F, Man C, Jiang Y, Zhao K, Qu B, Yang X: Research advances in detection of food adulteration and application of MALDI-TOF MS: A review. *Food Chemistry* 456:140070-140083. (2024)
- [69] Williams JD, Pu F, Sawicki JW, Elsen NL: Ultra-high-throughput mass spectrometry in drug discovery: fundamentals and recent advances. *Expert Opinion on Drug Discovery* 19:291-301. (2024)
- [70] Moore JL, Charkoftaki G: A Guide to MALDI imaging mass spectrometry for tissues. *Proteome Research* 22:3401–3417. (2023)

- [71] Castaing R, Slodzian G: Microanalyse par émission ionique secondaire. *Journal of Microscopie* 1:395-410. (1962)
- [72] Galle P: Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d'émission ionique secondaire. *Annales de Physique Biologique et Medicale* 42:83-94. (1970)
- [73] Caprioli RM, Farmer TB, Gile J: Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* 69:4751-60. (1997)
- [74] Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli RM: Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 76:1145-1155. (2004)
- [75] Walch A, Rauser S, Deininger SO, Höfler H: MALDI Imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochemistry and Cell Biology* 130:421-434. (2008)
- [76] Nemes P, Vertes A: Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79:8098-8106. (2007)
- [77] Nemes P, Barton A, Li Y, Vertes A: Ambient molecular imaging and depth profiling of live tissue by infrared laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80:4575-4582. (2008)
- [78] Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, Ifa DR: Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrometry Reviews* 32(3):218-243. (2013)
- [79] Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *International Journal of Molecular Science* 11:5040-5055. (2010)
- [80] Schnackenberg LK, Thorn DA, Barnette D, Jones EE: MALDI imaging mass spectrometry: an emerging tool in neurology. *Metabolic Brain Disease* 37:105-121. (2022)
- [81] de Almeida CM, Dos Santos NA, Lacerda V Jr, Ma X, Fernández FM, Romão W: Applications of MALDI mass spectrometry in forensic science. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 416:5255-5280. (2024)
- [82] Ma X, Fernández FM: Advances in mass spectrometry imaging for spatial cancer metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* 43:235-268. (2024)
- [83] Jha D, Blennow K, Zetterberg H, Savas JN, Hanrieder J: Spatial neurolipidomics-MALDI mass spectrometry imaging of lipids in brain pathologies. *Journal of Mass Spectrometry* 59:e5008. (2024)
- [84] Colley ME, Esselman AB, Scott CF, Spraggins JM: High-specificity imaging mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry* (Palo Alto Calif) 17:1-24. (2024)
- [85] Rajbhandari P, Neelakantan TV, Hosny N, Stockwell BR: Spatial pharmacology using mass spectrometry imaging. *Trends in Pharmacological Sciences* 45:67-80. (2024)

- [86] Stillger MN, Li MJ, Hönscheid P, von Neubeck C, Föll MC: Advancing rare cancer research by MALDI mass spectrometry imaging: Applications, challenges, and future perspectives in sarcoma. *Proteomics* 24:e2300001. (2024)
- [87] Holbrook JH, Kemper GE, Hummon AB: Quantitative mass spectrometry imaging: therapeutics & biomolecules. *Chemical Communications* 60:2137-2151. (2024)
- [88] Croslow SW, Trinklein TJ, Sweedler JV: Advances in multimodal mass spectrometry for single-cell analysis and imaging enhancement. *FEBS Letters* 598:591-601. (2024)
- [89] Zhan L, Huang Y, Wang G: Multi-modal mass spectrometry imaging of a single tissue section. *Journal of Mass Spectrometry* 59:e5074. (2024)
- [90] Kuik C, van Hoogstraten SWG, Arts JJC, Honing M, Cillero-Pastor B: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging for quorum sensing. *AMB Express* 14:45. (2024)
- [91] Horn PJ, Chapman KD: Imaging plant metabolism in situ. *Journal of Experimental Botany* 75:1654-1670. (2024)
- [92] Arendowski A. Matrix- and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry methods for urological cancer biomarker discovery-metabolomics and lipidomics approaches. *Metabolites* 14:173. (2024)
- [93] Kret P, Bodzon-Kulakowska A, Drabik A, Ner-Kluza J, Suder P, Smoluch M: Mass spectrometry imaging of biomaterials. *Materials (Basel)* 16:6343. (2023)
- [94] Okamoto M, Takahashi K, Doi T, Takimoto Y: High sensitivity detection and postsource decay of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides with matrix-assisted laserdesorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 69:2919-2926. (1997)
- [95] Puolitaival SM, Burnum KE, Cornett DS, Caprioli RM: Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19:882-886. (2008)
- [96] Goodwin RJ, Macintyre L, Watson DG, Scullion SP, Pitt AR: A solvent-free matrix application method for matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of small molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24:1682-6. (2010)
- [97] Murphy RC, Hankin JA, Barkley RM, Zemski Berry KA: MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811:970-975. (2011)
- [98] Mounfield WP 3rd, Garrett TJ: Automated MALDI matrix coating system for multiple tissue samples for imaging mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23:563-569. (2012)
- [99] Thomas A, Chaurand P: Advances in tissue section preparation for MALDI imaging MS, *Bioanalysis* 6:967-82. (2014)

- [100] Baker TC, Han J, Borchers CH: Recent advancements in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 43:62-69. (2017)
- [101] Li H, Wu R, Hu Q, Chen X, Dominic Chan TW: A matrix sublimation device with an integrated solvent nebulizer for MALDI-MSI. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 33:11-16. (2022)
- [102] Nauta SP, Huysmans P, Tuijthof GJM, Eijkel GB, Poeze M, Siegel TP, Heeren RMA: Automated 3D Sampling and imaging of uneven sample surfaces with LA-REIMS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 33:111-122. (2022)
- [103] Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M: Imaging mass spectrometry for lipidomics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811(11):961-9. (2011)
- [104] de Macedo CS, Anderson DM, Schey KL: MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) imaging mass spectrometry (IMS) of skin: Aspects of sample preparation. *Talanta* 174:325-335. (2017)
- [105] Edwards G, Mesa A, Vazquez-Padron RI, Kowalski JM, Bhattacharya SK: Sample preparation and analysis for imaging mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 1609:43-50. (2017)
- [106] Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L: Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights. *Analytical Chemistry* 90:240-265. (2018)
- [107] Moore JL, Patterson NH, Norris JL, Caprioli RM: Prospective on imaging mass spectrometry in clinical diagnostics. *Molecular Cellular Proteomics* 22:100576-100585. (3023)
- [108] Setou M, Kurabe N: Mass microscopy: high-resolution imaging mass spectrometry. *Journal of Electron Microscopy* (Tokyo) 60:47-56. (2011)
- [109] Calvano CD, Monopoli A, Cataldi TRI, Palmisano F: MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story?. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 410:4015-4038. (2018)
- [110] Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* 27:156-158. (1992)
- [111] Tang W, Nelson CM, Zhu L, Smith LM: Positive ion formation in the ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of oligonucleotides by using 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8:218-224. (1997)
- [112] Guo Z, Zhang Q, Zou H, Guo B, Ni J: A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74:1637-1641. (2002)
- [113] Lin YS, Chen YC: Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol– gel-derived 2, 5-dihydroxybenzoic acid film. *Analytical Chemistry* 74:5793-5798. (2002)

- [114] Popkova Y, Schiller J: (2017). Addition of CsCl reduces ion suppression effects in the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of triacylglycerol/phosphatidylcholine mixtures and adipose tissue extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 31:411-418. (2017)
- [115] Cvačka J, Svatoš A: Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2, 5-dihydroxybenzoate matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17:2203-2207. (2003)
- [116] Chen S, Chen L, Wang J, Hou J, He Q, Liu JA, Wang J, Xiong S, Yang G, Nie Z: 2, 3, 4, 5-Tetrakis (3', 4'-dihydroxyphenyl) thiophene: a new matrix for the selective analysis of low molecular weight amines and direct determination of creatinine in urine by MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* 84:10291-10297. (2012)
- [117] Ayorinde FO, Hambright P, Porter TN, Keith Jr QL: Use of meso-tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13:2474-2479. (1999)
- [118] Ayorinde, FO, Garvin K, Saeed K: Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14:608-615. (2000)
- [119] Ayorinde FO, Bezabeh DZ, Delves IG: Preliminary investigation of the simultaneous detection of sugars, ascorbic acid, citric acid, and sodium benzoate in non-alcoholic beverages by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17:1735-1742. (2003)
- [120] Korte AR, Stopka SA, Morris N, Razunguzwa T, Vertes A: Large-scale metabolite analysis of standards and human serum by laser desorption ionization mass spectrometry from silicon nanopost arrays. *Analytical Chemistry* 88:8989-8996. (2016)
- [121] Picca RA, Calvano CD, Lo Faro MJ, Fazio B, Trusso S, Ossi PM, Neri A, D'Andrea C, Irrera A, Cioffi N: Functionalization of silicon nanowire arrays by silver nanoparticles for the laser desorption ionization mass spectrometry analysis of vegetable oils. *Journal of Mass Spectrometry* 51:849-856. (2016)
- [122] Alhmoud HZ, Guinan TM, Elnathan R, Kobus H, Voelcker NH: Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ordered silicon nanopillar arrays. *Analyst* 139:5999-6009. (2014)
- [123] Marsico AL, Duncan B, Landis RF, Tonga GY, Rotello VM, Vachet RW: Enhanced laser desorption/ionization mass spectrometric detection of biomolecules using gold nanoparticles, matrix, and the coffee ring effect. *Analytical Chemistry* 89:3009-3014. (2017)

- [124] Abdelhamid HN, Wu HF: (2016). Gold nanoparticles assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and applications: from simple molecules to intact cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:4485-4502. (2016)
- [125] Dufresne M, Masson JF, Chaurand P: Sodium-doped gold-assisted laser desorption ionization for enhanced imaging mass spectrometry of triacylglycerols from thin tissue sections. *Analytical Chemistry* 88:6018-6025. (2016)
- [126] Marsico AL, Creran B, Duncan B, Elci SG, Jiang Y, Onasch TB, Wormhoudt J, Rotello VM, Vachet RW: Inkjet-printed gold nanoparticle surfaces for the detection of low molecular weight biomolecules by laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 26:1931-1937. (2015)
- [127] Sekuła J, Nizioł J, Rode W, Ruman T: Gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET) as universal solution for laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and imaging of low molecular weight compounds. *Analytica Chimica Acta* 875:61-72. (2015)
- [128] Sekuła J, Nizioł J, Rode W, Ruman T: Silver nanostructures in laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging. *Analyst* 140:6195-6209. (2015)
- [129] Schnapp A, Niehoff AC, Koch A, Dreisewerd K: (2016). Laser desorption/ionization mass spectrometry of lipids using etched silver substrates. *Methods* 104:194-203. (2016)
- [130] Popović IA, Nešić M, Vranješ M, Šaponjić Z, Petković M: (2016). SALDI-TOF-MS analyses of small molecules (citric acid, dexasone, vitamins E and A) using TiO₂ nanocrystals as substrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:7481-7490. (2016)
- [131] Popović I, Milovanović D, Miletić J, Nešić M, Vranješ M, Šaponjić Z, Petković M: Dependence of the quality of SALDI TOF MS analysis on the TiO₂ nanocrystals' size and shape. *Optical and Quantum Electronics* 48:1-6. (2016)
- [132] Wu Q, Chu JL, Rubakhin SS, Gillette MU, Sweedler JV: Dopamine-modified TiO₂ monolith-assisted LDI MS imaging for simultaneous localization of small metabolites and lipids in mouse brain tissue with enhanced detection selectivity and sensitivity. *Chemical Science* 8:3926-3938. (2017)
- [133] Yang M, Wang M, Tang X, Zhou J, Mao X: Analysis of small molecule compounds by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with ZnO, CuO and NiO nanoparticles as matrix. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 12:1058-1062. (2015)
- [134] Li Z, Zhang YW, Xin YL, Bai Y, Zhou HH, Liu HW: A lithium-rich composite metal oxide used as a SALDI-MS matrix for the determination of small biomolecules. *Chemical Communications* 50:15397-15399. (2014)

- [135] Michalak L, Fisher KJ, Alderdice DS, Jardine DR, Willett GD: C60-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* 29:512-515. (1994)
- [136] Shiea J, Huang JP, Teng CF, Jeng J, Wang LY, Chiang LY: Use of a water-soluble fullerene derivative as precipitating reagent and matrix-assisted laser desorption/ionization matrix to selectively detect charged species in aqueous solutions. *Analytical Chemistry* 75:3587-3595. (2003)
- [137] Rainer M, Qureshi MN Bonn GK: Recent progress in application of carbon nanomaterials in laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400:2281-2288. (2011)
- [138] Ugarov MV, Egan T, Khabashesku DV, Schultz JA, Peng H, Khabashesku VN, Furutani H, Prather KS, Wang HW, Jackson SN, Woods AS: MALDI matrices for biomolecular analysis based on functionalized carbon nanomaterials. *Analytical Chemistry* 76:6734-42. (2004)
- [139] Ren SF, Zhang L, Cheng ZH, Guo YL: Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI-TOF-MS analysis: applications to neutral small carbohydrates. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16:333-9. (2005)
- [140] Vogeser M, Parhofer KG: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 115:559-570. (2007)
- [141] Griffiths WJ, Wang Y: Analysis of neurosterols by GC-MS and LC-MS/MS, *Journal of Chromatography B* 877:2778-2805. (2009)
- [142] Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CH: Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121:496-504. (2010)
- [143] Kamrath C, Wudy SA, Krone N: Steroid biochemistry. *Endocrine Development* 27:41-52. (2014)
- [144] Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC: Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis* 27:375-386. (2019)
- [145] Marcos J, Pozo OJ: Derivatization of steroids in biological samples for GC-MS and LC-MS analyses. *Bioanalysis* 7:2515-36. (2015)
- [146] Bangalore Krishna K, Witchel SF: Normal puberty. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 53:183-194. (2024)
- [147] Hamburg-Shields E, Mesiano S: The hormonal control of parturition. *Physiological Reviews* 104:1121-1145. (2024)
- [148] Ramírez SI, Suniega EA, Laughrey MI: Endocrinology during pregnancy. *Primary Care* 51:535-547. (2024)

- [149] Henríquez S, Valdivia MJ, Mainigi M, Villarroel C, Velasquez L, Strauss Iii JF, Devoto L: The role of estrogen metabolites in human ovarian function. *Steroids* 203:109368. (2024)
- [150] Li L, Lin W, Wang Z, Huang R, Xia H, Li Z, Deng J, Ye T, Huang Y, Yang Y: Hormone regulation in testicular development and function. *International Journal of Molecular Sciences* 25:5805. (2024)
- [151] Matsuyama S, DeFalco T: Steroid hormone signaling: multifaceted support of testicular function. *Frontiers in Cell Developmental Biology* 11:1339385. (2024)
- [152] Wang C, Meriggiola MC, Behre HM, Page ST: Hormonal male contraception. *Andrology* 12:1551-1557. (2024)
- [153] Shankey NT, Cohen RE: Neural control of reproduction in reptiles. *Journal of Experimental Zoology Part A* 341:307-321. (2024)
- [154] Hoffmann JP, Liu JA, Seddu K, Klein SL: Sex hormone signaling and regulation of immune function. *Immunity* 56:2472-2491. (2023)
- [155] Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, Börjesson AE, Ohlsson C: Sex steroid actions in male bone. *Endocrine Reviews* 35:906-960. (2014)
- [156] Goltzman D, Hendy GN, White JH: Vitamin D and its receptor during late development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1849:171-180. (2015)
- [157] Kovacs CS: Calcium, phosphorus, and bone metabolism in the fetus and newborn. *Early Human Development* 91:623-628. (2015)
- [158] Sandor LF, Ragacs R, Gyori DS: Local effects of steroid hormones within the bone microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 24:17482. (2023)
- [159] Tański W, Kosiorowska J, Szymańska-Chabowska A: Osteoporosis - risk factors, pharmaceutical and non-pharmaceutical treatment. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 25:3557-3566. (2021)
- [160] Sfeir JG, Drake MT, Khosla S, Farr JN: Skeletal aging. *Mayo Clinic Proceedings* 97:1194-1208. (2022)
- [161] Gersh F, O'Keefe JH, Elagizi A, Lavie CJ, Laukkanen JA: Estrogen and cardiovascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases* 84:60-67. (2024)
- [162] Cignarella A, Bolego C, Barton M: Sex and sex steroids as determinants of cardiovascular risk. *Steroids* 206:109423. (2024)
- [163] Desai K, McManus JM, Sharifi N: Hormonal therapy for prostate cancer. *Endocrinology Reviews* 42:354-373. (2021)
- [164] De Silva NL, Papanikolaou N, Grossmann M, Antonio L, Quinton R, Anawalt BD, Jayasena CN: Male hypogonadism: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 12:761-774. (2024)

- [165] Valentín López JC, Lange CA, Dehm SM: Androgen receptor and estrogen receptor variants in prostate and breast cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 241:106522. (2024)
- [166] Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ: Progesterone and breast cancer. *Endocrinology Reviews* 41:320–44. (2020)
- [167] Valko-Rokytovská M, Očenáš P, Salayová A, Kostecká Z: Breast cancer: targeting of steroid hormones in cancerogenesis and diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences* 22:5878. (2021)
- [168] Filardo EJ, Quinn JA, Sabo E: Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids* 73:870-873. (2008)
- [169] Almeida C, Nogueira JMF: Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1303-1311. (2006)
- [170] Wudy SA, Hartmann MF: Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology. *Hormone and Metabolic Research* 36:415-422. (2004)
- [171] Johnson DW: Ketosteroid profiling using Girard T derivatives and electrospray ionization tandem mass spectrometry: direct plasma analysis of androstenedione, 17-hydroxyprogesterone and cortisol. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19:193-200. (2005)
- [172] Kim YS, Zhang H, Kim H Y: Profiling neurosteroids in cerebrospinal fluids and plasma by gas chromatography/electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 277:187-195. (2000)
- [173] Saudan C, Kamber M, Barbati G, Robinson N, Desmarchelier A, Mangin P, Saugy M: Longitudinal profiling of urinary steroids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: diet change may result in carbon isotopic variations. *Journal of Chromatography B* 831:324-327. (2006)
- [174] Dosedělová V, Itterheimová P, Kubáň P: Analysis of bile acids in human biological samples by microcolumn separation techniques: A review. *Electrophoresis* 42:68-85. (2021)
- [175] Jin Y, Zhai T, Wang Y, Li J, Wang T, Huang J: Recent advances in liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of thyroid hormones and thyroglobulin in clinical samples: A review. *Journal of Separation Science* 47:e2400466. (2024)
- [176] Knott CD: Radioimmunoassay of estrone conjugates from urine dried on filter paper. *American Journal of Primatology* 67:121-135. (2005)
- [177] Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Friedman LA, Patterson BH, Greenhut SF: Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids* 67:151-158. (2002)

- [178] Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S, Paulson RJ: Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids* 68:1173-1178. (2003)
- [179] Rauh M, Gröschl M, Rascher W, Dörr HG: Automated, fast and sensitive quantification of 17 α -hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 71:450-458. (2006)
- [180] Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC: Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food Drug Analysis* 27:375-386. (2019)
- [181] Temerdashev A, Nesterenko P, Dmitrieva E, Zhurkina K, Feng YQ: GC-MS/MS Determination of Steroid Hormones in Urine Using Solid-Phase Derivatization as an Alternative to Conventional Methods. *Molecules* 27:5796. (2022)
- [182] Šimková M, Heráček J, Drašar P, Hampl R: Determination of Intraprostatic and Intratesticular Androgens. *International Journal of Molecular Sciences* 22:466. (2021)
- [183] Araujo-Castro M, Valderrábano P, Escobar-Morreale HF, Hanzu FA, Casals G: Urine steroid profile as a new promising tool for the evaluation of adrenal tumors. Literature review. *Endocrine* 72:40-48. (2021)
- [184] French D: Clinical utility of laboratory developed mass spectrometry assays for steroid hormone testing. *Journal of Mass Spectrometry Advances in the Clinical Laboratory* 28:13-19. (2023)
- [185] Williams TM, Kind AJ, Houghton E, Hill DW: Electrospray collision-induced dissociation of testosterone and testosterone hydroxy analogs. *Journal of Mass Spectrometry* 34:206-216. (1999)
- [186] Schiller J, Zschörnig O, Petkovic M, Müller M, Arnhold J, Arnold K: Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and 31P-NMR. *Journal of Lipid Research* 42:1501-1508. (2001)
- [187] Griffiths, WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y: Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal* 355:545-561. (2001)
- [188] Gravitte A, Archibald T, Cobble A, Kennard B, Brown S: Liquid chromatography-mass spectrometry applications for quantification of endogenous sex hormones. *Biomedical Chromatography* 35:e5036. (2021)
- [189] Shackleton CH, Roitman E, Phillips A, Chang T: Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. *Steroids* 62:665-673. (1997)
- [190] Buiarelli F, Coccioli F, Merolle M, Neri B, Terracciano A: Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the

- p>identification of natural androgen steroids and their conjugates in urine samples.
- Analytica Chimica Acta*
- 526:113-120. (2004)
- [191] Cowan DA, Kicman AT, Kubli-Garfias C, Welchman HJ: Ion trap MS/MS of intact testosterone and epitestosterone conjugates—Adducts, fragile ions and the advantages of derivatisation. *Steroids* 73:621-628. (2008)
 - [192] Zhu Y, Deng P, Zhong D: Derivatization methods for LC-MS analysis of endogenous compounds. *Bioanalysis* 7:2557-2581. (2015)
 - [193] Higashi T, Ogawa S: Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI-MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 162:57-69. (2016)
 - [194] Song Z, Gao H, Xie W, Sun Q, Liang K, Li Y: Quantitative MALDI-MS assay of steroid hormones in plasma based on hydroxylamine derivatization. *Analytical Biochemistry* 616:114089. (2021)
 - [195] Nakamura M, Moritsuna M, Yuda K, Fujimura S, Sugiura Y, Shimma S, Nishimoto K, Nishikawa T, Suematsu M, Ogawa S, Higashi T: Quantitative MALDI-MS/MS assay for serum cortisol through charged derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 178:112912. (2020)
 - [196] Zecchi R, Franceschi P, Tigli L, Amidani D, Catozzi C, Ricci F, Salomone F, Pieraccini G, Pioselli B, Mileo V: Sample preparation strategy for the detection of steroid-like compounds using MALDI mass spectrometry imaging: pulmonary distribution of budesonide as a case study. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 413:4363-4371. (2021)
 - [197] Huang S, Liu X, Liu D, Zhang X, Zhang L, Le W, Zhang Y: Pyrylium-based derivatization for rapid labeling and enhanced detection of cholesterol in mass spectrometry imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 33:2310-2318. (2022)
 - [198] Ho YC, Tseng MC, Lu YW, Lin CC, Chen YJ, Fuh MR: Nanoparticle-assisted MALDI-TOF MS combined with seed-layer surface preparation for quantification of small molecules. *Analytica Chimica Acta* 697(1-2):1-7. (2011)
 - [199] Wang Y, Hornshaw M, Alvelius G, Bodin K, Liu S, Sjövall J, Griffiths WJ: Matrix-assisted laser desorption/ionization high-energy collision-induced dissociation of steroids: analysis of oxysterols in rat brain. *Analytical Chemistry* 78:164-173. (2006)
 - [200] Taylor NF: Urinary steroid profiling. *Methods in Molecular Biology* 1065:259-276. (2013)
 - [201] Wang R, Hartmann MF, Wudy SA: Targeted LC-MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 205:105774. (2021)
 - [202] Helenkár A, Sebok A, Záray G, Molnár-Perl I, Vasanits-Zsigrai A: The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 82:600-607. (2010)

- [203] András N, Molnár B, Dobos B, Vasanits-Zsigrai A, Záray G, Molnár-Perl I: Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta* 115: 367-373 (2013)
- [204] Weisburger JH: Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chemistry and Toxicology* 37:943-948. (1999)
- [205] Lee SS, Lee SM, Kim M, Chun J, Cheong YK, Lee J: Analysis of *trans*-resveratrol in peanut butters consumed in Korea. *Food Research International* 37:247-251. (2004)
- [206] Flamini R: Mass spectrometry in grape and wine chemistry. *Mass Spectrometry. Reviews* 22:218-250. (2003)
- [207] Vinas P, Lopez-Erroz C, Marin-Hernandez JJ, Hernandez-Cordoba M: Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A* 871:85-93. (2000)
- [208] Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F: On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 1046:89-100. (2004)
- [209] Qiuney C, Dauzonne D, Kern C, Fourneron JD, Izard JC, Mohammad RM: Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukaemia B-cells. *Leukemia Research* 28:851-861. (2004)
- [210] Narayanan BA, Stoner GD, Bullock BP: Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants. *Life Sciences* 70:1821-1839. (2002)
- [211] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220. (1997)
- [212] Mokni M, Limam F, Elkahoui S, Amri M, Aouani E: Strong cardioprotective effect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457:1-6. (2007)
- [213] Vrhosek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F: Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6532-6538. (2004)
- [214] Kahle K, Kraus M, Richling E: Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition and Food Research* 49:797-806. (2005)
- [215] Wingerath T, Kirsch D, Spengler B, Stahl W: Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid, and retinal by laser desorption/ionisation-, matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry, and UV/Vis spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 272:232-242. (1999)

- [216] Young D, Douglas KM, Eiceman GA, Lake DA, Johnston MV: Laser desorption-ionisation of polycyclic aromatic hydrocarbons from glass surfaces with ion mobility spectrometry analysis. *Analytical Chimica Acta* 453:231-243. (2002)
- [217] Reed JD, Krueger CG, Vestling MM: MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry* 66:2248-63. (2005)
- [218] Flamini R, De Rosso M: Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins. *Expert Reviews of Proteomics* 3:321-331. (2006)
- [219] Monagas M, Quintanilla-López JE, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Lebrón-Aguilar R: MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:358-72. (2010)
- [220] Fougère L, Da Silva D, Destandau E, Elfakir C: TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix. *Phytochemical Analysis* 30:218-225. (2019)
- [221] Hotchkiss AT, Chau HK, Strahan GD, Nuñez A, Harron A, Simon S, White AK, Dieng S, Heuberger ER, Black I, Yadav MP, Welchoff MA, Hirsch J: Structural characterization of strawberry pomace. *Heliyon* 10:e29787. (2024)
- [222] Wang J, Sporns P: Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2009–2015. (1999)
- [223] Vivar-Quintana AM, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC: Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta* 458:147–155. (2002)
- [224] Kelebek H, Canbas A, Selli S: HPLC-DAD-MS analysis of anthocyanins in rose wine model from cv. Öküzgözü grapes, and effect of maceration time on anthocyanin content. *Chromatographia* 66:207–212. (2007)
- [225] Kussmann M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, Haebel S, Rossel-Larsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, Kroll-Kristensen A, Palm L, Roepstorff P: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry* 32:593-601. (1997)
- [226] Wang J, Sporns P, Low NH: Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1549-1557. (1999)
- [227] Blanco-Vega D, López-Bellido FJ, Alía-Robledo JM, Hermosín-Gutiérrez I: HPLC–DAD–ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins pigments formed in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 9523-9531. (2011)
- [228] Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T: Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* 254775. (2020)
- [229] Fasih Ramandi N, Faranoush M, Ghassempour A, Aboul-Enein HY: Mass spectrometry: a powerful method for monitoring various type of leukemia,

- especially MALDI-TOF in leukemia's proteomics studies review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 52:1259-1286. (2022)
- [230] Darie-Ion L, Whitham D, Jayathirtha M, Rai Y, Neagu AN, Darie CC, Petre BA: Applications of MALDI-MS/MS-based proteomics in biomedical research. *Molecules* 27:6196. (2022)
- [231] Li D, Yi J, Han G, Qiao L: MALDI-TOF mass spectrometry in clinical analysis and research. *ACS Measurement Science Au* 2:385-404. (2022)
- [232] Challen B, Cramer R: Advances in ionisation techniques for mass spectrometry-based omics research. *Proteomics* 22:e2100394. (2022)
- [233] Wang Y, Li S, Qian K: Nanoparticle-based applications by atmospheric pressure matrix assisted desorption/ionization mass spectrometry. *Nanoscale Advances* 5:6804-6818. (2023)
- [234] Cournut A, Moustiez P, Coffinier Y, Enjalbal C, Bich C: Innovative SALDI mass spectrometry analysis for Alzheimer's disease synthetic peptides detection. *Talanta* 268:125357. (2024)
- [235] Wu R, Veličković M, Burnum-Johnson KE: From single cell to spatial multi-omics: unveiling molecular mechanisms in dynamic and heterogeneous systems. *Current Opinion Biotechnology* 89:103174. (2024)
- [236] Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Koy DH, Kitada C: Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789. (1991)
- [237] Somogyvári-Vigh A, Reglödi D, Li M, Lengvári I, Vigh S, Arimura A: Tissue distribution of PACAP27 and -38 in oligochaeta: PACAP27 is the predominant form in the nervous system of *Lumbricus polyphemus*. *Peptides* 21: 1185-1191. (2000)
- [238] Reglodi D, Lengvari I, Szelier M, Vigh S, Arimura A.: Distridution of PACAP-like immunoreactivity in the nervous system of oligochaeta. *Peptides* 21: 183-188. (2000)
- [239] Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, Gergely P, Csernoch L, Panyi G, Tóth G, Reglödi D, Tamás A, Zákány R: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: implication of calcineurin as a downstream target. *PLosOne* 9: e91541. (2014)
- [240] Arimura A: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *The Japanase Journal of Physiology* 48:301-331. (1998)
- [241] Reglödi D: A PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo modellekben. *MTA Doktori értekezés* (2009)
- [242] Pohóczky K, Tamás A, Reglödi D, Kemény Á, Helyes Z, Czeglédi L: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide concentrations in the sheep mammary gland, milk, and in the lamb blood plasma after suckling. *Physiology International* 107:92-105. (2020)

- [243] Czeglédi L, Tamas A, Borzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Szalontai B, Szabadfi K, Javor A, Reglodi D, Helyes Z: Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *General and Comparative Endocrinology* 172:115-119. (2011)
- [244] Koppan M, Nagy Z, Bosnyak I, Reglodi D: Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP. *Frontiers Endocrinology (Lausanne)* 13:982551. (2022)
- [245] Sherwood NM, Adams BA, Isaac ER, Wu S, Fradinger EA: Knocked down and out: PACAP in development, reproduction and feeding. *Peptides* 28:1680-1687. (2007)
- [246] Winters SJ, Moore JP Jr.: PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biology of Reproduction* 84:844-850. (2011)
- [247] Winters SJ, Moore JP Jr.: PACAP: A regulator of mammalian reproductive function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 518:110912. (2020)
- [248] Gräs S, Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J: Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology* 137:4779-4785. (1996)
- [249] Park JY, Park JH, Park HJ, Lee JY, Lee YI, Lee K, Chun SY: (2001). Stage-dependent regulation of ovarian pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mRNA levels by GnRH in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 142:3828-3835. (2001)
- [250] Gräs S, Høst E, Fahrenkrug J: Role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regulatory Peptides* 128:69-74. (2005)
- [251] Park HJ, Lee J, Wang L, Park JH, Kwon HB, Arimura A, Chun SY: Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor messenger ribonucleic acid during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 141:702-709. (2000)
- [252] Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R: Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. *Journal of Endocrinology* 191:287-299. (2006)
- [253] Barberi M, Muciaccia B, Morelli MB, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R: Expression localisation and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 134:281-292. (2007)
- [254] Usuki EKS, Kubo T: (1997). Rat corpus luteum expresses both PACAP and PACAP type IA receptor mRNAs. *Peptides* 18:1453-1455. (1997)
- [255] Kemenes G: Molecular mechanisms of associative learning: lymnaea, In: Sweatt JD, Byrne J (eds) *Molecular mechanism of memory*, Vol. 4. Learning and memory: a comprehensive reference. Elsevier, Oxford, 133–148. (2008)

- [256] Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A: PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 48:482–492. (2012)
- [257] Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA: Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*. 106:2012-2017. (2009)
- [258] Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*. 103:7488-7493. (2006)
- [259] Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S: Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *Journal of Molecular Neuroscience* 43:22-29. (2011)
- [260] Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Danyadi B, Tamas A, Helyes Z, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Toth G, Gabriel R, Reglodi D: Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotoxicity Research* 21:41-48. (2012)
- [261] Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA: Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide. *Neuroscience* 151:63-73. (2008)
- [262] Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shintani N, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S: Neuroprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on spinal cord injury. *Journal of Molecular Neuroscience* 508-517. (2012)
- [263] Ferencz A, Kiss P, Weber G, Helyes Z, Shintani N, Baba A, Reglodi D: Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 42:435-442. (2010)
- [264] Ferencz A, Weber G, Helyes Z, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D: Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *Journal of Molecular Neuroscience* 42:428-434. (2010)
- [265] Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S: Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *Journal of Molecular Neuroscience* 42:397-403. (2010)

- [266] Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Aiuchi T, Tsuruyama T, Tamaki K, Shioda S: Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. *Journal of Neuroinflammation* 9:256. (2012)
- [267] Lebon A, Seyer D, Cosette P, Coquet L, Jouenne T, Chan P, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ, Vaudry D: Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Annals of New York Academy of Sciences* 1070:380-387. (2006)
- [268] Toth D, Tamas A, Reglodi D: The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *International Journal of Molecular Sciences* 21:827. (2020)
- [269] Brooks SPJ, Storey, KB: (1997). Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 118:1103-1114. (1997)
- [270] Brooks SP, Storey KB: Protein phosphorylation patterns during aestivation in the land snail *Otala lactea*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 143: 7-13. (1995)
- [271] Ramnanan CJ, Storey KB: Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. *Journal of Experimental Biology* 209:677-688. (2006)
- [272] Barker JL, Gainer H: Role of calcium in the seasonal modulation of pacemaker activity in a molluscan neurosecretory cell. *Nature* 245:462-464. (1973)
- [273] Alvarez-Leefmans FJ, Gamino SM, Rink TJ: Intracellular free magnesium in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. *The Journal of Physiology* 354:303-317. (1984)
- [274] Nowakowska A, Caputa M, Rogalska J: Seasonal changes in cryoprotectants concentrations in *Helix pomatia* snails. *Journal of Physiol Pharmacol* 57:93-105. (2006)
- [275] Hernádi L, Vehovszky Á, Győri J, Hiripi L: Neuronal background of activation of estivated snails, with special attention to the monoaminergic system: a biochemical, physiological, and neuroanatomical study. *Cell and Tissue Research* 331:539-553. (2008)
- [276] Hiripi L, Salánki J: Seasonal and activity-dependent changes of the serotonin level in the CNS and heart of the snail (*Helix pomatia* L.). *Comparative and General Pharmacology* 4:285-292. (1973)
- [277] Michaelidis B, Loumbourdis NS, Kapaki E: Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *Journal of Experimental Biology* 205:1135-1143. (2002)

- [278] Bernocchi G, Vignola C, Scherini E, Necchi D, Pisu MB: Bioactive peptides and serotonin immunocytochemistry in the cerebral ganglia of hibernating *Helix aspersa*. *Journal of Experimental Zoology* 280:354-367. (1998)
- [279] Vignola C, Fenoglio C, Scherini E, Bernocchi G: The cerebral neurons of *Helix aspersa* during hibernation. Changes in the cytochemical detection of calmodulin, cytoskeletal components and phosphatases. *Tissue and Cell* 27:185-196. (1995)
- [280] Pakay JL, Withers PC, Hobbs AA, Guppy M: In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix aspersa* during estivation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283:197-204. (2002)
- [281] Storey KB, Storey JM: Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biological Reviews* 79:207-233. (2004)
- [282] Brooks SPJ, Storey KB: Evidence for aestivation specific proteins in *Otala lactea*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 143:15-20. (1995)
- [283] Cui Y, Lee TF, Wang LCH: State-dependent changes of brain endogenous opioids in mammalian hibernation. *Brain Research Bulletin* 40:129-133. (1996)
- [284] Kaufmann W, Kerschbaum HH, Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Hermann A: Distribution and seasonal variation of vasoactive intestinal (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. *Brain Research* 695:125-136. (1995)
- [285] Blishchenko EY, Mernenko OA, Yatskin ON, Ziganshin RH, Philippova MM, Karelin AA, Ivanov VT: Neokyotorphin and neokyotorphin (1-4): cytolytic activity and comparative levels in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224:721-727. (1996)
- [286] Kokoz YM, Zenchenko KI, Alekseev AE, Korystova AF, Lankina DA, Ziganshin RH, Mikhaleva II, Ivanov VT: The effect of some peptides from the hibernating brain on Ca²⁺ current in cardiac cells and on the activity of septal neurons. *FEBS Letters* 411:71-76. (1997)
- [287] Barnes BM: Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 C in an arctic hibernator. *Science* 244:1593-1595. (1989)
- [288] Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB: Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 120:437-448. (1998)
- [289] Nowakowska A, Caputa M, Rogalska J: Seasonal changes in cryoprotectants concentrations in *Helix pomatia* snails. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57:93-105. (2006)
- [290] Ono M, Kojima-Kawagoe M, Kondo N, Shiba T, Takamatsu N: Comparative study of HP-27 gene promoter activities between the chipmunk and tree squirrel. *Gene* 302:193-199. (2003)

- [291] Wu Q, Sugimoto K, Moriyama K, Adachi Y, Nakayama A, Mori KJ: Cloning of hibernation-related genes of bullfrog (*Rana catesbeiana*) by cDNA subtraction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 133:85-94. (2002)
- [292] Ikeda T, Minakata H, Fujita T, Muneoka Y, Kiss T, Hiripi L, Nomoto K: *Neuropeptides isolated from Helix pomatia Part 1. Peptides related to MIP, buccalin, myomodulin-CARP and SCP*. In: Yanaihara N (ed), *Peptide Chemistry (Proceedings of the 2nd Japan Symposium)*, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden, The Netherlands, 576-578. (1992)
- [293] Kobayashi M, Muneoka Y: (1990). Structure and action of molluscan neuropeptides. *Zoological Science* 7:801-814. (1990)
- [294] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55:74-108. (2005)
- [295] Prieto-Fernández L, Montoro-Jiménez I, de Luxan-Delgado B, Otero-Rosales M, Rodrigo JP, Calvo F, García-Pedrero JM, Álvarez-Teijeiro S: Dissecting the functions of cancer-associated fibroblasts to therapeutically target head and neck cancer microenvironment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,161:114502. (2023)
- [296] Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. *The Lancet* 371:1695-1709. (2008)
- [297] Várkondi E, Gyory F, Nagy A, Kiss I, Ember I, Kozma L: Oncogene amplification and overexpression of oncoproteins in thyroid papillary cancer. *In vivo* 19:465-470. (2005)
- [298] Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 48:3282-3287 (1988)
- [299] Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J: Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology?. *Oral Oncology* 36:387-389. (2000)
- [300] Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP: Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of National Cancer Institute* 99:777-89. (2007)
- [301] Gaudi I, Kásler M: A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon. *Magyar Onkológia* 46:291–295. (2002)
- [302] Teymoortash, A, Hoch S, Eivazi B, Werner JA: Postoperative morbidity after different types of selective neck dissection. *The Laryngoscope* 120:924-929. (2010)
- [303] Yarbrough WG, Slebos RJ, Liebler D: Proteomics: clinical applications for head and neck squamous cell carcinoma, *Head Neck* 28:549-558. (2006)
- [304] Thiel UJ, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R, Fillies T, Grus F, Mann WJ, Brieger J: Analysis of differentially expressed

- proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 40:369-379. (2011)
- [305] Polachini GM, Sobral LM, Mercante AM, Paes-Leme AF, Xavier FC, Henrique T, Guimarães DM, Vidotto A, Fukuyama EE, Góis-Filho JF, Cury PM, Curioni OA, Michaluart Jr P, Silva AMA, Wünsch-Filho V, Nunes FD, Leopoldino AM, Tajara EH: Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. *PloS one* 7:e50517. (2012)
- [306] Harris TM, Du P, Kawachi N, Belbin TJ, Wang Y, Schlecht NF, Ow TJ, Keller CE, Childs GJ, Smith RV, Angeletti RH, Prystowsky MB, Lim J: Proteomic analysis of oral cavity squamous cell carcinoma specimens identifies patient outcome-associated proteins. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 139:494-507. (2015)
- [307] Li S, Lee YC, Li Q, Chen CJ, Hsu WL, Lou PJ, Zhu C, Pan J, Shen H, Ma H, Cai L, He B, Wang Y, Zhou X, Ji Q, Zhou B, Wu W, Ma J, Boffetta P, Zhang ZF, Dai M, Hashibe M: Oral lesions, chronic diseases and the risk of head and neck cancer. *Oral Oncology* 51:1082-7. (2015)
- [308] Beckingsale TB, Gerrard GH: Osteosarcoma. *Orthopaedics and Trauma* 24:321-331. (2010)
- [309] Boyd WC, Boyd LG: Blood grouping tests on 300 mummies: with notes on the precipitin-test. *Journal of Immunology* 32:307-319. (1937)
- [310] Abelson PH: Paleobiochemistry: Organic constituents of fossils. *Carnegie Institution of Washington, Yearbook* 53:97-101. (1954)
- [311] Ostrom PH, Schall M, Gandhi H, Shen T-L, Hauschka PV, Strahler JR, Gage DA: New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Geochimica Cosmochimica Acta* 64:1043-1050. (2000)
- [312] Hendy J: Ancient protein analysis in archaeology. *Science Advances* 7:eabb9314. (2021)
- [313] Warinner C, Korzow Richter K, Collins MJ: Paleoproteomics. *Chemical Reviews* 122:13401-13446. (2022)
- [314] Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F: Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects?. *American Journal of Epidemiology* 162:448-453. (2005)
- [315] Toulza E, Galliano M-F, Jonca N, Gallinaro H, Méchin M-C, Ishida-Yamamoto A., Serre G, Guerrin M: The human dermokine gene: description of novel isoform with different tissue-specific expression and subcellular location. *Journal of Investigative Dermatology* 126:503-506. (2006)
- [316] Matsui T, Hayashi-Kisuki F, Kinoshita Y, Katahira S, Morita K, Miyachi Y, Ono Y, Imai T, Tanigawa Y, Komiya T, Tsukita S: Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine α - β and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1. *Genome* 84:384-397. (2004)

- [317] Toulza E, Mattiuzzo NR, Galliano M-F, Jonca N, Dossat C, Jacob D, Daruvar de A, Wincker P, Serre G, Guerrin M: Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biology* 8:R107. (2007)
- [318] Martínez-Álvarez C, Bonello R, Tudela C, Gato A, Mena J, O’Kane S, Ferguson MWJ: Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *International Journal of Developmental Biology* 44:331-335. (2000)
- [319] Tudela C, Formosa M-A, Martínez T, Pérez R, Aparicio M, Maestro C, Del Río A, Martínez E, Ferguson M, Martínez-Álvarez C: TGF- β 3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *International Journal of Developmental Biology* 46:333-336. (2002)
- [320] Rullo R, Gombos F, Ferraraccio F, Farina A, Morano D, Festa VM, Guida L, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F: TGF β 3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 70:1759-1764. (2006)
- [321] Dagogo-Jack I, Shaw AT: Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15:81-94. (2018)
- [322] Holzlechner M, Eugenin E, Prideaux B: Mass spectrometry imaging to detect lipid biomarkers and disease signatures in cancer. *Cancer Repotrs* 2:e1229. (2019)
- [323] Perrotti F, Rosa C, Cicalini I, Sacchetta P, Del Boccio P, Genovesi D, Pieragostino D: Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. *International Journal of Molecular Sciences* 17:1992. (2016)
- [324] Jelonek, K, Pietrowska M, Ros M, Zagdanski A, Suchwalko A, Polanska J, Marczyk M, Rutkowski T, Skladowski K, Clench MR, Widlak, P: Radiation-induced changes in serum lipidome of head and neck cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences* 15:6609-6624. (2014)
- [325] Lewis SM, Asselin-Labat ML, Nguyen Q, Berthelet J, Tan X, Wimmer VC, Merino D, Rogers KL, Naik SH: Spatial omics and multiplexed imaging to explore cancer biology. *Nature Methods* 18:997–1012. (2021)
- [326] Berghmans E, Boonen K, Maes E, Mertens I, Pauwels P, Baggerman G: Implementation of MALDI mass spectrometry imaging in cancer proteomics research: applications and challenges. *Journal of Personalized Medicine* 10(2):54. (2020)
- [327] Kumar BS: Recent advances and applications of ambient mass spectrometry imaging in cancer research: an overview. *Mass Spectrometry (Tokyo)* 12:A0129. (2023)
- [328] Planque M, Igelmann S, Ferreira Campos AM, Fendt SM: Spatial metabolomics principles and application to cancer research. *Current Opinion in Chemical Biology* 76:102362. (2023)
- [329] Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR: Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention?. *Oncologist* 10:493-500. (2005)

- [330] Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 33:317- 322. (2004)
- [331] Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff: RH A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Research* 63:1727-1730. (2003)
- [332] Ghavami S, Chitayat S, Hashemi M, Eshraghi M, Chazin WJ, Halayko AJ, Kerkhoff C: S100A8/A9: A Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorigenesis. *European Journal of Pharmacology* 625:73-83. (2009)
- [333] Khammanivong A, Wang C, Sorenson BS, Ross KF, Herzberg MC: S100A8/A9 (calprotectin) negatively regulates G2/M cell cycle progression and growth of squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8:e69395. (2013)
- [334] Jou YJ, Hua CH, Lin CD, Lai CH, Huang SH, Tsai MH, Kao JY, Lin CW: S100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLC–MS/MS. *Clinica Chimica Acta* 436:121-129. (2014)
- [335] Csősz É, Lábicsák P, Kalló G, Márkus B, Emri M, Szabó A, Tar I, Tőzser J, Kiss C, Márton I: Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS ONE* 12: e0177282. (2017)
- [336] Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB: S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15:96-109. (2015)
- [337] Phelps DL, Balog J, Gildea LF, Bodai Z, Savage A, El-Bahrawy MA, Speller AV, Rosini F, Kudo H, McKenzie JS, Brown R, Takáts Z, Ghaem-Maghami S: The surgical intelligent knife distinguishes normal, borderline and malignant gynaecological tissues using rapid evaporative ionisation mass spectrometry (REIMS). *British Journal of Cancer* 118:1349-1358. (2018)
- [338] de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N: Spermatogenesis. *Human Reproduction* 13 Suppl 1:1-8. (1998)
- [339] Sharma S, Hanukoglu A, Hanukoglu I: Localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the germinal epithelium of the testis, Sertoli cells, and spermatozoa. *Journal of Molecular Histology* 49:195-208. (2018)
- [340] Nishimura H, L'Hernault SW: Spermatogenesis. *Current Biology* 27:R988-R994. (2017)
- [341] Suzuki T: Overview of single-cell RNA sequencing analysis and its application to spermatogenesis research. *Reproductive Medicine and Biology* 22:e12502. (2023)
- [342] Alpatov R, Lesch BJ, Nakamoto-Kinoshita M, Blanco A, Chen S, Stützer A, Armache KJ, Simon MD, Xu C, Ali M, Murn J, Priscic S, Kutateladze TG, Vakoc CR, Min J, Kingston RE, Fischle W, Warren ST, Page DC, Shi, Y: A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell* 157:869-881. (2014)

- [343] Avidor-Reiss T, Khire A, Fishman EL, Jo KH: Atypical centrioles during sexual reproduction. *Frontiers in Cellular and Developmental Biology* 3:21. (2015)
- [344] Grande G, Barrachina F, Soler-Ventura A, Jodar M, Mancini F, Marana R, Chiloiro S, Pontecorvi A, Oliva R, Milardi D: The role of testosterone in spermatogenesis: lessons from proteome profiling of human spermatozoa in testosterone deficiency. *Frontiers in Endocrinology* 13:852661. (2022)
- [345] Xiao X, Mruk DD, Cheng CY: Intercellular adhesion molecules (ICAMs) and spermatogenesis. *Human Reproduction Update* 19:167-186. (2013)
- [346] Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M: Imaging mass spectrometry reveals changes of metabolites distribution in mouse testis during testicular maturation. *Surface and Interface Analysis* 44:749-754. (2012)
- [347] Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M: (2009). The specific localization of seminolipid molecular species on mouse testis during testicular maturation revealed by imaging mass spectrometry. *Glycobiology* 19:950-957. (2009)
- [348] Fujimoto H, Tadano-Aritomi K, Tokumasu A, Ito K, Hikita T, Suzuki K, Ishizuka I: Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 275:22623-22626. (2000)
- [349] Lagarrigue M, Lavigne R, Guével B, Com E, Chaurand P, Pineau C: (2012). Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry: a promising technique for reproductive research. *Biology of Reproduction* 86:74-81. (2012)
- [350] Wang DH, Chen ZJ, Jiang YY, Zhou H, Yang WX: Fatty acid composition and analysis of freshwater caridean shrimp *Macrobrachium nipponense* (De Haan) during spermiogenesis. *Aquaculture Research* 41:1140-1149. (2010)
- [351] Zhang Y, Hayashi Y, Cheng X, Watanabe T, Wang X, Taniguchi N, Honke K: Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid, is essential for germ cell function in spermatogenesis. *Glycobiology* 15:649-654. (2005)
- [352] Wang X, Liu X, Qu M, Li H: Sertoli cell-only syndrome: advances, challenges, and perspectives in genetics and mechanisms. *Cellular and Molecular Life Science* 80:67. (2023)
- [353] Adamczewska D, Slowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Walczak-Jedrzejowska R: Features of gonadal dysgenesis and Leydig cell impairment in testes with Sertoli cell-only syndrome. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 58:73-82. (2020)
- [354] Yari A, Asadi MH, Bahadoran H, Dashtnavard H, Iman H, Naghii MR: Cadmium toxicity in spermatogenesis and protective effects of L-carnitine in adult male rats. *Biological Trace Element Research* 137:216-225. (2010)
- [355] Hashemitabar M, Sabbagh S, Orazizadeh M, Ghadiri A, Bahmanzadeh M: A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between

normozoospermia and asthenozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32:853-863. (2015)

- [356] Nielsen JE, Rolland AD, Rajpert-De Meyts E, Janfelt C, Jørgensen A, Winge SB, Kristensen DM, Juul A, Chalmel F, Jégou B, Skakkebaek NE: Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Scientific Reports* 9:12866. (2019)
- [357] Shan S, Xu F, Hirschfeld M, Brenig B: Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *International Journal of Molecular Sciences* 22:8767. (2021)
- [358] Pyttel S, Nimptsch A, Böttger J, Zschörnig K, Jakop U, Wegener J, Müller K, Paasch U, Schiller J: Changes of murine sperm phospholipid composition during epididymal maturation determined by MALDI-TOF mass spectrometry. *Theriogenology* 82:396-402. (2014)
- [359] Liu W, Li X, Ma Q, Zhu Y, Zhao W, Yang Y, Xiao W, Huang D, Cai F, Yiu D, Chan L, Zhao S, Chu Q: Testis cell pyroptosis mediated by CASP1 and CASP4: possible sertoli cell-only syndrome pathogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 21:53. (2023)
- [360] Rosenhouse-Dantsker A, Mehta D, Levitan I: Regulation of ion channels by membrane lipids. *Comprehensive Physiology* 2:31-68. (2012)
- [361] Burnum KE, Cornett DS, Puolitaival SM, Milne SB, Myers DS, Tranguch S, Brown HA, Dey SK, Caprioli RM: Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *Journal of Lipid Research* 50: 2290-2298. (2009)
- [362] Meier S, Trewhella M, Fairclough RJ, Jenkin J: Changes in uterine endometrial phospholipids and fatty acids throughout the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids* 57:341-349. (1997)
- [363] Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK: Molecular signaling in the uterine receptivity for implantation. *Cell & Developmental Biology* 11: 67-76. (2000)
- [364] Cha J, Sun X, Dey SK: Mechanism of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine* 18:1754-1767. (2012)
- [365] Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J: LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435:104-108. (2005)
- [366] Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H: Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biology of Reproduction* 77:954-959. (2007)
- [367] Li J, Gao Y, Guan L, Zhang H, Chen P, Gong X, Li D, Liang X, Huang M, Bi H: Lipid profiling of peri-implantation endometrium in patients with

- premature progesterone rise in the late follicular phase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104:5555-5565. (2019)
- [368] Luti S, Fiaschi T, Magherini F, Modesti PA, Piomboni P, Governini L, Luddi A, Amoresano A, Illiano A, Pinto G, Modesti A, Gamberi T: Relationship between the metabolic and lipid profile in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Molecular Reproductive Development* 87:986-997. (2020)
- [369] Batushansky A, Zacharia A, Shehadeh A, Bruck-Haimson R, Saidenberg D, Kogan NM, Thomas Mannully C, Herzberg S, Ben-Meir A, Moussaieff A: A shift in glycerolipid metabolism defines the follicular fluid of IVF patients with unexplained infertility. *Biomolecules* 10:1135. (2020)
- [370] Shehadeh A, Bruck-Haimson R, Saidenberg D, Zacharia A, Herzberg S, Ben-Meir A, Moussaieff A: A shift in follicular fluid from triacylglycerols to membrane lipids is associated with positive pregnancy outcome. *FASEB Journal* 33:10291-10299. (2019)
- [371] Jamro EL, Bloom MS, Browne RW, Kim K, Greenwood EA, Fujimoto VY: Preconception serum lipids and lipophilic micronutrient levels are associated with live birth rates after IVF. *Reproductive Biomedicine Online* 39:665-673. (2019)
- [372] Matorras R, Martinez-Arranz I, Arretxe E, Iruarizaga-Lejarreta M, Corral B, Ibañez-Perez J, Exposito A, Prieto B, Elortza F, Alonso C: The lipidome of endometrial fluid differs between implantative and non-implantative IVF cycles. *Journal of Assisted Reproductive Genetics* 37:385-394. (2020)
- [373] Chen S, Wang J, Wang M, Lu J, Cai Y, Li B: In vitro fertilization alters phospholipid profiles in mouse placenta. *Journal of Assisted Reproductive Genetics* 36:557-567. (2019)
- [374] Ferreira CR, Pirro V, Eberlin LS, Hallett JE, Cooks RG: Developmental phases of individual mouse preimplantation embryos characterized by lipid signatures using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404:2915-26. (2012)
- [375] Rivron N, Pera M: Debate ethics of embryo models from stem cells. *Nature* 564:106-111. (2018)
- [376] Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917. (1959)
- [377] Hamori M, Stuckensen JA, Rumpf D, Kniewald T, Kniewald A, Marquez M: Early pregnancy wastage following late implantation of embryos after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction* 4:714-717. (1989)
- [378] Shibahara H, Ishiguro A, Inoue Y, Kuwayama T, Iwata H: Mechanism of palmitic acid-induced deterioration of in vitro development of porcine oocytes and granulosa cells. *Theriogenology* 141:54-61. (2020)
- [379] Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BA, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms BJ, Gadella BM: Oleic acid prevents detrimental effects of saturated

- fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biology of Reproduction* 85:62-69. (2011)
- [380] Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E, Uzbekova S: N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology* 85:1625-1634. (2016)
- [381] Abolghasemi A, Dirandeh E, Shohreh B: Dietary conjugated linoleic acid supplementation alters the expression of genes involved in the endocannabinoid system in the bovine endometrium and increases plasma progesterone concentrations. *Theriogenology* 86:1453-1459. (2016)
- [382] Fattahi A, Darabi M, Farzadi L, Salmassi A, Latifi Z, Mehdizadeh A, Shaaker M, Ghasemnejad T, Roshangar L, Nouri M: Effects of dietary omega-3 and-6 supplementations on phospholipid fatty acid composition in mice uterus during window of pre-implantation. *Theriogenology* 108:97-102. (2018)
- [383] Hammiche F, Vujkovic M, Wijburg W, de Vries JH, Macklon NS, Laven JS, Steegers-Theunissen RP: Increased preconception omega-3 polyunsaturated fatty acid intake improves embryo morphology. *Fertility and Sterility* 95:1820-1823. (2011)
- [384] Chiu YH, Karmon AE, Gaskins AJ, Arvizu M, Williams PL, Souter I, Rueda BR, Hauser R, Chavarro JE: Serum omega-3 fatty acids and treatment outcomes among women undergoing assisted reproduction. *Human Reproduction* 33:156-165. (2018)
- [385] Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM: Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine* 7:493-496. (2001)
- [386] Dyakonova V, Carlberg M, Sakharov D, Elofsson R: Anatomical basis for interactions of enkephalins with other transmitters in the CNS of a snail. *Journal of Comprehensive Neurology* 361:38-47. (1995)
- [387] Kavaliers M, Hirst M, Teskey GC: The effects of opioid and FMRF-amide peptides on thermal behavior in the snail. *Neuropharmacology* 24:621-626. (1985)
- [388] Norekian TP, Satterlie RA: FMRFamide and GABA produce functionally opposite effects on prey-capture reactions in the pteropod mollusk *Clione limacina*. *Biology Bulletin* 185:248-262. (1993)
- [389] Dyakonova VE, Sakharov DA: Neurotransmitter basis of mollusc behavior: control of choice between the orienting and the defense response to the presentation of an unfamiliar object. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 25:247-251. (1995)
- [390] Dyakonova VE, Elofsson R, Carlberg M, Sakharov DA: Complex avoidance behaviour and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Genetic Pharmacology* 26:773-777. (1995)

- [391] Kyriakides MA, McCrohan CR: Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurobiology* 20:635-650. (1989)
- [392] Alania M, Sakharov DA, Elliott CJ. Multilevel inhibition of feeding by a peptidergic pleural interneuron in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Comprehensive Physiology* 190:379-390. (2004)
- [393] Murphy AD, Lukowiak K, Stell WK: Peptidergic modulation of patterned motor activity in identified neurons of *Helisoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:7140-7144. (1985)
- [394] Cooke IR, Gelperin A: Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the slug *Limax maximus*. *Cell Tissue Research* 253:69-76. (1988)
- [395] Elekes K, Nässel DR: (1990). Distribution of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell and Tissue Research* 262:177-190. (1990)
- [396] Elekes K, Ude J: An immunogold electron microscopic analysis of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the CNS of *Helix pomatia*: ultrastructure and synaptic connections. *Journal of Neurocytology* 22:1-13. (1993)
- [397] Suzuki H, Kimura T, Sekiguchi T, Mizukami A: FMRF amide-like-immunoreactive primary sensory neurons in the olfactory system of the terrestrial mollusc, *Limax marginatus*. *Cell and Tissue Research* 289:339-345. (1997)
- [398] Ikeda T, Kiss T, Hiripi L, Fujisawa Y, Kubota I, Muneoka Y: *MIP (Mytilus inhibitory peptide) analogues isolated from the ganglia of the pulmonate mollusc Helix pomatia*. In: Shimonishi Y. (ed) *Peptide Chemistry Protein Research Foundation* 357-362. (1990)
- [399] Kobayashi M, Muneoka Y: Structure and action of molluscan neuropeptides. *Zoological Science* 7:801-814. (1990)
- [400] Chen Z, Bogaerts A, Vertes A: Phase explosion in atmospheric pressure infrared laser ablation from water-rich targets. *Applied Physics Letters* 89 (2006)
- [401] Chen Z, Vertes A: Early plume expansion in atmospheric pressure midinfrared laser ablation of water-rich targets. *Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 77:036316. (2008)
- [402] Vertes A, Nemes P, Shrestha B, Barton AA, Chen Z, Li Y: Molecular imaging by mid-IR laser ablation mass spectrometry. *Applied Physics A* 93:885-891. (2008)
- [403] Heeren RM, Smith DF, Stauber J, Kükner-Kaletas B, MacAleese L: Imaging mass spectrometry: hype or hope?. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20:1006-1014. (2009)

- [404] Woods AS, Ugarov M, Egan T, Koomen J, Gillig KJ, Fuhrer K, Gonin M, Schultz JA: Lipid/peptide/nucleotide separation with MALDI-ion mobility-TOF MS. *Analytical Chemistry*, 76:2187-2195. (2004)
- [405] McLean JA, Ruotolo BT, Gillig KJ, Russell DH: Ion mobility–mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry* 240:301-315. (2005)
- [406] Cohen MJ, Karasek FW: Plasma chromatographyTM—a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 8:330-337. (1970)
- [407] McLean JA, Ruotolo BT, Gillig KJ, Russell DH: Ion mobility–mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry* 240:301-315. (2005)
- [408] Clemmer DE, Jarrold MF: Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry* 32:577-592. (1997)
- [409] McLean JA, Ridenour WB, Caprioli RM: Profiling and imaging of tissues by imaging ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 42:1099-1105. (2007)
- [410] Blatherwick EQ, Svensson CI, Frenguelli BG, Scrivens JH: Localisation of adenine nucleotides in heat-stabilised mouse brains using ion mobility enabled MALDI imaging. *International Journal of Mass Spectrometry* 345:19-27. (2013)
- [411] Trim PJ, Henson CM, Avery JL, McEwen A, Snel MF, Claude E, Marshall PS, West A, Princiville AP, Clench MR: Matrix-assisted laser desorption/ionization-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of vinblastine in whole body tissue sections. *Analytical Chemistry* 80:8628-8634. (2008)
- [412] Stauber J, MacAleese L, Franck J, Claude E, Snel M, Kaletas BK, Wiel IMVD, Wisztorski M, Fournier I, Heeren RM: On-tissue protein identification and imaging by MALDI-ion mobility mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21:338-347. (2010)
- [413] Kliman M, May JC, McLean JA: Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811:935-945. (2011)
- [414] Cole LM, Mahmoud K, Haywood-Small S, Tozer GM, Smith DP, Clench MR: Recombinant" IMS TAG" proteins—A new method for validating bottom-up matrix-assisted laser desorption/ionisation ion mobility separation mass spectrometry imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27:2355-2362. (2013)
- [415] Jackson SN, Ugarov M, Egan T, Post JD, Langlais D, Albert Schultz J, Woods AS: MALDI-ion mobility-TOF MS imaging of lipids in rat brain tissue. *Journal of Mass Spectrometry* 42:1093-1098. (2007)

- [416] Trimpin S, Herath TN, Inutan ED, Wager-Miller J, Kowalski P, Claude E, Walker JM, Mackie K: (2010). Automated solvent-free matrix deposition for tissue imaging by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 82:359-367. (2010)
- [417] Shrestha B, Nemes P, Nazarian J, Hathout Y, Hoffman EP, Vertes A: Direct analysis of lipids and small metabolites in mouse brain tissue by AP IR-MALDI and reactive LAESI mass spectrometry. *Analyst* 135:751-758. (2010)
- [418] Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG: Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive desorption electrospray ionization. *Analytical Chemistry* 81:7618-7624. (2009)
- [419] Touboul D, Halgand F, Brunelle A, Kersting R, Tallarek E, Hagenhoff B, Lapr v te O: Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Analytical Chemistry* 76:1550-1559. (2004)
- [420] Sj vall P, Johansson B, Lausmaa J: Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS. *Applied Surface Science* 252:6966-6974. (2006)
- [421] Gattass RF, Mazur E: Femtosecond laser micromaching in transparent materials. *Nature Photonics* 2:219-25. (2008)
- [422] Vogel A, Venugopalan V: Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical Reviews* 103:577-644. (2003)
- [423] Vogel A, Noack J, Huttman G, Paltauf G: Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B* 81:1015-1145. (2005)
- [424] Maxwell S, Mazur E: Nanoprocessing of subcellular targets using femtosecond laser pulses. *Medical Laser Application* 20:193-200. (2005)
- [425] Liu Y, Sun S, Singha S, Cho MR, Gordon RJ: 3D femtosecond laser patterning of collagen for directed cell attachment. *Biomaterials* 26:4597-4605. (2005)
- [426] Milasinovic S, Liu Y, Bhardwaj C, Blaze MTM, Gordon RJ, Hanley L: Feasibility of depth profiling of animal tissue by ultrashort pulse laser ablation. *Analytical Chemistry* 84:3945-3951. (2012)
- [427] Walker AV, Gelb LD, Barry GE, Subanajouy P, Poudel A, Hara M, Veryovkin IV, Bell GI, Hanley L: Femtosecond laser desorption ionization mass spectrometry imaging and multivariate analysis of lipids in pancreatic tissue. *Biointerphases* 13:03B416. (2018)
- [428] Hanley L, Wickramasinghe R, Yung YP: Laser desorption combined with laser postionization for mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto Calif)* 12:225-245. (2019)
- [429] Kuznetsov I, Filevich J, Dong F, Woolston M, Chao W, Anderson EH, Bernstein ER, Crick DC, Rocca JJ, Menoni CS: Three-dimensional nanoscale molecular imaging by extreme ultraviolet laser ablation mass spectrometry. *Nature Communications* 6:6944. (2015)

- [430] Wang J, Liu F, Mo Y, Wang Z, Zhang S, Zhang X: A new instrument of VUV laser desorption/ionization mass spectrometry imaging with micrometer spatial resolution and low level of molecular fragmentation. *Review of Scientific Instruments* 88:114102. (2017)
- [431] Wang J, Wang Z, Liu F, Cai L, Pan JB, Li Z, Zhang S, Chen HY, Zhang X, Mo Y: Vacuum ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of single cells with submicron craters. *Analytical Chemistry* 90:10009-10015. (2018)
- [432] Müller R, Kuznetsov I, Arbelo Y, Trottmann M, Menoni CS, Rocca JJ, Patzke GR, Bleiner D: Depth-profiling microanalysis of CoNCN water-oxidation catalyst using a $\lambda = 46.9$ nm plasma laser for nano-ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 90:9234-9240 (2018)
- [433] Cui Y, Bhardwaj C, Milasinovic S, Carlson RP, Gordon RJ, Hanley L: 2013. Molecular imaging and depth profiling of biomaterials interfaces by femtosecond laser desorption/ionization mass spectrometry. *ACS Applied Material Interfaces* 5:9269-275 (2013)
- [434] Cui Y, Veryovkin IV, Majeski MW, Cavazos DR, Hanley L: High lateral resolution versus molecular preservation in near-IR fs-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 87:367-371 (2015)
- [435] Milasinovic S, Cui Y, Gordon RJ, Hanley L: Internal energy of thermometer ions formed by femtosecond laser desorption: implications for mass spectrometric imaging. *Journal of Physical Chemistry C* 118:28938-28947 (2014)
- [436] Flanigan P, Levis R: Ambient femtosecond laser vaporization and nanosecond laser desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto Calif)* 7:229-256. (2014)