Excitátoros aminosav neurotranszmitterek meghatározása biológiai mintákból kapilláris elektroforézissel

Doktori értekezés

Dr. Wagner Zsolt

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár, DSc
Hivatalos bírálók:	Dr. Kilár Ferenc, egyetemi tanár, DSc Dr. Gergely András, egyetemi docens, CSc
Szigorlati bizottság elnöke:	Takácsné Dr. Novák Krisztina, egyetemi tanár, DSc
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Riba Pál, egyetemi adjunktus, PhD Dr. Németh Krisztina, tud. munkatárs, PhD

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék **2**
Rövidítések jegyzéke **4**
1 Bevezetés **5**
1.1 Excitátoros aminosav neurotranszmitterek 5
1.1.1 Az aszpartát funkciója a neurotranszmisszióban 8
1.1.2 Az excitátoros aminosavak D-enantiomerjei 9
1.2 Mikrodialízis 11
1.3 Az excitátoros aminosavak analitikai vizsgálata 14
1.3.1 Bioszenzoron alapuló eljárások 14
1.3.2 Elválasztástechnikai eljárások 15
1.4 Kapilláris elektroforézis alapelvei 16
1.4.1 A készülék elvi felépítése 17
1.4.2 A kapilláris elektroforézis elméleti háttere 18
1.4.3 Elektromigráción alapuló technikák sajátosságai 19
1.4.4 Kapilláris elektroforézis technikák csoportosítása 20
1.5 A királis kapilláris elektroforézis 21
1.5.1 Az enantiomer elválasztás alapja: 22
1.5.2 Királis elválasztást befolyásoló tényezők 23
1.5.2.1 EOF 23
1.5.2.2 Királis szelektor töltése 24
1.5.2.3 Több királis szelektor jelenléte 24
1.5.3 Királis szelektorok 25
1.5.3.1 Ciklodextrinek 25
1.5.3.2 Egyéb királis szelektorok 26
1.6 Detektálás 27
1.7 Fluoreszcens származékképzés 29
1.7.1 Származékképzőkkel szemben támasztott követelmények: 31
1.7.2 Fluoreszcens származékképző vegyületek csoportosítása 32
1.7.2.1 Fluorogén származékképzők 34
1.7.2.2 Fluorofór származékképzők 35
2 Célkitűzések **37**
3 Módszerek **38**
3.1 Felhasznált anyagok 38
3.2 Készülékek 39
3.3 Származékképzés 39
3.3.1 NBD-F 39
3.3.2 FITC 40
3.3.3 CFSE 40
3.4 Elválasztási körülmények 40
3.5 Állatkísérletek 41
3.5.1 Mikrodialízis szonda beültetése 41
3.5.2 Mikrodialízis kísérletek 41
3.5.3 Szövetminták 42
3.6 Módszervalidálás 42
3.7 Statisztikai és számítási módszerek 43

4 Eredmények 44
4.1 Aszpartát és glutamát akirális elválasztása 44
4.1.1 NBD-F származékok elválasztása 44
4.1.2 FITC származékok elválasztása 47
4.1.3 CFSE származékok elválasztása 48
4.1.4 Módszervalidálás 49
4.1.5 Mikrodializátumok vizsgálata 52
4.2 Aszpartát és glutamát extracelluláris koncentrációváltozásának *in vivo* vizsgálata 53
4.2.1 Az aszpartát és a glutamát koncentráció változása a mikrodializátumban stressz hatására 54
4.2.2 Az aszpartát és a glutamát koncentráció változása a mikrodializátumban KCl hatására 55
4.3 Aszpartát és glutamát királis elválasztása 57
4.3.1 Aszpartát és glutamát egyidejű elválasztása királis szelektorok jelenlétében 57
4.3.2 Aszpartát és glutamát egyidejű elválasztása kettős ciklodextrin rendszerben 59
4.3.3 Módszer validálás 60
4.3.4 Biológiai minták vizsgálata 62
5 Megbeszélés 64
5.1 Aszpartát és glutamát egyidejű akirális elválasztása 64
5.1.1 Származékképzés 64
5.1.2 Elválasztás 64
5.1.3 Módszer validálás 65
5.1.4 NBD-F származékok elválasztása 67
5.1.5 FITC származékok elválasztása 69
5.1.6 CFSE származékok elválasztása 71
5.2 Aszpartát és glutamát extracelluláris koncentrációváltozásának *in vivo* vizsgálata 72
5.3 Aszpartát és glutamát királis elválasztása 75
5.3.1 Királis elválasztás optimalizálása 76
5.3.1.1 Királis elválasztás natív ciklodextrinek és származékaik jelenlétében 76
5.3.1.2 Királis elválasztás ionos ciklodextrinek jelenlétében 77
5.3.1.3 Királis elválasztás kettős ciklodextrin rendszer jelenlétében 78
5.3.2 Módszervalidálás 79
5.3.3 Szövetminták vizsgálata 81
6 Következtetések 82
7 Összefoglalás 84
Summary 85
8 Irodalomjegyzék 86
9 Saját közlemények 101
Az értekezés témájában megjelent közlemények 101
Egyéb közlemények 101
10 Köszönetnyilvánítás 102

Rövidítések jegyzéke

APOC: (+/-)-1-(9-antranil)-2-propil-kloroformát

ACSF: mesterséges gerincvelő folyadék

AMPA: 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)-propánsav

CBQCA: 3-(4-karoboxibenzoil)-2-kinolin-karboxaldehid

CEC: kapilláris elektrokinetikus kromatográfia

CFSE: 5-karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter

CGE: kapilláris gélelektroforézis

CMC: kritikus micellaképződési koncentráció

CIEF: kapilláris izoelektromos fókuszálás

CITP: kapilláris izotachoforézis

CZE: kapilláris zónaelektroforézis

DDO: D-aszpartát oxidáz

DM-β-CD: heptakis-(2,6-di-O-metil)-β-ciklodextrin

DMSO: dimetil-szulfoxid

DTAF: 5-(4,6-diklorotriazinilamino)-fluoreszcein

EOF: elektroozmotikus áramlás

FITC: fluoreszcein izotiocianát

FQ: 5-furoilkinolin-3-karboxaldehid

GABA: γ-amino-vajsav

HP-β-CD: (2-hidroxi-propil)-β-ciklodextrin

HPA-β-CD: 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxil)propilamino-β-ciklodextrin

IS: belső standard

LIF: lézerindukálta fluoreszcencia

LOD: detektálási határ

LOQ: kvantitálási határ

LTP: hosszú távú potencírozás

MEKC: micelláris elektrokinetikus kromatográfia

NBD-Cl: 7-klór-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol

NBD-F: 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol

NBD-OH: 7-hidroxi-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol

NDA: 2,3-naftalindialdehid

NMDA: N-metil-D-aszpartát

OPA: orto-ftálaldehid

RM-β-CD : random metilált-β-ciklodextrin

SAMF: 6-oxi-(N-szukcinimidil acetát)-9-(2′-metoxi-karbonil)-fluoreszcein

SDS: nátrium-laurilszulfát

SIFA: N-hidroxiszukcinimidil-fluoreszcein-O-acetát

SVZ: szubventrikuláris zóna

TEMED: N,N,N’,N’-tetrametil-etiléndiamin

TM-β-CD: heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciklodextrin

TTX: tetrodotoxin

VGLUT: vezikuláris glutamáttranszporter

α: enantioszelektivitás

β-CD: β-ciklodextrin

γ-CD: γ-ciklodextrin

μ: elektroforetikus mobilitás

μ_{app}: látszólagos mobilitás

μ_{eff}: effektív mobilitás

1 Bevezetés

Az idegsejtek közti kommunikáció alapja a kémiai ingerületátvitel (neurotranszmisszió), mely specifikus vegyületek, valamint e vegyületekre szelektív receptor fehérjék révén valósul meg. Napjainkra számos jelátvivő molekulát (neurotranszmittert) és receptoraikat azonosították, azonban a központi idegrendszer működésében betöltött pontos szerepük jelenleg is csak részben ismert. Számos kutatás irányul az összetettebb agyi folyamatok neurokémiai hátterének tisztázására. A mechanizmusok pontosabb feltérképezése és megértése hozzásegíthet új támadáspontú gyógyszerek tervezéséhez, illetve a már terápiában alkalmazott hatóanyagok hatásmódjának értelmezéséhez.

A XX. század közepétől kezdve folyamatosan gyűltek a kísérletes bizonyítékok arra vonatkozóan, hogy egyes, fehérjealkotóként és metabolikus intermedierként ismert aminosavak kémiai ingerületátvivő funkciót is betöltenek. Miután az 1970-es években a glicin gerincvelői gátló neurotranszmitter szerepét igazolták, a tudományos érdeklődés a feltételezett serkentő és gátló neurotranszmitter aminosavak felé fordult.

Jelenleg számos olyan aminosavról tudunk melyek ingerületátvivő, vagy azt befolyásoló (neuromodulátor) szereppel bírnak. Két idegsejt közötti gyors ingerület átvitel jellemzően ioncsatorna-receptorokhoz kötött folyamat. A serkentő transzmitterek a receptor kötődést követően depolarizálják, míg a gátló transzmitterek hiperpolarizálják a sejtmembránt. Míg a glutamát és az aszpartát a legfontosabb serkentő (excitátoros) neurotranszmitterek, a GABA és a glicin neurotranszmissziót gátló (inhibitoros) hatással rendelkeznek a központi idegrendszerben.

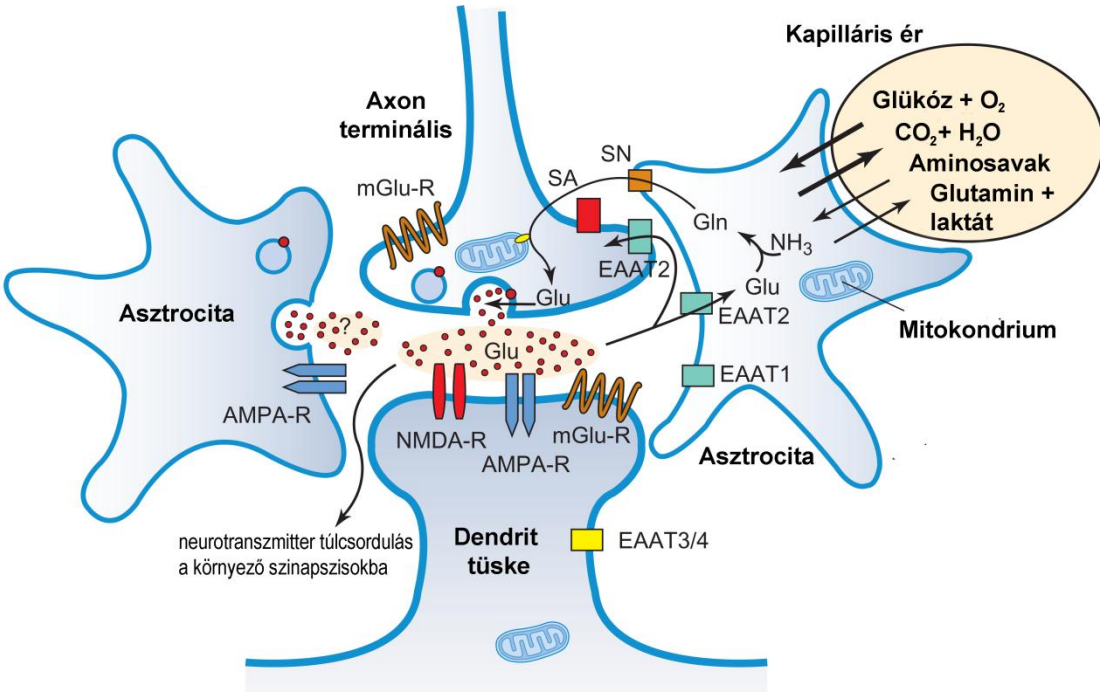
1.1 Excitátoros aminosav neurotranszmitterek

Régóta ismert, hogy a glutamát és az aszpartát a többi szövethez képest a központi idegrendszerben rendkívül magas koncentrációban van jelen [1]. Elsőként 1959-ben Curtis és Watkins írta le a glutamát és az aszpartát gerincvelői neuronokon tapasztalt ingerlő tulajdonságait és vetették fel annak lehetőségét, hogy e két fehérjealkotóként ismert aminosav az agykéregben serkentő hatású jelátvivő molekulaként is funkcionálhat [2,3]. Az immunhisztokémiai vizsgálatok fejlődésével a későbbiekben

kimutatták, hogy a központi idegrendszert közel 80%-ban glutamáterg neuronok alkotják [4]. A glutamát és az aszpartát közös jellemzője, hogy nagy koncentrációban a posztszinaptikus neuronok „túlingerlésével" következményes sejthalált okoznak. Ezt a jelenséget excitotoxicitásnak nevezzük, és számos patológiás állapot hátterében kimutatható [5].

A glutamát jelenlegi tudásunk szerint a központi idegrendszer legjelentősebb excitátoros neurotranszmittere. Három ioncsatorna kapcsolt (ionotróp), és nyolc G-fehérje kapcsolt (metabotróp) receptora ismert [6]. Az ioncsatornák közül az AMPA receptoroknak a gyors ingerületátvitelben van szerepe, míg az NMDA receptorok aktiválódása elnyújtottabb hatású depolarizációt okoz, amely hosszabb távú folyamatok, mint például a szinaptikus plaszticitás alapját képezi [1]. Szinaptikus plaszticitás alatt értjük az egyes neuronok közti kapcsolatok dinamikus kialakulását-megszűnését, illetve a neuronok ingerlő vagy gátló stimulusra adott időben változó válaszát. A szinaptikus plaszticitás egyik fontos eleme a hosszú távú potencírozás (LTP) mely a serkentő kapcsolatok stabilizálódása révén alakul ki. Mindezen folyamatok révén valósulnak meg a magasabb rendű szervezetekre jellemző kognitív funkciók, többek között a memória kialakulása vagy a tanulás is [7].

A glutamát a klasszikus neurotranszmitterekhez (pl. acetilkolin, monoaminok, stb.) hasonlóan nagy koncentrációban kimutatható a végkészülékekben található szinaptikus vezikulákban. Kísérletes úton magas extracelluláris K^+-koncentráció jelenlétében kiváltható felszabadulása Ca^{2+}-függő jelleget mutat, ami Na^+-csatorna gátló hatású tetrodotoxinnal (TTX) megszűntethető [8]. A felszabaduló glutamát molekulák a receptorokhoz való kötődése ioncsatornák esetében a csatornák nyitását, míg a metabotróp recetorok esetén a kapcsolt G-fehérje aktivitásváltozását eredményezi. A szinaptikus résbe ürülő glutamátot a környező asztrociták membránjában található transzporterek (EAAT) veszik vissza. Az asztrocitákban a glutamát glutaminná alakul, és specifikus transzportereken keresztül újból visszakerül a neuronba, ahol ismét glutamáttá alakul. Abban az esetben, amikor egyszerre nagy mennyiségű glutamát ürül a szinaptikus résbe, a transzporterek telítődnek, és a glutamát átdiffundál a környező szinapszisokba, valamint a távolabbi extracelluláris térbe. Ez az ún. spillover-jelenség (1. ábra) [1].



1. ábra A glutamát által közvetített neurotranszmisszió (Az ábra forrása: [1]). A szinaptikus végkészülékben glutamát tartalmú vezikulái akciós potenciál hatására fuzionálnak a sejtmebránnal és tartalmuk a szinaptikus résbe ürül. A glutamát a posztszinaptikus dendritikus tüskén található ionotróp (AMPA, NMDA), illetve metabotróp (mGlu-R) receptorokhoz kötődhet, valamint felvevődhet a specifikus glutamát transzportereken keresztül (EAAT 3/4). A felszabadult glutamátot szinapszis közelében lévő asztrociták specifikus transzportereik révén (EAAT 1/2) felveszik, majd enzimatikus úton glutaminná alakítják. A glutamin az asztrocitákból transzportereken keresztül (SA, illetve SN) ismét a szinaptikus végkészülékbe kerül vissza, ahol a mitokondriális glutamináz enzim glutamáttá alakítja. A glutamát az EAAT2 transzporter révén közvetlenül is visszavevődhet a szinaptikus végkészülékbe. Nagy mennyiségű transzmitterürülés esetén a glutamát molekulák eljutnak a környező szinapszisokhoz is.

Számos betegség, mint pl. az epilepszia vagy a skizofrénia hátterében a glutamáterg rendszer abnormális működését feltételezik [5,6]. Bár jelenleg is számos olyan gyógyszer van forgalomban, amely részben glutamát receptorokon is hat, mint jövőbeli potenciális terápiás célpont, a glutamáterg rendszer farmakológiai befolyásolása több problémát is felvet. Tisztán agonista vegyületek súlyosan neurotoxikus hatásúak, míg az ismert antagonista vegyületek skizofrénia-szerű tüneteket okoznak [6]. A jövőben a szabályozó, modulátor hatású vegyületek kaphatnak nagyobb szerepet, ehhez azonban szükséges feltárni a fiziológiás, illetve patológiás állapotok mögött húzódó szabályzó mechanizmusokat.

1.1.1 Az aszpartát funkciója a neurotranszmisszióban

Az aszpartátot mint lehetséges jelátvivő molekulát a glutamáttal közel egy időben fedezték fel. Közös excitátoros tulajdonságuk révén régóta feltételezik, hogy fontos szerepet tölthet be a serkentő pályarendszerek működésében. Heves vita tárgya azonban az a kérdés, hogy vajon az aszpartátot sorolhatjuk-e a klasszikus neurotranszmitterek közé. Míg a glutamát szinte minden serkentő pályarendszerben megtalálható, az aszpartát csak bizonyos pályarendszerekben fordul elő, kizárólag a glutamáttal együtt. Az aszpartát a szinaptikus végkészülékekben nagy koncentrációban kimutatható, ugyanakkor sem tisztán aszpartáterg neuronok, sem pedig aszpartátra specifikus receptorok létezését eddig még nem bizonyították [9]. Egyes szerzők felvetik annak lehetőségét, hogy a végkészülékekben a transzmitterek eltérő vezikulákban raktározódhatnak [10,11]. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a vezikuláris glutamát transzporterfehérjének (VGLUT) az L-aszpartát nem szubsztrátja [12]. Szintén fontos különbség, hogy az aszpartát hatása NMDA receptor-specifikus, az AMPA, illetve kainát receptorokhoz minimális affinitással képes kötődni [13,14].

A legtöbb ellentmondás azonban a felszabadulás pontos mechanizmusát övezi. Számos szerző az aszpartát felszabadulást nem találta Ca^{2+}-függő folyamatnak [15-17], míg mások ennek ellenkezőjét bizonyították [18-20]. Egy lehetséges elmélet szerint az aszpartát felszabadulás valójában egy kifelé irányuló transzportfolyamat, amely a korábban felszabadult glutamát visszavételéhez kötődik. Ez a mechanizmus magyarázatot adhat a látszólagos Ca^{2+}-függő felszabadulásra. Az aszpartát, valamint a glutamát felszabadulásának kinetikája azonban különböző támadáspontú gátlószerek jelenlétében eltérően változik, ami arra utal, hogy az aszpartát felszabadulás nem függ szigorúan a glutamát felszabadulástól, és a felszabadulásért felelős molekuláris mechanizmusok eltérőek lehetnek a két neurotranszmitter esetében [21].

Számos kísérlet az aszpartát exocitózis útján történő felszabadulását is megkérdőjelezi. Ezen kísérletekben kétféle toxin hatását vizsgálták. A Clostridium toxin a transzmitter vezikulák plazmamembránnal történő fúzióját gátolja meg, míg a bafilomycin A_1 a vezikuláris transzportban szerepet játszó H^+-ATP-áz transzportert gátolja. Míg a glutamát felszabadulását mindkét toxin gátolta, az aszpartát felszabadulás ezen toxinok jelenlétében nem csökkent [22].

A kísérleti eredmények értelmezésére Bradford és munkatársai az aszpartát és a glutamát eltérő neurobiológiai funkcióját alapul véve a következő magyarázatot adták:

- Az aszpartát felszabadulás részben exocitózis útján, részben transzporterek révén valósul meg. Az exocitózis kiváltható magas extracelluláris K^+ koncentrációval.
- A neuronok végkészülékeiben az aszpartát és a glutamát eltérő vezikulákban raktározódnak. Az aszpartát tartalmú vezikulák exocitózisa Clostridium toxin inszenzitív, ugyanakkor Ca^{2+}-függő jelleget mutat
- Az aszpartát felszabadulás nem korlátozódik a szinapszisokra, hanem az axon terminális egész területén végbemehet.
- A felszabaduló aszpartát fő funkciója az extraszinaptikus NMDA receptorok aktiválása. Az extraszinaptikus NMDA receptorok szerepet játszanak az excitotoxicitás kialakulásában [23], valamint az axonális [24] és a dendritikus [25] növekedés szabályozásában.
- Ezen tulajdonságok alapján feltételezhető, hogy míg a glutamát a gyors neurotranszmisszióért felelős, az aszpartát sokkal inkább szabályzó, ún. neuromodulátor funkciót tölt be.

Mindezen eredményeket figyelembe véve az aszpartát legfontosabb szerepe a glutamát közvetítette gyors neurotranszmisszió szabályozásában lehet.

1.1.2 Az excitátoros aminosavak D-enantiomerjei

Az aminosavak a glicin kivételével királis molekulák, vagyis két azonos kémiai és fizikai tulajdonságokkal bíró, de egymásba átalakulni nem képes formát különböztethetünk meg, melyek egymás tükörképi párjai. A tükörképi párokat, vagy más néven enantiomereket L- és D- előtaggal jelöljük. Az élő szervezetek evolúciója során az aminosavak L-formája vált a fehérjék kizárólagos építőkövévé. Ez az evolúciós szelekció garantálja a fehérjék specifikus térszerkezetének kialakulási lehetőségét. A szintetizálódó fehérjébe ugyanis a véletlenszerűen beépülő D-, illetve L-enantiomerek a funkció szempontjából kulcsfontosságú harmad- és negyedleges térszerkezet kialakulását lehetetlenné tennék [26]. Sokáig úgy tartották, hogy az élő szervezetekben kizárólag metabolikusan inert szövetek (dentin, szemlencse) fehérjéiben fordulnak elő

D-aminosavak, ahol spontán racemizációval keletkeznek [27,28]. Az egyedüli ismert kivételt hosszú ideig a baktériumok képezték, amelyek peptidoglikán-szintézise, valamint egyes antibiotikumok termelése során D-aminosavakat is képesek beépíteni a fehérjeláncba [29]. Az analitikai módszerek érzékenységének fejlődésével azonban nyilvánvalóvá vált, hogy bizonyos D-aminosavak - igaz jóval alacsonyabb koncentrációban - szabad formában is előfordulnak számos szövetféleségben. Elsőként puhatestűekben mutattak ki nagyobb koncentrációban D-aminosavakat [30,31], további kutatások pedig igazolták, hogy különösen a D-szerin és a D-aszpartát emlősök és madarak agyszövetében is jelen van [32-35]. Míg azonban a D-szerin neuromodulátor funkcióját széles körben tanulmányozzák [36,37], a D-aszpartát pontos szerepe jelenleg kevéssé ismert.

Emlősök és madarak esetében korai embrionális és újszülött korban agyszövetből kiugróan magas D-aszpartát szinteket mutattak ki, amely azonban a posztnatális fejlődési szakaszban meredeken csökkent [32,34,38-41]. Hashimoto és munkatársai humán embriókon végzett vizsgálatai során a 14. gesztációs héten az agykéregben mérhető D-, valamint L-aszpartát mennyiségét közel azonosnak találta (D-aszpartát: 0,36 μmol/g; L-aszpartát: 0,21 μmol/g) [42]. Ezen eredmények alapján számos szerző arra következtetett, hogy a D-aszpartát szerepet játszhat az idegrendszer korai fejlődésében. [34,43,41,44,35,45]. A D-aszpartát *de novo* szintéziséért jelenlegi ismereteink szerint az aszpartát racemáz enzim felelős, míg a lebontását a savas karakterű D-aminosavakra (D-aszpartát, D-glutamát, N-metil-D-aszpartát) specifikus D-aszpartát oxidáz (DDO) enzim végzi. A D-aszpartát felszabadulási mechanizmusa kevéssé ismert, bár egyes aspektusaiban a klasszikus neurotranszmitterekhez hasonló felszabadulás figyelhető meg [35]. Patkány hippocampusából származó neuronokon vizsgálva a D-aszpartát gátolta az AMPA receptorokat, míg az L-aszpartát ugyanezt a jelenséget nem mutatta [46]. Az aszpartát racemáz expressziójának blokkolása egerekben gátolta az idegsejtek dendritikus fejlődését, valamint csökkentette ezen sejtek életképességét [44]. A D-aszpartát szintjének növelésével (orális adagolás, DDO génkiütés) rövid távon a kísérleti állatok memóriafunkciójában szignifikáns javulás volt megfigyelhető [47-49]. Mindezen kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a D-aszpartát a korai embrionális idegrendszeri fejlődésben játszott szerepe mellett neuromodulátorként szabályozhatja a felnőttkori neurogenezist és a neuroplaszticitást

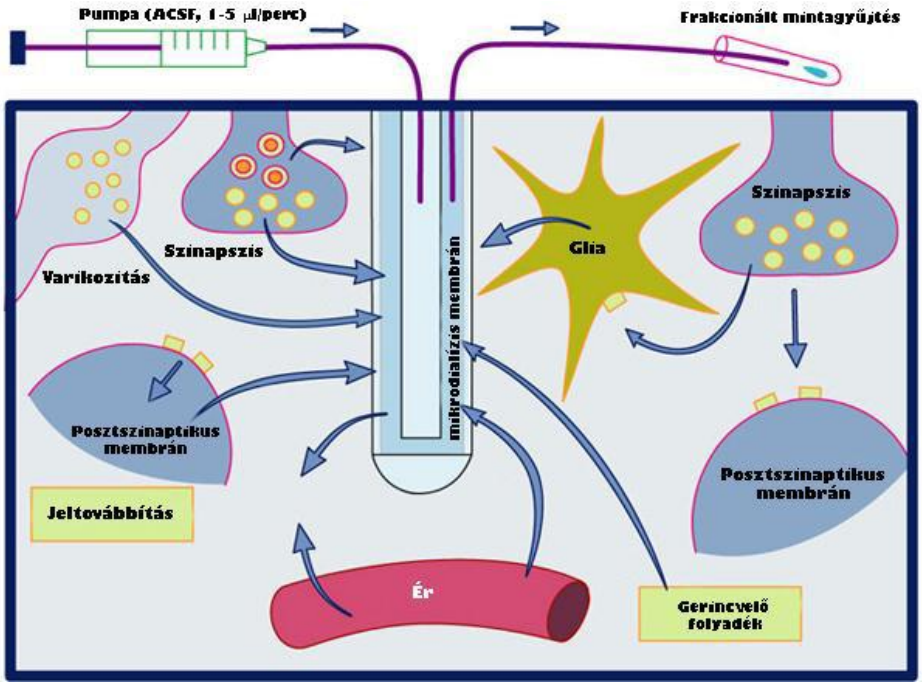
[50,51]. Mindezen folyamatok pontosabb megismerése érdekében azonban további vizsgálatok szükségesek.

D-glutamátot először Kera és munkatársai mutattak ki patkány máj-, vese-, valamint agyszövetekből [52]. Vizsgálataikban az egyes állatok szöveteiben mért D-glutamát mennyiség minden esetben meghaladta a D-aszpartát mennyiséget. A szerzők ugyanakkor nem tudták egyértelműen kizárni az általuk mért D-glutamát koncentrációk táplálék eredetét. Jelenleg D-glutamát előállításért felelős enzim nem ismert, így az endogén eredetre való bizonyítékok is hiányoznak. Élettani folyamatokban betöltött szerepéről nem rendelkezünk információval [53].

1.2 Mikrodialízis

Kísérleti állatokban az agyszövet extracelluláris környezetének *in vivo* vizsgálatára a mikrodialízis módszere napjainkban rutinszerűen alkalmazott eljárás. Alapjait 1972-ben Delgado és munkatársai dolgozták ki [54], szélesebb körben azonban csak a nyolcvanas évek végétől, a technológia és a kapcsolódó analitikai módszerek robbanásszerű fejlődésével terjedt el. Viszonylagos egyszerűsége és széles alkalmazhatósági köre révén neurokémiai [55], metabolomikai [56], valamint farmakokinetikai [57] vizsgálatokban is jelentős szerepet kap.

A mikrodialízis kísérletek során a vizsgálandó szövetbe egy olyan speciális kialakítású szondát ültetnek, melynek egy rövid szakasza szemipermeábilis membránból áll. A szondán keresztül perfúziós folyadékot áramoltatva a szöveti extracelluláris térben található alacsony molekulatömegű komponensek koncentráció-gradiensüknek megfelelően képesek a membránon keresztül a folyadékáramba diffundálni, míg a nagyobb molekulatömegű fehérjék és egyéb makromolekulák számára a membrán barriert képez. A perfúziós folyadék frakcionált gyűjtésével az extracelluláris környezet összetételének időbeli változása vizsgálható. A mikrodialízis kísérlet elvi felépítését az alábbi ábra foglalja össze (2. ábra).



2. ábra Mikrodialízis folyamata (Az ábra forrása: http://www.labautopedia.org). A szonda az extracelluláris térrel teremt közvetlen kapcsolatot. Az abban oldott alacsony molekulatömegű komponensek koncentráció gradiensüknek megfelelően képesek a szonda féligáteresztő membránján keresztül a perfúziós folyadékba diffundálni. Az extracelluláris térben található komponensek részben a környező szinapszisokból, illetve varikozitásokból felszabaduló neurotranszmitterek, részben pedig az anyagcserefolyamatokban résztvevő metabolitok, hormonok, valamint növekedési faktorok. A koncentrációgradiensnek megfelelően lehetőség van az perfúziós folyadékból történő ellenirányú diffúzióra is. A perfúziós folyadék frakcionált gyűjtésével az extracelluláris komponensek időbeli koncentrációváltozása követhető.

A mikrodialízis szondán keresztül a gyakorlatban valamilyen, a fiziológiás viszonyoknak megfelelő ion-összetételű folyadékot (Ringer-oldat, mesterséges gerincvelő folyadék stb.) perfundálnak, annak érdekében, hogy a szöveti homeosztázist a lehető legkevésbé zavarják meg. Tipikusan 1-5 µl/perc átfolyási sebességet alkalmazva az időbeli felbontástól függően néhány mikroliter térfogatú minták nyerhetőek. A dialízis membránon keresztül történő diffúzió alapvetően nem egyensúlyi folyamat [58]. A dializáló szonda *in vitro* extrakciós hatásfoka jellemzően 20 és 80 % között mozog, értéke vegyületenként eltérő és függ a szonda geometriájától, az átfolyás sebességétől és az alkalmazott membrán pórusméretétől. Az *in vitro* meghatározott extrakciós hatásfok ugyanakkor nehezen vonatkoztatható *in vivo* körülményekre [59,60]. Ebből adódóan a módszer a vizsgált vegyületek extracelluláris térbeni abszolút koncentrációjának pontos meghatározására nem alkalmas, azonban az egyes stimulusok hatására bekövetkező, egy alapkoncentrációhoz képest megfigyelhető változás jól

mérhető. A gyakorlatban ezért a változást a kezelést megelőzően mérhető alapkoncentrációhoz viszonyítva százalékos értékben adják meg.

Az ingerületátviteli folyamatok során felszabaduló neurotranszmitterek mikrodialízissel követhetők, így az egyes transzmitterek felszabadulásának mechanizmusa, valamint az idegi folyamatokban betöltött szerepük vizsgálható. A mikrodialízis szonda mértéből adódóan azonban csak nagyobb, szöveti szempontból egységesebb agyterületek (patkány esetében pl. a substantia nigra, nucleus accumbens vagy az eminentia mediana) vizsgálhatók ezzel a módszerrel. A kísérletet megelőzően 1-2 nappal történik a szonda beültetése, megfelelő időt hagyva a felépülésre.

A mikrodialízis széles körben történő elterjedését más vizsgálómódszerekkel szembeni számos előnye indokolta. Ilyen vitathatatlan előny, hogy a módszer éber, mozgásukban nem akadályozott állatokon is alkalmazható, így kiválóan alkalmas egyes viselkedésformák, vagy tanulási folyamatok komplex neurokémiai hátterének tanulmányozására. A gyakorlatban szinte az összes neurotranszmitter (monoaminok [61], acetilkolin [62], aminosavak [63], neuropeptidek [64]), valamint ezek metabolitjai [65] is vizsgálhatók. Mivel a membrán nagyobb méretű fehérjékre átjárhatatlan, a mintafrakciók enzimatikusan stabilak, a minták pedig közvetlenül mérhetőek, nincs szükség további fehérjementesítésre vagy előkészítésre. Tekintve, hogy a diffúzió kétirányú, lehetőség nyílik a vizsgált szövetek lokális, farmakológiai befolyásolására is.

Vitathatatlan előnyei ellenére azonban a mikrodialízis számos hátránnyal is rendelkezik. A mikrodializátumokban jelen lévő neurotranszmitterek koncentrációja rendkívül alacsony, jellemzően a mikromólos és az az alatti tartományban mozog [66]. Az áramlási sebesség csökkentésével az extrakciós hatásfok növelhető ugyan, de ekkor a lassan mozgó folyadékoszlopban bekövetkező diffúzió következtében az időbeli felbontás torzul. A megfelelő időbeli felbontás elérése nagyszámú, kis mintatérfogatú mikrodializátumot eredményez, melyek vizsgálatához megfelelő analitikai módszer szükséges. A mikrodialízis alapvetően invazív vizsgálati módszer, amely következményes sejt- és szövetkárosodással jár [67]. A dialízis szonda beültetését követően időlegesen sérül a vér-agy gát, valamint egyes szerzők a beültetés környezetében erőteljes gliasejt-proliferációt észleltek [68]. A fokozott proliferáció és a kialakuló gyulladási folyamat gátat szabhat a transzmitterek diffúziójának. A dialízis

folyamata számos, a környező sejtek életfolyamataihoz szükséges molekula átmeneti koncentrációcsökkenését okozza. Bár a perfúziós folyadék a környezet ionháztartását nem befolyásolja, nem teljesen ismert, hogy a lokális metabolitok (glükóz, laktát stb.), valamint növekedési faktorok átmeneti koncentrációcsökkenése milyen hatással van a vizsgált transzmitterek felszabadulására. Szintén vitatott, hogy a mikrodializátumban mérhető transzmitter-koncentráció változások mennyiben tükrözik a szinaptikus transzmissziót. A transzmitterek sejtekbe történő újrafelvételét, valamint lebontását végző transzporterfehérjék és enzimek ugyanis folyamatosan jelen vannak, és befolyásolhatják a transzmitterek extracelluláris koncentrációját [67].

Hátrányai ellenére a mikrodialízis jelenleg is elterjedt vizsgálómódszer az idegtudományokban, alkalmazásával a neurotranszmisszióra vonatkozó értékes információk nyerhetőek.

1.3 Az excitátoros aminosavak analitikai vizsgálata

Komplex összetételű mintamátrixokból történő meghatározás mindig komoly kihívás elé állítja az analitikus szakembert. Különösen igaz ez abban az esetben, amikor a vizsgálandó vegyületek semmilyen különleges kémiai vagy fizikai tulajdonsággal nem rendelkeznek. Az excitátoros aminosavak meghatározását alacsony koncentrációjuk, valamint a biológiai mintában nagy feleslegben jelenlévő számos amin-, illetve aminosav vegyület rendkívül megnehezíti [66,69].

1.3.1 Bioszenzoron alapuló eljárások

Az excitátoros aminosav neurotranszmitterek egyik lehetséges *in vivo* vizsgálati módja a bioszenzoron alapuló módszer. Az eljárás lényege, hogy az egyes transzmitterek enzimatikus oxidációja közben keletkező hidrogén peroxid molekulák mikroelektróddal detektálhatók. Egy jellemzően 20-50 μm átmérőjű platinaelektródot vonnak be valamilyen polimerrel, amelybe a vizsgálni kívánt transzmitterre specifikus enzimeket inkorporálják. A beültetett mikroelektród így a környezetében lévő transzmitter molekulákat enzimatikus lebontásuk révén érzékeli. A keletkező hidrogén-peroxidot tipikusan +500 mV alkalmazott feszültség mellett detektálják [70]. A mikroelektródák méretéből adódóan a mikrodialízis módszerhez képest kisebb agyterületek is

tanulmányozhatók. Hátránya ugyanakkor, hogy számos transzmitter esetén nincs, vagy csak kevéssé specifikus oxidáz enzim (pl. D-aminosav oxidáz) áll rendelkezése. Az extracelluláris környezet bonyolult összetétele miatt az elektródok *in vitro* kalibrációja valamint szelektivitásának vizsgálata problematikus. Nagy háttérzajból adódóan a módszer érzékenysége elmarad a mikrodialízisétől, jellemzően a mikromól feletti tartomány vizsgálható megfelelően [70].

1.3.2 Elválasztástechnikai eljárások

Az elválasztástechnikai eljárások során a vizsgálandó vegyületek valamely fizikai vagy kémiai tulajdonságát használjuk fel arra, hogy egy megfelelően megválasztott rendszerben a többi komponenstől eltérő sebességgel vándoroljanak. Az eltérő vándorlási sebesség következtében nyílik lehetőség ezen vegyületek szelektív detektálására. Napjainkban az idegtudományi kutatásokban a neurotranszmitterek meghatározását szinte kizárólag valamely elválasztástechnikai módszer segítségével végzik.

Számos gáz-, valamint folyadékkromatográfiás eljárás ismert, melyeket aminosavak és rokon vegyületeik meghatározására dolgoztak ki. Viszonylag magasabb mintatérfogat igényük miatt ezen módszerek mikrodializátumok vizsgálatára kevésbé használatosak. Gázkromatográfiás vizsgálat során az alacsony volatilitású aminosavak nehezen vizsgálhatók, a biológiai minták magas víztartalmuk miatt pedig bonyolult előkészítést igényelnek. A folyadékkromatográfián alapuló módszerek jól reprodukálhatóak és robusztusak, a kiforrott tömegspektrometriás detektálási technika révén pedig értékes információk nyerhetőek a minta összetételére vonatkozóan is. Ugyanakkor a megfelelő elválasztás gyakran hosszú analízisidőt és viszonylag nagy mintatérfogatot igényel. Biológiai mintákban jelen lévő aminosavak királis folyadékkromatográfiás analízisére döntően két eljárás terjedt el [70]. A korai módszerek az aminosav enantiomerek indirekt elválasztását N-acetil-L-cisztein jelenlétében orto-ftálaldehiddel (OPA) történő származékképzést követően valósították meg. A redukáló ágens enantiomer-tisztaságának biztosítása mellett nehézséget okozott az aszpartát és a glutamát enantiomerek egyidejű elválasztása. További problémát jelentett a származékok fokozott instabilitása. Ezen módszereket jellemzően nem, vagy csak részben validálták, így a pontosságuk megkérdőjelezhető [71,38,72]. Hamase és munkatársai olyan ún.

kétdimenziós folyadékkromatográfiás eljárást dolgoztak ki, mellyel két lépésben valósították meg az aszpartát valamint a glutamát enantiomerek elválasztását [73]. Az első lépésben egy fordított fázisú kolonnán történik az aminosavak akirális elválasztása, majd az egyes frakciók enantiomerjeinek elválasztását egy királis állófázis segítségével érik el. Bár a módszer érzékenysége igen magas volt, a rendkívül hosszú analízisidő (~ 2 h) nem tette lehetővé a megfelelő validálást [74,75]. Napjainkban a folyadékkromatográfiával végzett elválasztások rutineljárásnak számítanak, azonban relatív költséges módszerek, így nagyszámú és kis térfogatú minta gyors analízisére kevésbé kézenfekvő módszerek [69].

A kromatográfiás módszerekkel ellentétben az elektromigráción alapuló elválasztási módszerek a mintakomponensek eltérő töltés-tömeg arányát használják ki. Az elektromos térben eltérő sebességgel vándorló komponensek elválasztásukat követően szelektíven detektálhatók. Ha az elválasztás kapillárisban történik, akkor kapilláris elektroforézisről, ha üvegfelületbe mart csatornákban, akkor mikrochip-elektroforézis technikáról beszélhetünk. Nagy érzékenységük, kis mintaigényük és relatív olcsó üzemeltetési költségük révén széles körben elterjedtek aminosavak biológiai mintákból történő vizsgálatára [76]. További előnyük, hogy a bonyolult összetételű mintamátrix zavaró hatása kevésbé érvényesül, valamint különösen alkalmasak enantiomerek elválasztását megvalósító királis analízisek kivitelezésére. Viszonylag olcsón fenntartható és üzemeltethető rendszerek, melyek esetében a módszerfejlesztés gyorsan és kis költségből megvalósítható.

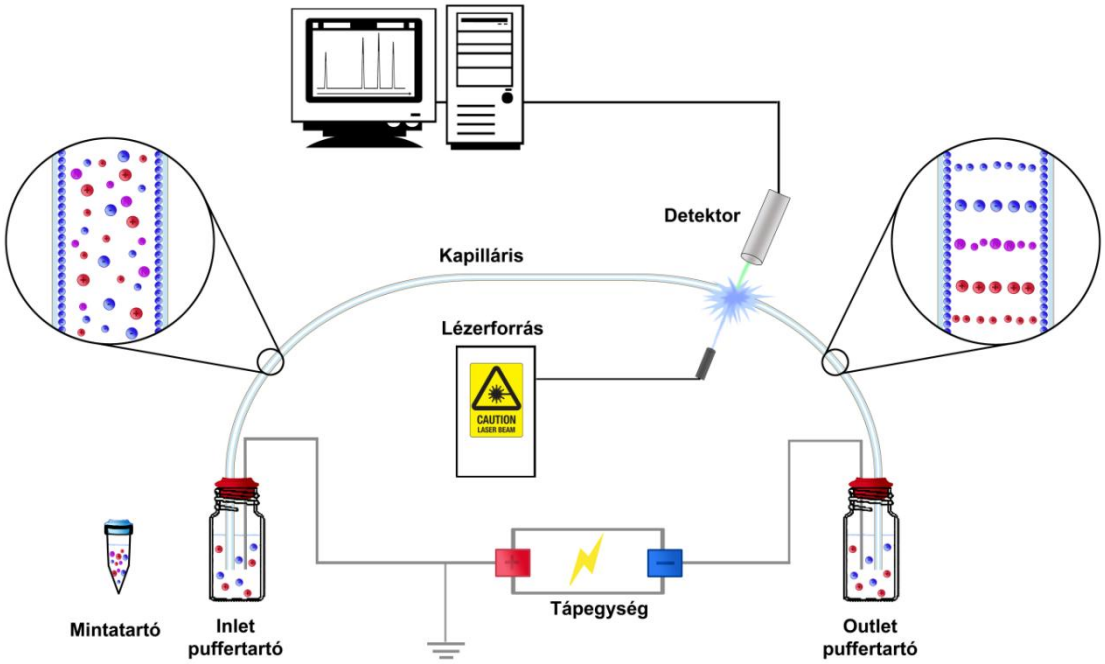
1.4 Kapilláris elektroforézis alapelvei

Kapilláris elektroforézis (CE) alatt értjük a jellemzően 10-150 μm átmérőjű, 10-100 cm hosszú, pufferoldattal töltött ömlesztett kvarc kapillárisban kivitelezett elektromigráción alapuló elválasztástechnikai módszereket. Az eljárás alapjait kidolgozó korai vizsgálatokban Hjertén és munkatársai még viszonylag nagy belső átmérőjű kapillárist alkalmaztak, ami számos gyakorlati problémát vetett fel [77]. Az 50-100 μm belső átmérőjű kapillárisok elterjedését követően a kapilláris elektroforézis mai formájában Mikkers, Jorgenson és Lukacs munkáinak nyomán alakult ki [78-80]. Kezdetben a kutatócsoportok a saját maguk által épített készülékeken végezték méréseiket,

napjainkban azonban már számos gyártó készüléke kapható kereskedelmi forgalomban. A kapilláris elektroforézis napjainkra széles körben elismert és elterjedt analitikai módszerré vált, melyet a témához kapcsolódó közlemények évről évre növekvő száma is alátámaszt.

1.4.1 A készülék elvi felépítése

A kapilláris elektroforézis készülék főbb alkotórészei a kapilláris, a nagyfeszültségű tápegység, a minta- és puffertartó edények és a detektor. A termosztált kvarc kapilláris, amelyben az elválasztás történik jellemzően 50-75 μm belső átmérőjű. Az elválasztás során a kapillárist pufferoldattal (háttérelektrolit) töltik fel, mely megfelelő vezető közeget teremt, a kapilláris végei pedig a platina elektródokkal együtt általában ugyanazon pufferoldattal töltött edényekbe merülnek. A hagyományosan normál polaritásnak nevezett elrendezés esetén a kapilláris bemeneti (inlet) oldala az anóddal, a kimeneti vagy detektor oldal (outlet) pedig a katóddal teremt kapcsolatot. Ellentétes elrendezés esetén fordított polaritásról beszélünk. A gyakorlatban alkalmazott 10-30 kV egyenfeszültség hatására kialakuló áram általában nem haladja meg a 100 μA-t. Az elválasztást követően a mintakomponensek detektálása történhet a kapillárison (UV elnyelés, fluoreszcencia), vagy külső detektor (elektrokémiai vagy tömegspektrometrás detektor) alkalmazásával is. A kapilláris elektroforézis készülék elvi felépítését az alábbi ábrán mutatjuk be (3. ábra).



3. ábra A kapilláris elektroforézis készülék elvi felépítése.

1.4.2 A kapilláris elektroforézis elméleti háttere

Az elektroforetikus elválasztási módszerek alapja, hogy az elektromos térben, a mintakomponensek eltérő sebességgel vándorolnak. Egy oldatban lévő töltéssel rendelkező molekula mozgékonyságát a rá ható elektromos erő (F_{el}), valamint a közeg által meghatározott ellentétes irányú súrlódási erő (F_s) eredője szabja meg. Míg az elektromos erőt a molekula töltése (q), valamint az alkalmazott E elektromos tér nagysága határozza meg, a súrlódási erő a részecske hidrodinamikai (Stokes-féle) sugarától (r), a közeg viszkozitásától (η), továbbá a haladási sebességétől (v) függ. Az elektroforetikus migráció során a két erő között dinamikus egyensúly jön létre, melynek következtében az ion egyenletes v sebességgel vándorol:

$$F_{el} = F_s \tag{1}$$

$$qE = 6\pi\eta r v \tag{2}$$

$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu E \tag{3}$$

A vándorlási sebesség (v) adott elektromos térerő (E) esetén tehát a töltés, a méret és a közeg viszkozitásának függvénye, melyeket együttesen a Debye-Hückel-Henry egyenlet szerint az ion elektroforetikus mozgékonyságával (μ) jellemezhetünk [79].

Gyenge elektrolitok esetében az abszolút mozgékonysági értékektől (μ) a kísérleti úton kapott relatív (effektív) mozgékonysági értékek (μ_{eff}) általában eltérnek, mivel ez utóbbi értékek függnek a pH-tól (az oldott anyag pK-jától) és a pufferközeg összetételétől, és figyelembe veszik, hogy a molekuláknak csak egy pH függő frakciója ($0 \leq \alpha \leq 1$) van ionos formában.

1.4.3 Elektromigráción alapuló technikák sajátosságai

Nagyfeszültség alkalmazásakor a kapillárisban a mintakomponensek mellett a jelenlévő, töltéssel rendelkező elektrolit is áramlani kezd. Ezt a jelenséget elekroozmotikus áramlásnak (EOF) nevezzük. Az EOF minden olyan esetben jelen van, amikor a kapillárisfal töltéssel rendelkezik, mivel ilyen esetben elektromos kettősréteg alakulhat ki. Ömlesztett szilika kapillárisban a felszíni szilanol csoportok pH-függő módon disszociálnak, az ilyen módon negatívvá vált kapillárisfal mentén az oldatban lévő kationok feldúsulnak. Elektromos tér hatására a kationok a katód irányába kezdenek vándorolni, ami a kapillárisban lévő folyadék áramlását is előidézi. Az áramlás sebessége a kapilláris teljes keresztmetszetében azonos, így egy kedvező, „dúgószerű" áramlási profil alakul ki. Ez az elektroforézisre jellemző áramlásprofil a folyadékkromatográfiánál tapasztalható lamináris áramlásprofillal ellentétben kevésbé okoz mintadiszperziót. A szilikafal töltése, ezen keresztül az elektromos kettősréteg vastagsága és végeredményben az EOF sebessége is a kapillárisba töltött elektrolit pH-jától függ. EOF jelenlétében a mintakomponensek vándorlási sebessége a következőképpen alakul:

$$v = (\mu_{eff} \pm \mu_{EOF})E \qquad (6)$$

ahol μ_{eff} a töltésből, μ_{EOF} pedig az elektroozmotikus áramlásból eredő mozgékonyság. A töltéssel nem rendelkező neutrális komponensek vándorlási sebessége megegyezik az EOF-ből eredő mobilitással ($v=\mu_{EOF}$). Abban az esetben amikor az elválasztandó vegyület saját töltéséből eredő mozgékonysága és az EOF-ből eredő mozgékonyság ellentétes előjelű a töltés-tömeg arány növekedésével csökken az eredő mozgékonyság.

Így előfordulhat, hogy magas elektroforetikus mozgékonysággal rendelkező kis tömegű, relatív nagy töltésű molekulák gyors elválasztásának akadálya a nagy ellenirányú EOF. Az EOF csökkenthető az elektrolit viszkozitásának növelésével (pl. hidroxi-propil-cellulóz alkalmazásával), vagy a kapilláris fal belső borításával. A felszíni szilanol csoportokhoz kovalensen kötött semleges töltésű polimer-molekulák viszkózus réteget képeznek amely meggátolja az EOF kialakulását. A kapillárisfal borítása célszerű, ha az elválasztandó vegyületek adszorbeálódhatnak a kapillárisfalon (jellemzően fehérjék), vagy ha a magas pH-n kivitelezendő elválasztást az EOF zavarja [81].

1.4.4 Kapilláris elektroforézis technikák csoportosítása

Bár minden kapilláris elektroforézis technika alapvető hajtóereje az elektromos tér hatására kialakuló vándorlás, a háttérelektrolit összetételétől függően további fizikai, illetve kémiai kölcsönhatások is hozzájárulhatnak a mintakomponensek elválasztásához. A kapilláris zóna elektroforézis (CZE) egyszerűsége és sokoldalúsága miatt a leggyakrabban használatos módszer. A kapilláris csupán a pufferrel van töltve, az elválasztás alapja az, hogy a különböző részecskék diszkrét zónákban más-más sebességgel mozognak. Kationok és anionok elválasztása így tisztán az elektroforetikus tulajdonságaikon alapul. A töltéssel nem rendelkező komponensek elválasztása azonban ezzel a módszerrel nem lehetséges [82,79,80,14].

Az elektrokinetikus kromatográfiás eljárások során valamilyen valódi vagy pszeudo-állófázis is jelen van az elválasztás során, így az állófázissal történő kölcsönhatás során az elektroforetikus mellett kromatográfiás elvek is érvényesülhetnek. Pszeudo-állófázisként leggyakrabban micellaképző anyagokat és királis szelektorokat, míg valódi állófázisként kromatográfiás tölteteket vagy *in situ* polimerizált géleket alkalmaznak.

Töltéssel nem rendelkező vegyületek elválasztására micellaképző anyagok jelenlétében nyílik lehetőség, ezeket a módszereket összefoglaló néven micelláris elektrokinetikus kromatográfiának nevezzük (MEKC) [83]. Az MEKC módszerek túlnyomó többsége valamilyen anionos felületaktív anyagot (pl. nátrium-laurilszulfát) alkalmaz a kritikus micellaképződési koncentrációt (CMC) meghaladó mennyiségben pszeudo-állófázisként, melynek következtében hidrofób maggal rendelkező micellák alakulnak ki a háttérelektrolitban. Az egyes mintakomponensek sebességét az elektrolit és

pszeudo-állófázis közti megoszlásuk befolyásolja. Míg a töltés nélküli komponensek elválasztása tisztán kromatográfiás elven alapul, a töltéssel rendelkező mintakomponensek esetében az elektroforetikus és a kromatográfiás tulajdonságok közösen szabják meg az eredő mobilitást. Az elválasztást a micellaképző vegyület koncentrációjával, a háttér elektrolit pH-jával valamint szerves oldószer jelenlétével lehet befolyásolni. Királis elválasztás esetén a pszeudo-állófázis optikailag aktív molekulákból (pl. ciklodextrinekből) áll, amelyekkel a mintában lévő enantiomer párok eltérő mértékben léphetnek kölcsönhatásba [84].

Valódi állófázis alkalmazása esetén kapilláris elektrokromatográfiáról (CEC) beszélünk, a hagyományos folyadékkromatográfiával ellentétben itt azonban a vándorlás hajtóereje a korábbiakhoz hasonlóan az elektroozmotikus áramlás [85]. Ekkor a kromatográfiás töltet vagy a polimer-gél következtében jön létre a kromatográfiás kölcsönhatás, míg az EOF jelenléte biztosítja az elektroforézisre jellemző magas elméleti tányérszámot. A kapilláris gélelektroforézis (CGE) a hagyományos lap gél-elektroforézis adaptált változata, melyet biomolekulák (fehérjék, nukleinsavak) méret szerinti elválasztására alkalmaznak [86,87].

A teljesség kedvéért megemlítem még a kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF), valamint a kapilláris izotachoforézis (CITP) technikákat. A CIEF egy dinamikus pH gradiens létrehozásán alapul, jellemzően fehérjék izoelektromos pont alapján történő elválasztására alkalmazzák [88]. A CITP során az egyenetlen térerő eloszlás következtében az azonos töltésű ionok zónákba rendeződve egyforma sebességgel vándorolnak a kapillárisban. A megszokottól eltérően azonban az egyes mintakomponensek nem jól elváló csúcsok formájában, hanem egymást követő lépcsőkként jelennek meg az izotachoferogramon. Fő alkalmazási módja a mintában alacsony koncentrációban jelenlévő komponensek nagyobb térfogatból történő koncentrálása, melyet átmeneti ITP-nek nevezünk [87].

1.5 A királis kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézissel elérhető nagy hatékonyság különösen alkalmassá teszi a technikát optikai izomerek elválasztására. Azonban az optikai izomerek akirális közegben sem elektromigrációs sem pedig kromatográfiás tulajdonságaik alapján nem

különböztethetőek meg, így hatékony elválasztásuk csak királis segédanyag alkalmazásával lehetséges. A királis segédanyag funkciója alapján két módszert különböztethetünk meg.

Az indirekt módszer esetén egy királis vegyülettel történő reakció során több kiralitáscentrummal rendelkező származékok képződnek. Ezek a diasztereomer párok már eltérő fizikai tulajdonságaik alapján elválaszthatóak. A módszer analóg a preparatív eljárásokban alkalmazott reszolválási módszerrel. Fontos ugyanakkor, hogy a származékképző enantiomer-tisztasága különösen magas legyen, ellenkező esetben a képződő melléktermékek torzítják a módszer pontosságát. Az indirekt elválasztás hátrányos tulajdonságai miatt napjainkban mind a kromatográfiás mind az elektromigráción alapuló technikák esetében a direkt királis elválasztást részesítik előnyben [89].

Direkt elválasztás során a háttérelektrolit valamilyen optikailag aktív vegyületet (királis szelektorból álló pszeudo-állófázist) tartalmaz, ami képes az elválasztandó enantiomerekkel reverzibilis módon zárvány-komplexet vagy diasztereomert képezni. A királis elválasztás a szelektor és az egyes enantiomerek közötti eltérő erősségű kölcsönhatáson alapul. A szelektorral történő kölcsönhatás legalább három pontos kell, hogy legyen, amiből egy pontnak sztereoszelektívnek kell lennie [90]. Királis elválasztás akkor jön létre, ha az enantiomerek komplexképzési egyensúlyi állandói különböznek, valamint eltérő a komplex, illetve szabad formák elektroforetikus mobilitása. A szelektorral történő kölcsönhatás kromatográfiás jellegű, míg a vegyületek vándorlása elektromigrációs tulajdonságaikon alapul. Az enantiomerek sikeres elválasztása tehát két eltérő eredetű tulajdonság következtében kialakuló effektív mobilitáskülönbség következtében jön létre.

1.5.1 Az enantiomer elválasztás alapja:

A direkt elválasztás során kialakuló effektív mobilitás a szabad és komplex formában lévő enantiomer elektroforetikus mobilitásának (μ_f, illetve μ_c) és koncentrációjának (*[E]*, illetve *[EC]*) függvénye:

$$\mu_{eff} = \frac{[E]}{[E]+[EC]}\mu_f + \frac{[EC]}{[E]+[EC]}\mu_c \qquad (7)$$

A szelektorral történő komplexképzés egyensúlyi folyamat, amelyet a következőképpen írhatunk le:

$$[EC] = K[E][C] \tag{8}$$

ahol K a folyamatra jellemző egyensúlyi állandó, míg $[C]$ a szabad szelektor koncentráció. A (7) egyenletbe behelyettesítve, majd egyszerűsítve a következőt kapjuk:

$$\mu_{eff} = \frac{[E]}{[E] + K[E][C]}\mu_f + \frac{K[E][C]}{[E] + K[E][C]}\mu_c = \frac{\mu_f + \mu_c K[C]}{1 + K[C]} \tag{9}$$

Az enantiomerek mobilitáskülönbségét kifejezve:

$$\Delta\mu_{eff} = \mu_{eff}^2 - \mu_{eff}^1 = \frac{\mu_f + \mu_c^2 K_2[C]}{1 + K_2[C]} - \frac{\mu_f + \mu_c^1 K_1[C]}{1 + K_1[C]} \tag{10}$$

Az effektív mobilitáskülönbség adódhat a komplexek eltérő stabilitásából ($K_1 \neq K_2$), vagy a komplexek eltérő mobilitásából ($\mu_c^1 \neq \mu_c^2$) [91]. Mivel gyakorlatban az eltérő stabilitású komplexeknek van elsősorban jelentősége, az egyenlet $\mu_c^1 = \mu_c^2$ felhasználásával tovább egyszerűsíthető:

$$\Delta\mu = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_2 - K_1)[C]}{1 + (K_1 + K_2)[C] + K_1 K_2 [C]^2} \tag{11}$$

A rendszer szelektivitását az α paraméterrel jellemezhetjük, amely megegyezik az egyensúlyi állandók, illetve az enantiomerek migrációs idejének (t_1, t_2) arányával:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t_2}{t_1} = \frac{\mu_{eff}^1}{\mu_{eff}^2} \tag{12}$$

1.5.2 Királis elválasztást befolyásoló tényezők

1.5.2.1 EOF

Az elektroozmotikus áramlás azonos mértékben járul hozzá minden mintakoponens mobilitásához az alábbi módon:

$$\alpha_{app} = \frac{t_2}{t_1} = \frac{\mu_{eff}^1 + \mu_{EOF}}{\mu_{eff}^2 + \mu_{EOF}} \tag{13}$$

Az effektív mobilitással azonos irányú EOF csökkenti, míg az ellentétes irányú EOF növeli a rendszer szelektivitását.

1.5.2.2 Királis szelektor töltése

Töltéssel rendelkező szelektorokkal lehetőség nyílik neutrális enantiomerek elválasztására is, ekkor ugyanis a szabad, illetve a komplex formák mobilitása eltér egymástól, a szelektor pedig szállító molekulaként részt vesz az enantiomerek mozgatásában. Ellentétes töltésű szelektor és elválasztandó vegyület esetén a kialakuló ionos kölcsönhatások miatt a komplexképzés erőssége általában nő. A komplex a szabad molekulával ellentétes irányú mobilitása tovább növelheti a rendszer enantioszelektivitását [92,93]. Az esetek túlnyomó többségében mind a szelektor, mind a vizsgált vegyület gyenge elektrolit, így az ionizáció mértéke és ezen keresztül a rendszer szelektivitása nagyban függ az alkalmazott pH-tól.

1.5.2.3 Több királis szelektor jelenléte

Több királis szelektor egyidejű jelenléte esetén az enantiomerek eredő mobilitáskülönbségét az egyes szelektorok hatására létrejött mobilitáskülönbségek súlyozott összegeként kaphatjuk meg.

$$\Delta\mu_{ov} = \Sigma i \Delta\mu_i = \Sigma i \frac{(\mu_f^i - \mu_c^i)(K_2^i - K_1^i)[C_i]}{1 + (K_1^i + K_2^i)[C_i] + K_1^i K_2^i [C_i]^2} \qquad (14)$$

ahol *i* az egyes szelektorok koncentrációjától, illetve a komplexek kompetitív stabilitási állandóitól függő súlyfaktor. Gyakorlatban két királis szelektort tartalmazó rendszereket használnak. Az enantioszelektivitás abban az esetben nő, ha az egyes szelektorok hatására kialakuló mobilitáskülönbség azonos előjelű. A töltéssel nem rendelkező szelektorok esetén akkor érhetünk el növekedést az enantioszelektivitásban, ha minden szelektor azonos enantiomer felé rendelkezik nagyobb affinitással. Töltéssel rendelkező szelektorok esetében láthattuk, hogy a komplexált forma mobilitása akár ellenkező irányú is lehet. Abban az esetben, ha több, töltéssel rendelkező szelektor van egyidejűleg jelen, leginkább akkor nő az enantioszelektivitás, ha az egyes szelektorok eltérő enantiomerek felé rendelkeznek nagyobb affinitással, és eltérő irányban befolyásolják az enantiomerek mobilitását. A töltéssel rendelkező szelektor ugyanakkor betölthet csupán szállító funkciót is. Ekkor nem szükséges enantioszelektivitással

rendelkeznie (azt biztosíthatja egy másik jelen lévő neutrális szelektor), szerepe pusztán a szabad enantiomerek mobilitásának befolyásolása [94].

1.5.3 Királis szelektorok

1.5.3.1 Ciklodextrinek

A ciklodextrinek glükopiranóz alegységekből felépülő ciklikus oligoszacharid molekulák, melyek enzimatikus bontással keményítőből állíthatók elő [95]. Jellegzetes csonkakúp formával, valamint egy belső hidrofób üreggel rendelkeznek, melyet a glükopiranóz egységeket összekötő éteres oxigénatomok alakítanak ki. A csonkakúp szélesebb peremén találhatók a glükopiranóz egységek 2-es és 3-as szénatomjához kapcsolódó hidroxil-csoportok, míg a keskeny peremen a 6-os szénatomhoz kapcsolódó hidroxil-csoportok. A hidrofób üreg révén képesek számos apoláris molekulával zárványkomplexet képezni. A zárványkomplexképzés során a peremen található királis szénatomok kölcsönhatásba léphetnek az enantiomerek aszimmetria centrumaival. Eltérő erősségű kölcsönhatás esetén az enantiomerek nem ugyanannyi időt fognak komplexált formában eltölteni, mely lehetőséget teremt a királis elválasztásra [96]. Könnyű hozzáférhetősége, alacsony ára miatt ma már a királis kapilláris elektroforézisben döntően a ciklodextrineket és származékait használják [96-99]. A szabad hidroxil-csoportokon keresztül a ciklodextrin molekulák tovább módosíthatók, így napjainkban számos félszintetikus származék ismeretes [95].

A natív ciklodextrinek esetében az őket alkotó glükopiranóz egységek száma alapján megkülönböztethetünk α-, β-, illetve γ-ciklodextrint, melyek rendre hat, hét és nyolc alegységből épülnek fel. Az alegységek száma meghatározza a hidrofób üreg méretét is. Ahhoz, hogy a zárványkomplex kellően stabil legyen, elengedhetetlen a vendégmolekula pontos illeszkedése az üregbe. Az egyszerűbb, benzol-gyűrűt tartalmazó vegyületek számára a β-ciklodextrin molekulák üregmérete a legmegfelelőbb. Míg az α-ciklodextrin túl kicsiny üregmérettel rendelkezik, a γ-ciklodextrin üregmérete a nagyobb, kondenzált gyűrűrendszerek számára megfelelő [99].

A leggyakrabban alkalmazott neutrális származékok a különböző mértékben metilált, vagy hidroxipropil-csoporttal módosított β-, illetve γ-ciklodextrinek. A módosítás

következtében nőhet a szelektor oldhatósága, valamint a szubsztituensek lehetőséget nyújtanak új kölcsönhatások kialakulására. A módosított ciklodextrinek esetében beszélhetünk véletlenszerűen szubsztituált keverékről, illetve izomertiszta származékokról. Az előbbit csak egy átlagos szubsztitúciós fokkal jellemezhetjük, és bár bizonyos esetekben jobb királis szelektivitást biztosíthatnak, a bizonytalan összetétel reprodukálhatósági problémákat vethet fel.

A töltéssel rendelkező ciklodextrinek esetében a már meglévő kölcsönhatások mellett (ellentétesen töltött vendégmolekula esetén) lehetőség van ionos kölcsönhatás kialakulására is. Az ellentétes töltések miatt a komplexált és a szabad forma közötti mobilitáskülönbség nagyobb lehet, mint a töltéssel nem rendelkező szelektorok esetén, így használatukkal egyes esetekben nagyobb szelektivitás érhető el. Bázikus vagy neutrális mintakomponensek elválasztására előszeretettel alkalmaznak negatív töltésű ciklodextrin származékokat. Leggyakrabban szulfonsav-, alkilszulfonsav-, vagy karboxil-csoporttal szubsztituálják a hidroxil-csoportokat, és a jobb reprodukálhatóság érdekében kidolgozták ezen szubsztituensek izomertiszta előállítását is. Gyengén savas karakterű vegyületek alacsony pH-n elválaszthatók szulfatált ciklodextrinekkel. Ekkor az elválasztandó vegyület ionizációja visszaszorul, a szelektor töltése viszont megmarad. A visszaszoruló EOF helyett a szelektor-vendégmolekula komplex mobilitása lesz döntően felelős az elválasztandó vegyületek migrációjáért [100].

Kationos ciklodextrinek esetében leggyakrabban a glükopiranóz alegység 6-os szénatomjához kapcsolódó hidroxil-csoportot cserélik le amino- vagy alkilamino-csoportra. Felhasználásuk túlnyomó többségében savas karakterű, tehát ellenkező töltésű vegyületek elválasztására terjed ki. Ismeretesek továbbá 6-deoxi-6-alkilimidazolino-, valamint kvaterner ammónium-származékok is. Ezen szelektorok jellegzetessége, hogy pH-független pozitív töltéssel rendelkeznek, és rendkívül alacsony koncentrációban már megfelelő enantioszelektivitást nyújtanak [101].

1.5.3.2 Egyéb királis szelektorok

Enantiomerek elválasztására használhatók királis tenzidek (leggyakrabban epesavak és azok származékai), melyek képesek optikailag aktív micellákat alkotni. A királis micellával az egyes enantiomerek eltérő mértékű kölcsönhatást alakítanak ki [102], mely az elválasztás alapját képezi. Ezen eljárások közé soroljuk az akirális vagy királis

micellák és ciklodextrinek alkotta terner rendszereket is. Ezen rendszerek mind a semleges, mind a töltéssel rendelkező, esetleg erősen lipofil vegyületek enantiomer-elválasztására is alkalmasak [103].

Fehérjék pszeudo-állófázisként történő alkalmazását affinitás elektrokinetikus kromatográfiának nevezzük. A fehérjék képesek az egyes enantiomereket eltérő erősségel kötni, mely folyamat analóg a gyógyszermolekula-receptor kölcsönhatással [104]. Mivel a királis felismerés mechanizmusa bonyolult folyamat, az elválasztás körülményei kevéssé tervezhetőek.

Egyes makrociklusos antibiotikumok királis centrumaik, valamint funkciós-csoportjaik révén képesek enantioszelektív kölcsönhatást létrehozni a vizsgálandó vegyületekkel. A gyakorlatban rifamicin származékokat bázikus tulajdonságú vegyületek enantiomerjeinek elválasztására, míg a glikopeptideket (vancomycin, teicoplanin) jellemzően savas karakterű vegyületek elválasztására alkalmazzák [105]. A már ismertetett szelektorok mellett alkalmaznak még koronaétereket [106], királis kalixaréneket, valamint negatív töltésű poliszacharidokat királis kapilláris elektroforézissel történő elválasztás során [98]. Ismeretes továbbá a ligand-cserén alapuló királis elválasztás, melynek során egy szerves molekula-fém-ion komplex van jelen. A királis elválasztás során az enantiomerek a fém-ionnal versengenek a komplexképzésért [107].

1.6 Detektálás

A kapilláris elektroforézis technikák esetében a néhány nanoliternyi injektált minta komponenseinek detektálásához megfelelő érzékenységű módszerek szükségesek. A kísérleti elrendezéssel való kompatibilitása révén főként az optikai úton történő detektálási módok terjedtek el. A kvarc kapilláris (anyagából adódóan) sem az UV-elnyelésen, sem a fluoreszcencia detektálásán alapuló módszereket nem zavarja.

Az UV-elnyelésen alapuló detektálás esetében a legnagyobb korlátozó tényező a módszer relatív alacsony tömegérzékenysége, ami a rendkívül rövid abszorpciós úthosszból adódik. Speciális kialakítású detektorcellákkal (buborékcella, Z-cella) ugyan javítható az érzékenység, azonban a megnövekedett átmérő zónakiszélesedéshez, így a csúcsok torzulásához vezethet.

Fluoreszcens detektálási mód alkalmazásával az érzékenység nagyságrendekkel növelhető a hagyományos UV-elnyelésen alapuló detektáláshoz képest. Ennek során a mintakomponenst először egy megadott hullámhosszú fotonnal gerjesztjük, majd a gerjesztett molekula alapállapotba történő visszatérése során emittált fotont detektáljuk. A gerjesztési, valamint az emissziós hullámhossz vegyületspecifikus, így a kívánt komponenst szelektíven és érzékenyen lehet detektálni. Közvetlenül azonban csak viszonylag kevés vegyület detektálható ezzel a módszerrel, ezért az esetek többségében szükséges az analízist megelőzően a vizsgált vegyületek származékképzése. A módszer alapvető hátrányai a származékképzésből adódnak [108].

Az elektrokémiai elven alapuló detektálási módszerek az optikai úton történő detektálás alternatívái lehetnek. Megfelelő kivitelezésük azonban speciális elektronikai egységet és módosított kapillárist igényel, valamint korlátozott a detektálható vegyületek köre. A kapilláris elektroforézis tömegspektrométerrel történő összekapcsolása lehetőséget teremt az elválasztott vegyületek szerkezetének tanulmányozására. A rendkívül alacsony injektált mintatérfogat és az alacsony áramlási sebesség miatt azonban az elérhető érzékenység a fluoreszcens úton történő detektálását nem haladja meg. További problémát jelent a két berendezés megfelelő csatolása, az alkalmazható segédanyagok és pufferek szűk köre pedig megnehezíti a módszerfejlesztést. Fehérjék és biomolekulák analízise során értékes szerkezeti információkat szolgáltat, ezért alkalmazása főleg ezen a területen gyakori [109]. A főbb detektálási módszereket, érzékenységüket valamint alkalmazásukkal járó előnyöket, illetve hátrányokat az alábbi, I. táblázatban foglaltam össze.

I. táblázat A kapilláris elektroforézis során alkalmazott detektálási módszerek.

Módszer	Kimutatási határ		Előnyök/hátrányok
	abszolút (mol)	koncentráció (M)	
UV-látható fény elnyelés	10^{-13}-10^{-16}	10^{-5}-10^{-8}	• univerzális • a diódasor spektrális információkat nyújt
Fluoreszcencia	10^{-15}-10^{-17}	10^{-7}-10^{-9}	• érzékeny • általában származékképzés szükséges a mintából
Lézer indukált fluoreszcencia (LIF)	10^{-18}-10^{-20}	10^{-10}-10^{-12}	• nagyon érzékeny • általában a minta származékképzése szükséges • drága
Amperometria	10^{-18}-10^{-19}	10^{-10}-10^{-11}	• érzékeny szelektív, de csak elektroaktív részecskékre jó • speciális elektronikai egység és módosított kapilláris szükséges
Vezetőképesség-mérés	10^{-15}-10^{-16}	10^{-7}-10^{-8}	• univerzális • speciális elektronikai egység és módosított kapilláris szükséges
Tömegspektrometria	10^{-16}-10^{-17}	10^{-8}-10^{-9}	• érzékeny és szerkezeti információkat is nyújt • a CE és MS illesztése problematikus
Indirekt UV, fluoreszcencia, amperometria	10-100-szor gyengébb mint a direkt módszerek esetén		• univerzális • gyengébb érzékenység mint a direkt módszerek esetén

1.7 Fluoreszcens származékképzés

Fluoreszcens folyamatok során egy fluorofór (fluoreszcenciát mutató molekula) alapállapotú π vagy nemkötő elektronja egy adott hullámhosszú foton elnyelése következtében gerjesztődik (excitáció), amely során egy magasabb energiaállapotú π*-lazítópályára kerül. A gerjesztett állapotból az alapállapotba való visszatérés történhet foton kibocsájtás (emisszió), vagy egyéb, nem sugárzással járó folyamatok során. Az emisszióval járó folyamatok arányának jellemzésére a kvantumhatásfokot (Φ_f), míg a fluorofór gerjeszthetőségére a moláris abszorptivitást (ε) használjuk. Fontos követelmény a gyakorlatban alkalmazott fluorofórokkal szemben, hogy magas

kvantumhatásfokkal és moláris abszorptivitással, valamint kellő fotostabilitással rendelkezzenek [110].

Általánosságban aromás gyűrűrendszert tartalmazó szénhidrogének, illetve kondenzált heterociklusos rendszereket tartalmazó vegyületek felelnek meg ezen követelményeknek. A gyűrűkhöz kapcsolódó funkciós-csoportok ugyanakkor nagyban módosíthatják a vegyületek fluoreszcens tulajdonságait. Alapvető szabályként az mondhatjuk, hogy az elektronküldő-csoportok (-NH_2, -NHR, -NR_2, -OH) jelenléte magas kvantumhatásfokot eredményez és az excitációs maximumot a hosszabb hullámhosszak irányába tolja, míg az elektronszívó-csoportok (-CHO, -COOH, -NO_2, -F) negatívan befolyásolják a kvantumhatásfokot. A fluoreszcenciát befolyásolja továbbá az oldószer polaritása, valamint savas vagy bázikus karakterű funkciós-csoportok esetén az alkalmazott pH is. Ahhoz, hogy egy fluorofórt származékképzőként alkalmazhassunk rendelkeznie kell egy reaktív funkciós-csoporttal is.

Rendkívül magas érzékenységet érhetünk el abban az esetben, ha gerjesztő forrásként valamilyen lézerfényt használunk. Ebben az esetben lézerindukálta fluoreszcencia detektálásról (LIF) beszélünk. A lézerfény tulajdonságaiból következően monokromatikus és koherens, így nagy energiasűrűséget biztosít. A nagy energiájú lézernyaláb hatékonyan gerjeszti a detektorablak előtt elhaladó vegyületeket, így több nagyságrenddel növeli a módszer érzékenységét. Kereskedelmi forgalomban jelenleg argon-ion lézerek (488 nm) mellett He-Cd lézerek (325/442 nm), valamint diódalézerek kaphatók.

Biológiai minták kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata során érzékenysége és szelektivitása révén a lézerindukálta fluoreszcencia az egyik leggyakrabban alkalmazott detektálási mód [111,108]. Előnyösen alkalmazható alacsony koncentrációban jelenlévő mintakomponensek összetett mintamátrixban történő vizsgálatára. Az esetek túlnyomó többségében a kérdéses mintakomponensek azonban önmagukban nem fluoreszkálnak, így csak fluoreszcens származékképzést követően detektálhatók. Származékképzés során a vizsgálandó molekula funkciós-csoportja és a származékképző vegyület között kovalens kötés alakul ki, és végeredményben fluoreszcens termék képződik. Ha a származékképző önmagában is rendelkezik fluoreszcenciával, akkor fluorofór, ha csak a kialakult termék fluoreszkál, akkor fluorogén tulajdonságú vegyületről beszélünk.

A származékképzés történhet az elválasztást megelőzően (pre-kapilláris származékképzés), valamint az elválasztás alatt (on-line származékképzés), ritkább esetben elválasztás után (poszt-kapilláris származékképzés) [110]. A legegyszerűbben kivitelezhető és leggyakrabban alkalmazott módszer a pre-kapilláris származékképzés. Előnye, hogy hosszabb reakcióidőt és magas hőmérsékletet igénylő reakciók is kivitelezhetőek, alacsony térfogatú (< 2 μl) minták kezelése ugyanakkor problémás. Lehetőség van viszont minta-koncentrációra, illetve a reagensfelesleg eltávolítására is. Az on-line származékképzés során a reakció az elválasztás alatt a kapillárisban játszódik le. Ebből adódóan csak olyan fluorogén származékképzők alkalmazhatóak, amelyek alacsony hőmérsékleten, rövid idő alatt reagálnak a mintakomponensekkel. Az on-line származékképzés történhet a származékképző, majd a minta szekvenciális injektálásával, vagy a származékképző hátérelektrolitba történő inkorporálásával. Ekkor az elválasztás során a mintakomponensek keresztülhaladnak a származékképző zónán, melynek során kialakulnak a fluoreszcens származékok. A másik lehetőség, hogy közvetlenül a kapillárisra juttatás előtt egy T-csatlakozó segítségével keverik össze a mintát a származékképzővel. Ezt a technikát gyakran kombinálják mikrodialízissel, így nagy időbeli felbontás érhető el [112,113]. Az on-line módszerek legnagyobb hátránya, hogy érzékenységük elmarad a pre-kapilláris származékképzés érzékenységétől.

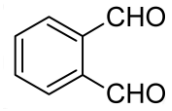
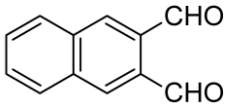
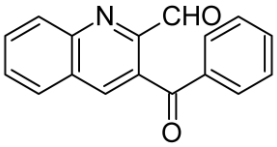
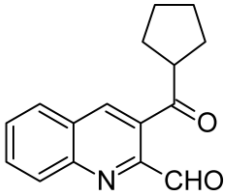
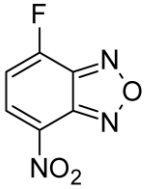
1.7.1 Származékképzőkkel szemben támasztott követelmények:

Az ideális származékképző oldható és kellően stabil abban a közegben, amiben a reakció gyorsan és enyhe körülmények között végbemegy. Míg a származékképző önmagában nem fluoreszkál, a képződő termék stabil és erős fluoreszcenciát mutat. Mindemellett az ideális származékképző nem toxikus és megfelelő tisztaságban, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető. A valóságban természetesen egyetlen származékképző sem felel meg az összes, itt felsorolt követelménynek, a gyakorlatban történő alkalmazhatóságukat azonban jórészt ezen tulajdonságaik szabják meg [110,114]. A kapilláris elektroforézisben alkalmazott származékképzők esetén fontos, hogy a képződő termék ne legyen túlságosan lipofil, ekkor ugyanis a kapillárisfalhoz történő adszorpció miatt csúcstorzulás következhet be.

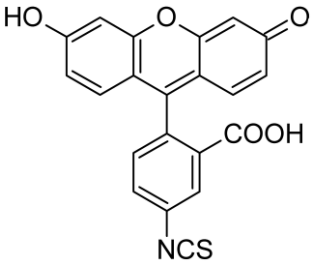
1.7.2 Fluoreszcens származékképző vegyületek csoportosítása

Az amin-csoporton keresztüli származékképzés viszonylag egyszerű, ezért biológiai minták analízise során előszeretettel alkalmaznak amin-reaktív származékképzőket. A származékképzők megfelelő körülmények között szelektíven képesek a vizsgálandó vegyületek primer és/vagy szekunder amino-csoportjaival reagálni. A reakció feltétele a deprotonált amino-csoport, ezért ezen reakciók enyhén lúgos pH-jú közegben (pH 8-10) zajlanak. Megvalósítható természetesen tiol-, vagy karboxil-csoporton keresztüli származékképzés is, bár ennek gyakorlati jelentősége kisebb [115,116]. A gyakorlatban elterjedt amin-reaktív származékképzőket az alábbi, II. táblázatban foglaltam össze:

II. táblázat A gyakorlatban alkalmazott származékképzők szerkezete és tulajdonságaik.

Származékképző vegyület képlete	gerjesztési hullámhossz	detektálási hullámhossz	Tulajdonságok
OPA (orto-ftálaldehid)			
	340 nm	455 nm	• Fluorogén • Tiol-csoportot tartalmazó vegyület jelenléte szükséges. • Gyors reakció (1-2 perc) • Instabil származékok képződnek.
NDA (2,3-naftalindialdehid)			
	420 nm, 440 nm	490 nm	• Fluorogén • Cianid ionok jelenléte szükséges • Drága lézerforrást igényel
CBQCA (3-(4-karoboxibenzoil)-2-kinolin-karboxaldehid)			
	488 nm	520 nm	• Fluorogén • Cianid ionok jelenléte szükséges. • Kevésbé érzékeny az NDA-hez képest.
FQ (5-furoilkinolin-3-karboxaldehid)			
	488	520 nm	• Fluorogén • Cianid ionok jelenléte szükséges. • Kevésbé érzékeny az NDA-hez képest.
NBD-F (7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol)			
	488 nm	520 nm	• A reakció során kevés fluoreszcens hidrolízistermék képződik. • Gyors reakció. • A származékok kevéssé fényérzékenyek. • pH-független fluoreszcencia

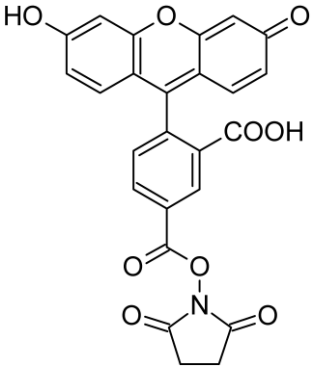
FITC (fluoreszcein-izotiocianát)



488 nm | 520 nm

- Fluorofór.
- Számos fluoreszcens hidrolízis melléktermék képződik.
- A képződő termékek stabilak.
- Fényérzékeny.

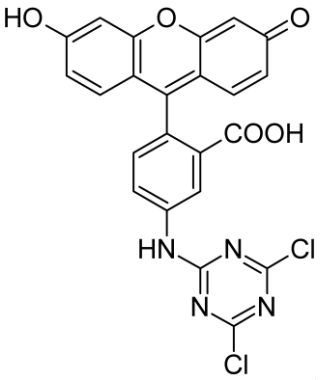
CFSE (5-karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter)



488 nm | 520 nm

- Fluorofór
- Hatékonyabb származékképzési reakció
- Kevesebb fluoreszcens hidrolízistermék
- Kevéssé elterjedt.

DTAF (5-(4,6-diklorotriazinilamino)-fluoreszcein)



488 nm | 520 nm

- Fluorofór.
- Kevesebb fluoreszcens hidrolízistermék
- Kevéssé elterjedt.

1.7.2.1 Fluorogén származékképzők

Az egyes származékképzők közül az orto-ftálaldehid (OPA) alkalmazása tekint vissza a leghosszabb múltra. Az OPA lúgos közegben, szobahőmérsékleten, redukáló tiol-tartalmú ágens (2-merkaptoetanol, N-acetil-cisztein) jelenlétében primer amino-csoportokkal képez fluoreszcens származékot, melyek 325 nm-en He-Cd lézerrel gerjeszthetők. Bár a reakció gyors (1-2 perc), a kialakult termék stabilitása alacsony,

amely reprodukálhatósági problémákat vet fel. Napjainkban használata egyértelműen visszaszorulóban van [115].

Az OPA-nál tapasztalható stabilitási problémák kiküszöbölésére számos analóg vegyületet szintetizáltak, melyek közül a 2,3-naftalindialdehid (NDA), az 5-furoilkinolin-3-karboxaldehid (FQ) és a 3-(4-karoboxibenzoil)-2-kinolin-karboxaldehid (CBQCA) alkalmazása terjedt el. Az OPA-hoz képest hosszabb reakció (15, 20, illetve 45 perc) során azonban jelentősen stabilabb izoindol-származékok képződnek. A stabilitás növekedése mellett tíz-százszoros érzékenységnövekedés érhető el [117-119]. A megfelelő reakció feltétele azonban cianid-ionok egyidejű jelenléte, amely megnehezíti a mintaelőkészítést és a mintakezelést, továbbá az NDA-származékok 450 nm-en gerjeszthetőek, ami speciális, drága lézerforrást igényel. Az FQ és a CBQCA származékok a hagyományos argon-ion lézerrel detektálhatók, azonban mind stabilitásban mind érzékenységben elmaradnak az NDA-származékokhoz képest. További fluorogén származékképzők a 9-fluorenilmetil-kloroformát (FMOC-Cl) az 1-dimetilaminonaftalin-5-szulfonil klorid (Dansyl-Cl) és a fluoreszkamin kapilláris elektroforézisben kevésbé használatosak, mind stabilitásban, mind érzékenységben elmaradnak a korábban tárgyalt vegyületektől [120].

A 7-kloro-, illetve 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-Cl, NBD-F) gyakran alkalmazott, fluorogén tulajdonságú származékképző vegyületek. A fluorozott származék mintegy tízszer reaktívabb a klórozott formánál, így rövid idő alatt (5-15 perc) bár viszonylag magas hőmérsékleten (55-65 °C) reagál primer és szekunder aminokkal [121]. Bár a reagens önmagában nem fluoreszkál, a vizes közegben képződő hidrolízistermék (NBD-OH) fluoreszcens tulajdonságú. A fluorofór származékképzőkhöz képest azonban még így is sokkal tisztább elektroferogram várható. A képződő származékok 488 nm-en gerjeszthetők.

1.7.2.2 Fluorofór származékképzők

A gyakorlatban elterjedt fluorofór származékképzők jellemzően fluoreszcein típusú vegyületek. A képződő származékok stabilitása és magas kvantumhatásfoka miatt a kapilláris elektroforézis módszerek esetében gyakran alkalmazott reagensek. A hidrolízis során képződő nagyszámú fluoreszcens melléktermék, valamint a reagens feleslege miatt azonban az elválasztás körülményeit körültekintően kell megválasztani.

A fluoreszcein-izotiocianát (FITC) egyike a legszélesebb körben alkalmazott amin-reaktív származékképzőknek. Mind primer, mind szekunder aminokkal reagál, a képződő származékok stabilak és erőteljes fluoreszcenciával rendelkeznek. A reakció tipikusan szobahőmérsékleten megy végbe és relatív hosszú időt (16 óra) igényel [122-124], bár egyes szerzők magasabb hőmérsékleten történő, rövidebb idejű származékképzésről is beszámoltak [125,126]. A reakció katalízisére használt piridin hatása nem egyértelműen bizonyított. Az analízist megelőzően általában a minták 50-100-szoros hígítása szükséges.

Szintén fluoreszcein analóg vegyületek az 5-(4,6-diklorotriazinilamino)-fluoreszcein (DTAF) és az 5-karboxifluoreszcein-szukcinimidil észter (CFSE), melyek kevésbé hajlamosak hidrolízisre és reaktívabbak, ugyanakkor a FITC-hez hasonlóan a gerjesztési maximumuk 488 nm közelébe esik. A magasabb reaktivitás hatékonyabb és gyorsabb származékképzést eredményez [127,128,123,129]. Előnyös tulajdonságaik ellenére kevésbé számítanak elterjedt származékképző vegyületeknek.

Az egyes kutatócsoportok által kifejlesztett származékképzők, mint pl. a 6-oxi-(N-szukcinimidil-acetát)-9-(2´-metoxi-karbonil)-fluoreszcein (SAMF), vagy az N-hidroxiszukcinimidil-fluoreszcein-O-acetát (SIFA) kereskedelmi forgalomban nem hozzáférhetőek, így alkalmazásuk csak néhány tanulmányra korlátozódik [130,131]. Tiol-reaktív fluoreszcein származék az 5-jódacetamido-fluoreszcein, amely biológiai minták tiol-csoporttal rendelkező komponenseinek (cisztein, homocisztein, glutation) meghatározására használatosak [132]. Kis molekulák analízisére kevéssé terjedtek el a cianin alapú, infravörös lézerrel gerjeszthető származékképzők. Használatuk nem jár jelentős érzékenységnövekedéssel.

2 Célkitűzések

Munkám során olyan nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszereket kívántam kidolgozni, melyek alkalmasak biológiai mintákban jelenlévő, alacsony koncentrációjú excitátoros aminosav neurotranszmitterek gyors és hatékony meghatározására.

Célul tűztem ki:

1. Nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszer kidolgozását és validálását aszpartát és glutamát egyidejű akirális meghatározására mikrodializátumokból.

2. A Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben az aszpartát és a glutamát felszabadulási kinetikájának vizsgálatát házi csirkékben, mikrodialízis segítségével.

3. Aszpartát és glutamát enantiomerek egyidejű elválasztására alkalmas királis kapilláris elektroforézis módszer kidolgozását és validálását.

4. További együttműködésben excitátoros aminosav enantiomerek, ezen belül különös hangsúllyal a D-aszpartát koncentrációjának vizsgálatát házi csirkék különböző agyterületeiről származó szövetmintákban.

3 Módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

Standardok: az L-aszparaginsavat, D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat, valamint a DL-γ-karboxiglutaminsavat a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA), míg a mononátrium-L-glutamát monohidrátot, valamint az L-ciszteinsavat a Fluka-tól (Buchs, Svájc) vásároltuk. A vegyületeket 10^{-2} M koncentrációban oldottuk mesterséges gerincvelő folyadékban (ACSF), melyet a Semmelweis Egyetem Gyógyszertára biztosított számunkra. A törzsoldatokat a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Származékképzők: a származékképzéshez használt fluoreszcein-izotiocianát I izomert (FITC) az Invitrogen-től (Eugene, OR, USA), a 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazolt (NBD-F) és a karboxifluoreszcein szukcinimidil észtert (CFSE) a Sigma-Aldrich-tól szereztük be. Az NBD-F-et abszolút etanolban oldottuk 1,2 mg/ml koncentrációban, míg a FITC-et acetonban a CFSE-t pedig dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk, 1 mM töménységben.

Királis szelektorok: a kapilláris elektroforézishez minősített β-ciklodextrint (β-CD), γ-ciklodextrint (γ-CD), heptakis-(2,6-di-O-metil)-β-ciklodextrint (szubsztitúciós fok: 14, DM-β-CD), random metilált-β-ciklodextrint (szubsztitúciós fok: 12, RM-β-CD), valamint az izomertiszta 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxil)propilamino-β-ciklodextrin hidrokloridot (HPA-β-CD) a Cyclolab Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk, míg a (2-hidroxi-propil)-β-ciklodextrin (szubsztitúciós fok: 3, HP-β-CD) a Beckman Coulter Inc.-től (Brea, CA, USA) származott.

Az állatkísérletek során használt tetrodotoxint, ketamin hidroklorid/xylazin hidroklorid oldatot, valamint az etilén-glikol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N`,N`-tetraecetsavat (EGTA) a Sigma-Aldrich-tól szereztük be, míg a fogászati cementet (Duracryl) a Spofa Dental-tól (Prága, Cseh Köztársaság) vásároltuk.

A kapillárisfal borításához használt N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamint (TEMED), illetve akrilamidot a Fluka-tól, míg a 3-(trimetoxi-szilil)propil-metakrilátot a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk.

Egyéb vegyszerek: a bórsav, a nátrium-lauril-szulfát (SDS), a dinátrium-karbonát, a nátrium-hidroxid a Sigma-Aldrich-tól származott. Az abszolút etanolt, DMSO-t és az acetont a Reanaltól (Budapest, Magyarország), a HPLC-hez minősített acetonitrilt és metanolt a Merck-től (Darmstadt, Németország) szereztük be.

3.2 Készülékek

A kísérletekhez egy P/ACE-MDQ (Beckman Coulter) kapilláris elektroforézis készüléket használtunk. A detektálás során 488 nm hullámhosszúságú argon-ion lézerforrást (Beckman Coulter) alkalmaztunk, az emittált fluoreszcenciát 520 nm-en detektáltuk. Az elválasztások során 75 μm belső átmérőjű (365 μm külső átmérőjű) ömlesztett kvarc kapillárisokat használtunk (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). A kapillárisfal poliakrilamiddal történő borítását Hjertén és munkatársai által kidogozott protokoll szerint végeztük [133].

A mikrodialízis kísérletek során beültetett szondákat (EI-A-Z-1, 1,5 mm aktív hossz) az Eicom-tól vásároltuk (Kyoto, Japán). A szondák perfúziója egy állandó áramlást biztosító pumpával (Stoelting, Dublin, Írország), míg a perfúziós médiumok cseréje egy polietilén csővezetékekből és váltórendszerből álló készülékkel (CMA Microdialysis AB, Solna, Svédország) történt.

3.3 Származékképzés

Mindegyik származékképzővel történt reakció során hasonló megfontolásokat alkalmaztunk. Tipikusan 5 μl mintát vagy standard oldatot kevertünk össze 5 μl belső standardot tartalmazó származékképző pufferrel, illetve 5 μl származékképző oldattal. Ezt követően hagytuk a reakciót a megfelelő ideig, megfelelő hőmérsékleten végbemenni, majd az analízis kezdetéig a mintákat -20 °C-on tároltuk.

3.3.1 NBD-F

A mintához abszolút etanolban oldott, 1,2 mg/ml koncentrációjú származékképzőt, illetve 20 mM pH 8,5 borát puffert adtunk, majd a reakcióelegyet 60 °C-on 15 percig tartottuk. A származékképző puffer belső standardként akirális elválasztás esetén 1 μM

DL-γ-karboxi-glutamátot, míg királis elválasztás esetén 1 μM L-ciszteinsavat tartalmazott. Az analízis kezdetén a mintákat desztillált vízzel négyszeres térfogatra hígítottuk.

3.3.2 FITC

A mintához acetonban oldott, 1 mM koncentrációjú származékképzőt, illetve 100 mM pH 9,0 nátrium-karbonát puffert adtunk. A reakció szobahőmérsékleten, 16 óráig ment végbe. A származékképző puffer belső standardként 1 μM DL-γ-karboxi-glutamátot tartalmazott. Az analízist kezdetén a mintákat desztillált vízzel százszoros térfogatra hígítottuk.

3.3.3 CFSE

A mintához DMSO-ban oldott, 1 mM koncentrációjú származékképzőt, illetve 20 mM pH 8,5 borát puffert adtunk. A reakció szobahőmérsékleten, 4 óráig ment végbe. A származékképző puffer belső standardként 1 μM γ-karboxi-glutamátot tartalmazott. Az analízis kezdetén a mintákat desztillált vízzel százszoros térfogatra hígítottuk.

3.4 Elválasztási körülmények

Mind az akirális, mind a királis elválasztások 100 mM borát pufferben történtek. Az akirális elválasztások esetén a FITC és az NBD-F származékok elválasztása pH 8,5-en, a CFSE származékok elválasztása pH 8,0-en történt. A FITC származékok elválasztása során a háttérelektrolit 20 mM nátrium-lauriszulfátot, míg az NBD-F származékok esetén 8 mM β-CD-t is tartalmazott. Az effektív kapillárishossz 10 és 30 cm között, míg az alkalmazott feszültség 300-500 V/cm között változott. A mintainjektálás hidrodinamikai úton, 3,447 kPa nyomás 5 másodpercig való alkalmazása útján történt.

A királis elválasztások pH 8,0-en, 5 mM HPA-β-CD és 8 mM DM-β-CD szelektor jelenlétében, 50 cm effektív kapillárishossz és 400 V/cm alkalmazott feszültség mellett történt. A mintainjektálás a korábbiakhoz hasonlóan hidrodinamikus úton történt (20 s - 6,89 kPa). A készülék vezérlését, az adatgyűjtést, valamint az elektroferogramok kiértékelését a gyártó által biztosított 32 Karat szoftver 5.0-ás verziójával végeztük.

3.5 Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézet munkatársai, míg a mintaanalízist kutatócsoportunk végezte. Kísérleteinket 1-4 napos csirkéken végeztük, melyeket a Bábolna Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be. Az állatkísérletek során betartottuk a Semmelweis Egyetem Etikai Tanácsának laboratóriumi állatok tartására és kezelésére vonatkozó szabályzatát, mely összhangban van az Európa Tanács laboratóriumi állatok tartására vonatkozó direktíváival (86/609/EEC). Az állatokat klimatizált helyiségben (22 ± 2 ºC), 12 órás sötét/világos ciklus mellett tartottuk, és *ad libitum* fogyaszthattak standard laboratóriumi tápot és csapvizet.

3.5.1 Mikrodialízis szonda beültetése

A kísérleti állatok az érkezésüket követő 24 órán belül átestek a beültetésen. A beavatkozást ketamin-xilazin keverékével (40, illetve 8 mg/ttkg) kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozícionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük. A mikrodialízis-szondát a baloldali mediális striátumba ültettük (pontos koordináták: a bregmától 3,8 mm-re kaudálisan, a koponya középvonalától 1,1 mm-re laterálisan, az agy külső felszínétől 5,8 mm-re ventrálisan) és fogászati cementtel rögzítettük a koponyacsonton. A mikrodialízis kísérletet a beültetéstől számított 12 órás lábadozási idő után kezdtük meg. A kísérletet követően az állatokat mély anesztéziában dekapitáltuk, majd az eltávolított agyszövetből standard szövettani módszerekkel (Nissl-festés) igazoltuk a mikrodialízis szonda pontos beültetését.

3.5.2 Mikrodialízis kísérletek

A kísérlet során az állatokat egyesével üvegfalú, felül nyitott dobozba helyeztük. A mikrodialízis-szondán keresztül ACSF-et (120 mM Na^+, 6 mM K^+, 2 mM Ca^{2+}, 125 mM Mg^{2+}, 129 mM Cl^-, 125 mM $H_2PO_4^-$, 21 mM HCO_3^-, pH 7,4) perfundáltunk. Az áramlási sebesség 1, illetve 0,5 µl/perc volt. A perfúzió kezdetétől számított 2-3 óra elteltével kezdtük a mintagyűjtést. Az egyes mintafrakciókat (áramlási sebességtől függően 2,5, illetve 5 µl) polipropilén mintatartó csövekbe gyűjtöttük (PCR cső), a gyűjtést követően a mintákat a további vizsgálatokig - 80 °C-on tároltuk. A kezeléseket

megelőzően minden állat esetén 5-9 (25-45 perc) mintafrakciót gyűjtöttünk az alapkoncentrációk megállapításához. A fizikai stresszt a kísérletező váltotta ki az állatokból, míg a kémiai stimuláció (Ca^{2+}-megvonás, KCl, TTX) a perfúziós folyadék cseréjével történt. A kémiai stimulációt kiváltó vegyületeket megfelelő koncentrációban (10 μM TTX, 50 mM KCl) ACSF-ben oldottuk, míg a Ca^{2+}-megvonást Ca^{2+}-mentes ACSF-el értük el (120 mM Na^+, 6 mM K^+, 125 mM Mg^{2+}, 254 mM Cl^-, 125 mM $H_2PO_4^-$, 21 mM HCO_3^-, pH 7,4), amely 2 mM EGTA-t is tartalmazott.

3.5.3 Szövetminták

A D-aminosav analízishez használt szövetmintákat egynapos csirkékből nyertük. Az állatokat mély ketamin-xylazin anesztéziában dekapitáltuk. A megfelelő agyterületek eltávolítása sztereomikroszkóp alatt történt, majd a mintákat a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A szövetmintákhoz mg-onként 10 μl acetonitril-víz elegyet (2:1) adtunk, ultrahanggal rövid ideig (5 s) homogenizáltuk, majd ezt követően centrifugáltuk (3,000×g, 10 perc, 4 °C). A felülúszókat ACSF-el tízszeres térfogatra hígítottuk, majd a korábban leírtaknak megfelelően végeztük a származékképzést.

3.6 Módszervalidálás

Mind az akirális módszerek, mind a királis módszer validálását az FDA bioanalitikai módszerfejlesztési irányelvei alapján végeztük [134]. A kvantitatív meghatározás érdekében belső standardként (IS) az akirális módszerek esetében DL-γ-karboxi-glutamátot, míg a királis módszer esetében L-ciszteinsavat alkalmaztunk. A kalibrációs egyenes megalkotásához hat különböző koncentrációjú standard mintát használtunk, minden koncentráció esetében öt párhuzamos mérést végeztünk. A napon belüli és napok közötti pontosság és torzítatlanság értékek meghatározásához alacsony, közepes és magas koncentrációjú standard mintákat használtunk (akirális elválasztás: 0,1, 0,5 és 1 μM; királis elválasztás: 0,1, 0,5 és 1 μM D-aminosavakra, 5 25 és 50 μM L-aminosavakra). A rendszer pontosságát a mérések relatív szórás-értékeivel jellemeztük. A módszer torzítatlanságának jellemzése során a mért aminosav koncentrációt a nominális koncentráció százalékában adtuk meg. A napon belüli megbízhatósági adatok meghatározásához öt-öt párhuzamost használtunk. A napok

közötti megbízhatósági adatok meghatározásához a méréseket öt egymást követő napon megismételtük, minden nap három-három párhuzamos mérést végeztünk. Kvantitálási határnak azt a koncentrációértéket fogadtuk el, ahol a torzítatlanság 80 és 120 % között volt és a pontosság (a mérések relatív szórása) nem haladta meg a 20 %-ot. A királis módszervalidálás során a standard mintákban az L-enantiomer koncentrációja 50-szerese volt a D-enantiomerének, mindkét aminosav esetében.

A minták stabilitásának meghatározásához három eltérő koncentrációjú standardot használtunk (a napon belüli, illetve a napok közötti torzítatlanság és pontosság meghatározásához hasonlóan). A minták koncentrációját meghatároztuk a származékképzést követően azonnal, a készülék mintatartójában történő 1 vagy 2 órás tárolást követően, illetve 1 napos 4 °C-on történő tárolás után. A mérésekhez három-három párhuzamost használtunk.

3.7 Statisztikai és számítási módszerek

A kalibrációs pontokra történő egyenes illesztést a Sigma Plot szoftverrel (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA) végeztük. Minden esetben súlyozott lineáris regressziót alkalmaztunk.

A mikrodialízis kísérletek során a kezelést közvetlenül megelőző három mintában mért aminosav-koncentrációk átlagát vettük alapkoncentrációnak (100%-nak) és ennek százalékában fejeztük ki a kezelések során mért koncentrációszinteket.

Az egyes kezelések eredményeit Mann–Whitney-U (MW-U) teszttel hasonlítottuk össze. Wilcoxon próbát (WSR teszt) használtunk az alapkoncentrációk összehasonlítása során. Nemparametrikus variancia-analízisre Kruskal–Wallis (K-W teszt), valamint Friedman tesztet alkalmaztunk.

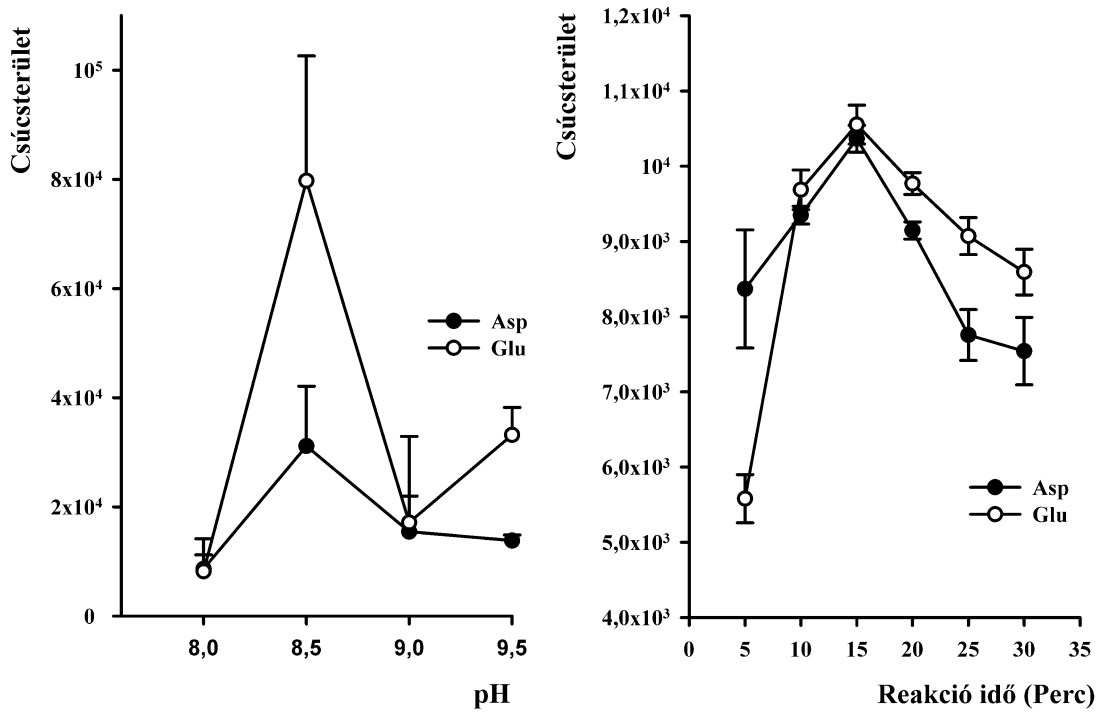
4 Eredmények

4.1 Aszpartát és glutamát akirális elválasztása

A megfelelő érzékenység eléréséhez lézerindukálta-fluoreszcencia detektálást használtunk, amely szükségessé tette az aminosavakból fluoreszcens származékok képzését az elválasztását megelőzően. Esetünkben az argon-ion lézer gerjesztési hullámhosszának (488 nm) megfelelő amin reaktív származékképzők között kerestük a legmegfelelőbbet. Az elválasztások során borított falú kapillárist alkalmaztunk, mely az EOF elnyomásával lehetővé tette a vegyületek gyors, anód irányú elválasztását. Az elválasztásokat lúgos pH-n (7-9) végeztük, figyelembe véve, hogy az aszpartát, valamint a glutamát származékképzésüket követően, karboxil-csoportjaik révén, ilyen körülmények között két negatív töltéssel rendelkeznek. A magas töltés-tömeg aránnyal rendelkező aminosav-származékok gyors vándorlásának következtében az analízisidő általánosságban nem haladta meg az 5 percet. A kapillárisfal borítására gyakorolt negatív hatása miatt pH 9,0-nál lúgosabb kémhatású pufferoldatot nem vizsgáltunk. Hasonló migrációs tulajdonságai miatt belső standardként a három karboxil-csoporttal rendelkező γ-karboxi-glutamátot választottuk.

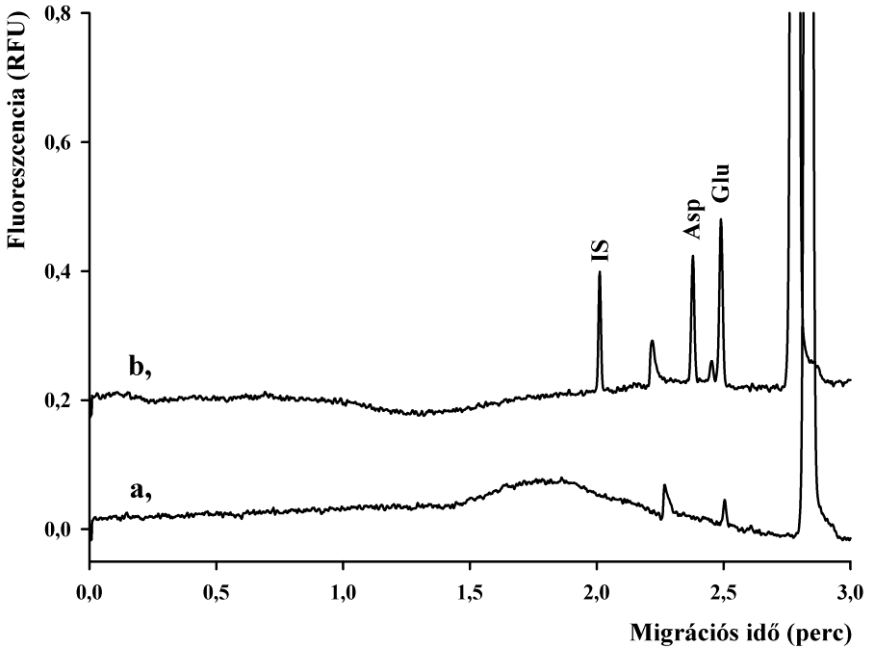
4.1.1 NBD-F származékok elválasztása

Intézetünkben már korábban is alkalmaztak NBD-F-et származékképzőt diaminok valamint lizin meghatározására, mely vizsgálatok során a származékképzés körülményeinek optimalizálása megtörtént [135]. Az aszpartát-, valamint a glutamát-tartalmú minták származékképzése során ezen paramétereket tekintettük kiindulási pontnak, majd vizsgáltuk a pH és a reakcióidő hatását a származékképzés hatékonyságára. A csúcsterületek 20 mM, pH 8,5 borát puffer alkalmazása és 15 perces reakcióidő mellett mutattak maximumot (4. ábra).

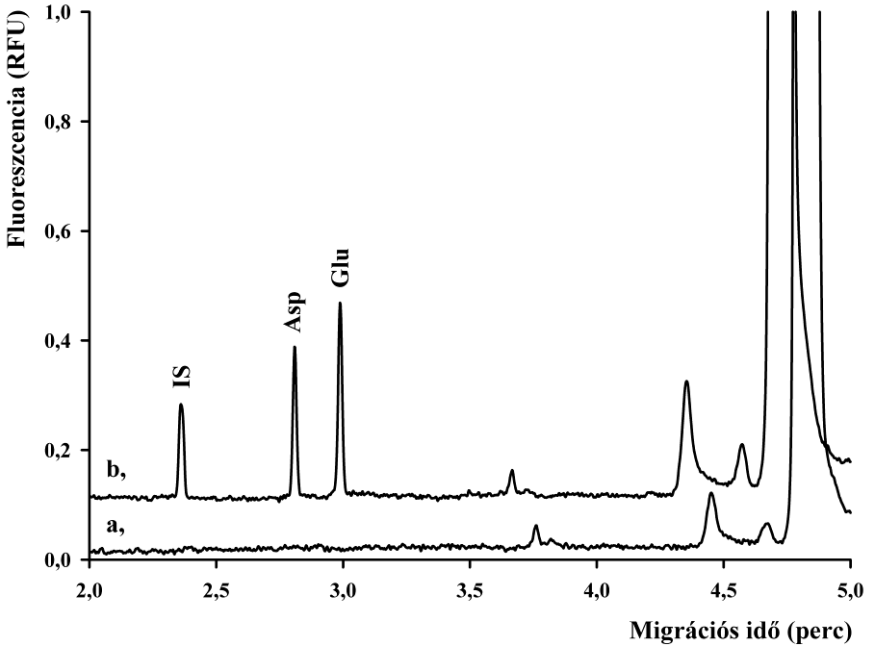


4. ábra NBD-F-dal történő származékképzés pH, valamint időfüggése.

Száz mM pH 8,5 borát pufferben az általunk vizsgálni kívánt vegyületek elválaszthatóak voltak. Megfigyelhető volt azonban a reagensfeleslegből származó minor hidrolízistermékek zavaró hatása az elválasztásra (5. ábra). Minthogy a származékképző molekula nem hordoz további protonálható vagy deprotonálható csoportokat, az elválasztás minősége és hatékonysága a lúgos pH tartományban állandónak tekinthető. Az elválasztás hatékonyságának és szelektivitásának növelését így segédanyagok alkalmazásával kívántuk megvalósítani. Számos, gyakran alkalmazott segédanyag (szerves módosítók, detergensek, ciklodextrinek) hatását megvizsgáltuk, amelyek közül a β-CD-t alkalmazását találtuk a legmegfelelőbbnek (6. ábra). 8 mM β-CD hozzáadása a pufferhez növelte a szelektivitást, ugyanakkor csökkentette a vegyületek migrációs sebességét, így kismértékben növelte az analízisidőt. A vizsgált vegyületek megfelelő elválasztásához azonban már 10 cm effektív kapillárishossz is elegendőnek bizonyult, így az analízisidő alig haladta meg a 3 percet.



5. ábra NBD-F származékok elválasztása.
a, ACSF vak minta; b, 1 µM Asp, Glu ill. IS tartalmú minta;
Elválasztási körülmények: 10/30 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5; 300 V/cm, 25 º C

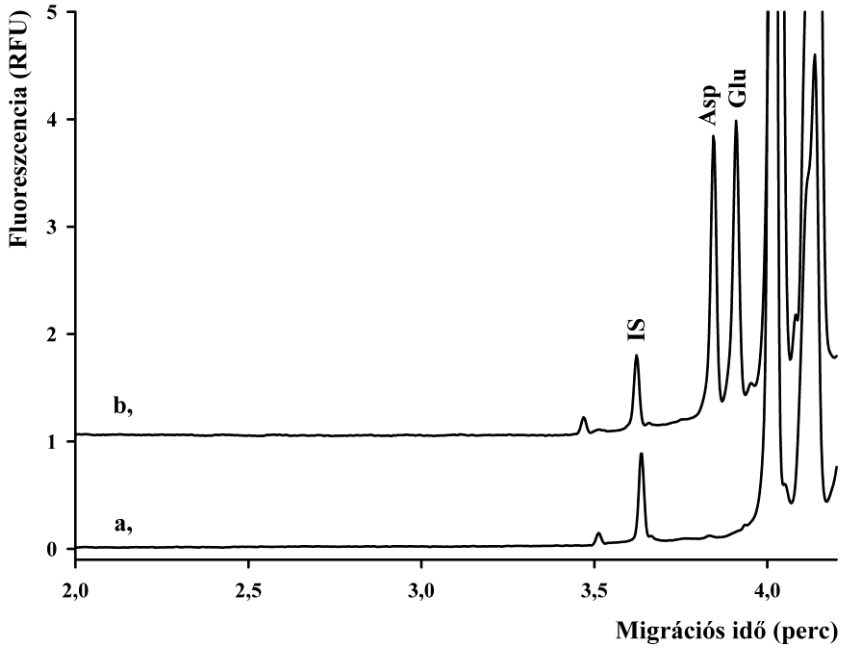


6. ábra NBD-F származékok elválasztása β-ciklodextrin jelenlétében.
a, ACSF vak minta; b, 1 µM Asp, Glu ill. IS tartalmú minta;
Elválasztási körülmények: 10/30 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5, 8 mM β-CD; 300 V/cm, 25 º C

4.1.2 FITC származékok elválasztása

A FITC-el történő származékképzést egy korábbi közlemény [136] alapján minimális módosításokkal végeztük. A FITC koncentráció 10^{-3} M és 10^{-4} M közötti tartományban vizsgálva nem befolyásolta jelentősen a származékképzés hatékonyságát, azonban 10^{-3} M-nál magasabb koncentrációban a reagensfelesleg zavaró hatása az elválasztás minőségét jelentősen rontotta. Figyelembe véve a biológiai mintákban várható magas amin koncentrációt, a származékképzőből a legmagasabb, az elválasztás szempontjából még optimális koncentrációt választottuk. A származékképzés során alkalmazott pH, illetve a származékképzés idejének hatását nem vizsgáltuk, tekintve, hogy ezt korábban más szerzők részletesen tanulmányozták [136,137].

A borát puffer kémhatása adott határokon belül (pH 8,0-9,0) nem befolyásolta jelentősen az elválasztást, ezért 100 mM pH 8,5 borát puffert alkalmaztunk. Mivel számos hidrolízistermék is megjelent az elektroferogramon, az elválasztás hatékonyságát puffermódosítók alkalmazásával próbáltuk növelni. Lényeges javulást egyik szokásosan alkalmazott módosító sem eredményezett, de 20 mM SDS hozzáadása a pufferhez javította a csúcsalakot, ezért alkalmazása mellett döntöttünk. A megfelelő elválasztás érdekében 20 cm effektív kapillárishosszt alkalmaztunk, mely 4,5 perces analízisidőt eredményezett (7. ábra).



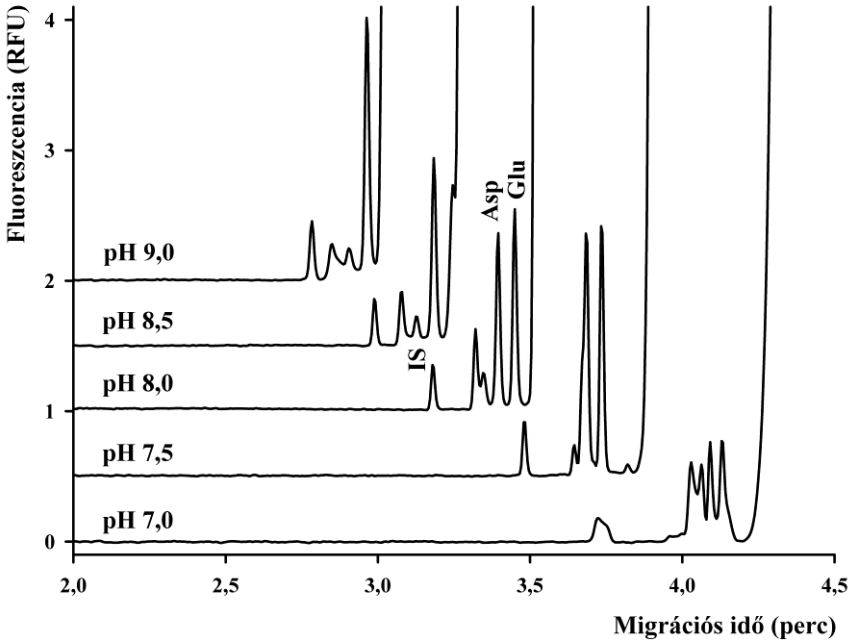
7. ábra FITC származékok elválasztása.
a, ACSF vak minta; b, ill. c, 1 µM Asp, Glu ill. 0,5 µM IS tartalmú minta;
Elválasztási körülmények: 20/30 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5, 20 mM SDS; 300 V/cm, 25 º C

4.1.3 CFSE származékok elválasztása

A CFSE-vel történő származékképzést egy korábbi közleményben [123] leírtaknak megfelelően, minimális módosítással végeztük. A reakcióidő hatását vizsgáltuk a származékképzésre és a hidrolízis termékek kialakulására. Azt tapasztaltuk, hogy a reakcióidő növelésével az elválasztást zavaró, feltehetően bomlástermék eredetű csúcsok gyors növekedést mutattak. A bomlástermékek és az elválasztani kívánt aminosav-származékok csúcsainak aránya 4 órás származékképzés mellett volt optimális.

Az elválasztás során az aminosav származékok, illetve a bomlástermékek együttes vándorlása jelentős pH függést mutatott. Míg alacsony pH-n a minor bomlástermékek zavaró hatása vált jelentőssé, magas pH-n a glutamát csúcs nem vált el a reagensfeleslegből származó csúcstól. Optimális felbontást pH 8,0 borát puffer és 40 cm effektív kapillárishossz alkalmazásával kaptunk (8. ábra). A bomlástermékekkel történő együttes vándorlás azonban ekkor is megfigyelhető volt, amit segédanyagok alkalmazásával sem lehetett megszüntetni. Az együtt vándorló csúcsok zavaró hatását a

származékképzés reakcióidejének megfelelő megválasztásával tudtuk minimálisra csökkenteni.



8. ábra Az alkalmazott pH hatása a CFSE származékok elválasztására.
1 µM Asp, Glu ill. 0,5 µM IS tartalmú minták
Elválasztási körülmények: 40/50 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, változó pH; 500 V/cm, 25 º C

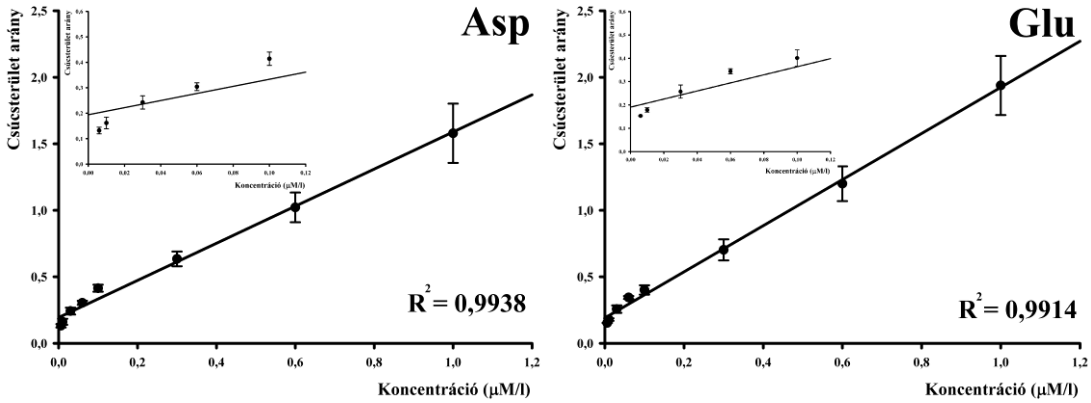
4.1.4 Módszervalidálás

Mindhárom származékképző alkalmazásával kidolgozott elválasztási módszer validálását elvégeztük. Ennek során mind aszpartátra, mind glutamátra hétpontos kalibrációs görbét készítettünk 0,03 µM és 1 µM közötti koncentráció tartományban. A belső standardra normalizált csúcsterület értékek felhasználásával a FITC, illetve CFSE származékok esetében a teljes tartományban, míg az NBD-F származékok esetében a 0,1 µM és 1 µM tartományban találtuk lineárisnak a koncentrációfüggést (III. táblázat). Lineárisnak az R^2>0,995 regressziós koefficienssel rendelkező kalibrációs görbéket tekintettük.

III. táblázat Eltérő származékok esetén kapott regressziós paraméterek.

		Egyenletek	Korrelációs koefficiens
NBD-F	**Asp**	**y = 0,5963x - 0,0147**	**0,9938**
	Glu	**y = 0,5204x - 0,0551**	**0,9914**
FITC	**Asp**	**y = 0,2338x - 0,0360**	**0,9988**
	Glu	**y = 0,2053x - 0,0422**	**0,9986**
CFSE	**Asp**	**y = 0,3785x - 0,0887**	**0,9985**
	Glu	**y = 0,3104x - 0,0474**	**0,9986**

A NBD-F származékok kalibrációja során azt tapasztaltuk, hogy az illesztett egyenes az alacsony koncentrációknál jelentős eltérést mutat a mért értékekhez képest, vagyis a kalibrációs görbe 0,1 μM alatt elhajlik (9. ábra).



9. ábra NBD-F-dal történő származékképzés során kapott kalibrációs görbék. A kinagyított részleteken jól látható az illesztett egyenestől való elhajlás

Ez a tapasztalt elhajlás a FITC, valamint a CFSE származékoknál kevésbé volt egyértelmű, azonban az alacsony koncentrációértékeknél a regresszió relatív hibája magas volt (> 20%). Az LOD az NBD-származékok esetében volt a legmagasabb: aszpartát esetében 9,8 nM, glutamát esetében pedig 7,8 nM. A FITC származékok esetében mindkét aminosavra 3,5 nM, míg a CFSE származékok vizsgálata során megállapított LOD aszpartát esetében 1,3 nM-nak, glutamát esetében pedig 1,5 nM-nak adódott. Mindhárom származékképző esetében a módszerek napon belüli (IV. táblázat) és napok közötti (V. táblázat) pontosság és torzítatlanság értékei elfogadhatónak bizonyultak 0,1 0,5 és 1 μM koncentráció szinteken. Alacsonyabb koncentrációtartományban a pontosság, valamint a torzítatlanság értékek már nem megfelelőek annak ellenére, hogy a detektálási határok több mint egy nagyságrenddel alacsonyabbak. Az eredményeknek megfelelően a validációs adatok alapján

megállapított kvantitatív mérési határt mindhárom származékképző esetében 0,1 μM-nak találtuk, a detektálási határok jelentős különbsége ellenére.

IV. táblázat A három fluoreszcens származékképző alkalmazásán alapuló módszerek napon belüli megbízhatóság értékei (n = 6).

		NBD-F		FITC		CFSE	
		Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)
0,1 μM	Asp	113	10,0	110	4,3	111	8,9
	Glu	108	11,0	96	13,5	105	10,3
0,5 μM	Asp	97	2,0	103	1,5	100	2,7
	Glu	90	8.6	96	2,6	102	4,0
1 μM	Asp	95	6.4	103	3,0	103	0,1
	Glu	111	2,0	102	3,8	101	0,3

[a] Torz.: torzítatlanság
[b] Pont.: pontosság

V. táblázat A három fluoreszcens származékképző alkalmazásán alapuló módszerek napok közötti megbízhatóság értékei (öt egymást követő napon 3-3 párhuzamos).

		NBD-F		FITC		CFSE	
		Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)
0,1 μM	Asp	105	16,0	102	6,7	105	5,2
	Glu	106	14,2	105	5,5	105	5,8
0,5 μM	Asp	101	5,0	104	4,3	100	2,7
	Glu	95	7,7	99	4,4	100	2,7
1 μM	Asp	98	4,6	104	2,4	101	2,1
	Glu	103	2,5	103	4,7	100	2,5

[a] Torz.: torzítatlanság
[b] Pont.: pontosság

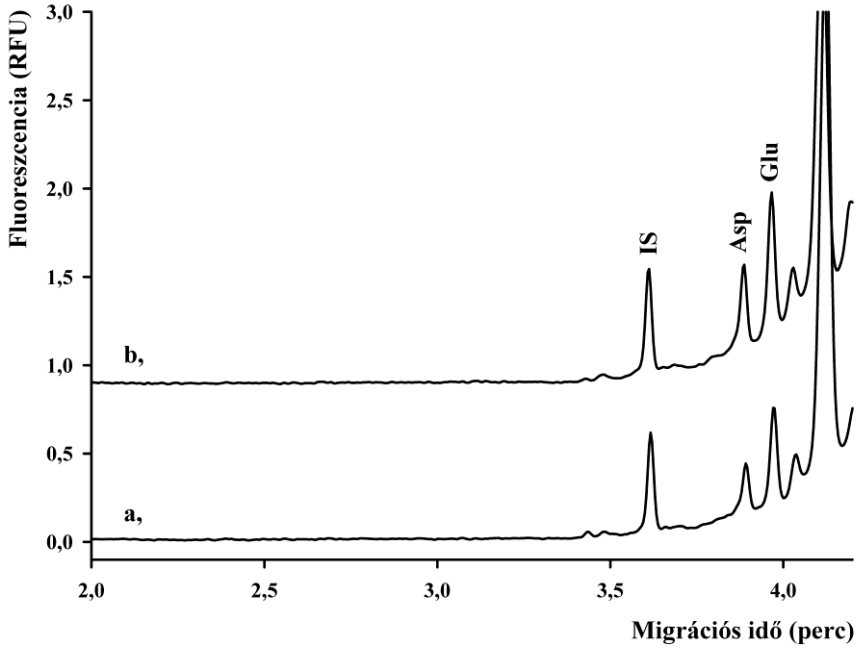
A stabilitási mérések során a FITC, valamint a CFSE származékokat három olvasztás-fagyasztás ciklus, valamint a készülék mintatartójában történő 2 órás tárolás után stabilnak találtuk (VI. táblázat). Az NBD-F származékok esetében a készülék mintatartójában történő két órás állást követően a csúcsterületek jelentősen csökkentek (>20%).

VI. táblázat Az elkészített minták stabilitása 3 olvasztás-fagyasztás ciklust ill. a készülék mintatartójában történő 2 órás tárolást követően (3-3 párhuzamos).

		Olvasztás - fagyasztás		Készülék mintatartó	
		FITC	CFSE	FITC	CFSE
0,1 μM	Asp	106%	90%	106%	100%
	Glu	107%	84%	107%	101%
0,5 μM	Asp	114%	101%	114%	95%
	Glu	114%	93%	114%	94%
1 μM	Asp	96%	104%	96%	98%
	Glu	95%	103%	95%	97%

4.1.5 Mikrodializátumok vizsgálata

A nagyszámú mikrodialízis minta vizsgálatára a legjobb stabilitást mutató FITC származékképző vegyületet választottuk. A módszer alkalmazhatóságának további megerősítésére a kísérleti állatok striátumából származó mikrodializátumokhoz a mért aszpartát, valamint glutamát mennyiségének megfelelő mennyiségű, standardból készült mintát kevertünk. A biológiai mintában mért 0,12 μM aszpartáthoz, illetve 0,2 μM glutamáthoz annyi standard mintát adtunk, hogy 0,18 μM és 0,3 μM, illetve 0,24 μM és 0,4 μM legyen az aszpartát és a glutamát végkoncentrációja (10. ábra). Az ilyen módon elkészített mintákban a meghatározandó vegyületek koncentrációjában bekövetkező 50, illetve 100%-os növekedést megfelelő, 101-109%-os torzítatlansággal és 5,5-13,2% pontossággal tudtuk mérni.



10. ábra Mikrodializátum FITC-el történő származékképzést követő elválasztása.
a, egyesített mikrodializátum; b, 50%-os csúcsaddíciójú minta
Elválasztási körülmények: 20/30 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5, 20 mM SDS; 300 V/cm, 25 ° C

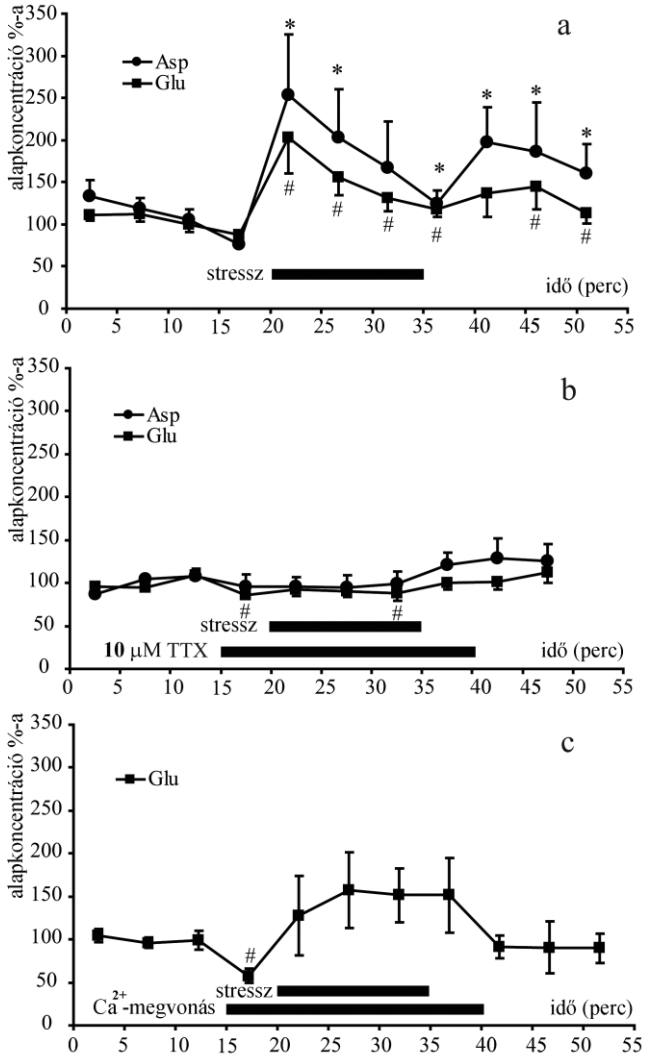
4.2 Aszpartát és glutamát extracelluláris koncentrációváltozásának *in vivo* vizsgálata

Az excitátoros aminosavak koncentrációváltozását a mikrodializátumokban a kísérleti állatok kezelését megelőzően nyert mintákban mérhető koncentrációk (nyugalmi koncentrációk) átlagára (alapkoncentráció, 100%) vonatkoztatva fejeztük ki. Bár az egyes állatokban mért alapkoncentrációk eltérő áramlási sebesség esetén különbözőek voltak, az aszpartát aránya minden esetben közel azonos volt. Az egyes kísérletsorozatok esetén 1 µl/perc átfolyási sebesség mellett kapott alapkoncentráció átlagok között nem találtunk szignifikáns különbséget (K-W teszt: χ^2>9,4, ill. p>0,15 mindkét aminosavra). Az alacsonyabb, 0,5 µl/perc átfolyási sebességgel nyert mintákban szignifikánsan magasabb alapkoncentrációkat mértünk (χ^2=23,8, ill. p<0,005 glutamát esetén, χ^2=19,9, ill. p>0,05 aszpartát esetén). Az átfolyási sebesség ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan az aszpartát arányát a teljes excitátoros aminosav koncentrációhoz képest (χ^2=12,2, ill. p=0.144), azonban a nagyon alacsony térfogatú minták kezelése problematikusnak bizonyult. A továbbiakban a kísérletek

során 1 µl/perc átfolyási sebességet alkalmazva 5 µl térfogatú frakciók gyűjtésével 5 perces időbeli felbontást értünk el.

4.2.1 Az aszpartát és a glutamát koncentráció változása a mikrodializátumban stressz hatására

A kísérletek során az állatokat 15 percen keresztül manuálisan stresszeltük („mild-chasing"), ami következményes menekülési reakciót váltott ki. Stressz hatására mindkét aminosav koncentrációja szignifikánsan megnőtt és a stressz-hatás alatt végéig emelkedett maradt az alapkoncentrációhoz képest (Friedmann teszt aszpartátra: χ^2=13,2, df: 5, p = 0,021, ill. glutamátra χ^2=16,9 df: 5, p<0,005; 11/a ábra), ugyanakkor az egyes állatokból származó értékek között jelentős szórást tapasztaltunk. A stresszhatás alatt mért koncentrációk csökkenő tendenciát mutattak az idő előrehaladtával. Míg a Na^+-csatorna gátló, ezáltal a szinaptikus ürülést blokkoló hatású TTX együttes adása során a stresszhatás semmilyen szignifikáns változást nem okozott az aminosavak koncentrációjában (11/b ábra), a TTX önmagában kicsiny de szignifikáns koncentrációcsökkenést váltott ki (Friedmann teszt aszpartátra χ^2=17,6, df: 8 p<0,05, ill. glutamátra χ^2=18,6, df: 8, p<0,05). Ca^{2+}-mentes, EGTA-t tartalmazó ACSF alkalmazása mellett a stressz okozta látszólagos glutamát koncentrációemelkedést nem találtuk szignifikánsnak (Friedmann teszt: χ^2=9,02, df: 8 p=0,34; 11/c ábra). Az aszpartát Ca^{2+}-megvonás hatására bekövetkező koncentrációváltozását nem tudtuk vizsgálni, ugyanis egy, feltehetőleg az EGTA szennyezésből eredő csúcs együtt vándorolt az aszpartát csúccsal.

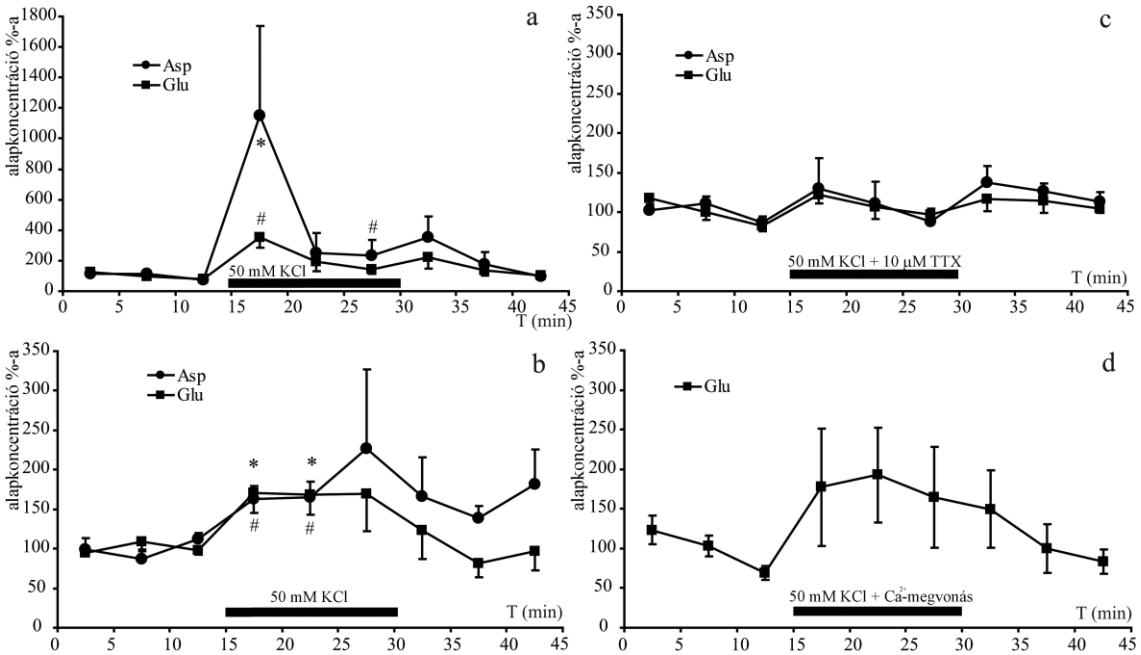


11. ábra a, Stressz hatása a kísérleti állatok mediális striátumában mérhető extracelluláris aszpartát ill. glutamát koncentrációra; b, stressz és TTX egyidejű hatása; c, stressz és Ca^{2+} mentes ACSF egyidejű hatása

4.2.2 Az aszpartát és a glutamát koncentráció változása a mikrodializátumban KCl hatására

KCl oldat a mikrodialízis szondán keresztül történő perfúziójával az extracelluláris kálium koncentráció megnövelhető, mely következményesen kiváltja a környező idegsejtekben raktározódó transzmitterek szinaptikus ürülését. Vizsgálataink során 50 mM KCl oldat perfúziójával történő stimuláció és az azt megelőző stressz hatására a glutamát koncentrációban négyszeres (Friedman teszt: χ^2=14,9 df: 6, p<0,05), míg az aszpartát koncentrációban tízszeres (χ^2=16,4 df: 6 p<0,05) emelkedést tapasztaltunk (12/a ábra). A kezdeti növekedést azonban mindkét aminosav koncentrációjának KCl stimulációtól független gyors csökkenése követi. A stimulációt követően az excitátoros

aminosavak szintje a nyugalmi értékekhez képest magasabb, bár nem szignifikánsan eltérő értéket mutatott, állatonként jelentős szórással. A KCl stimuláció abban az esetben is jelentős koncentrációemelkedést okozott, amikor azt nem előzte meg stresszhatás (Friedmann teszt: χ^2>8,2 df: 3 p<0,05; 12/b ábra). Az egyidejű TTX kezelés a KCl transzmitterfelszabadító hatását megszűntette, így sem az aszpartát (Friedmann teszt: χ^2>2,49 df: 3 p=0,48), sem pedig a glutamát (χ^2=6,6 df: 3 p=0,086;) esetében nem tapasztaltunk szignifikáns koncentrációváltozást (12/c ábra). A glutamát koncentráció látszólag emelkedett, amikor a KCl stimulációt Ca^{2+} mentes, EGTA-t tartalmazó ACSF jelenlétében végeztük, ez a változás azonban nem volt szignifikáns (Friedmann teszt: χ^2>3,00 df: 3 p=0,39; 12/d ábra). Az aszpartát aránya erősen korrelált a stimuláció alatti, illetve az azt megelőzően mért glutamát felszabadulással (R=0,286 p<0.001, n=137). Ez azt jelenti, hogy abban az esetben, amikor kevés glutamát ürült (az alapkoncentráció ~100%-a) az aszpartát aránya a teljes ürülő excitátoros aminosav mennyiséghez képest 10 és 60%-között változott. Jelentős glutamát felszabadulás esetén (> 300%) azonban az aszpartát aránya stabilan 50 %-körüli értékre áll be. Nem figyeltünk meg olyan esetet, ahol jelentős glutamát ürülés esetén relatív kevés (< 50%) aszpartát ürült volna.



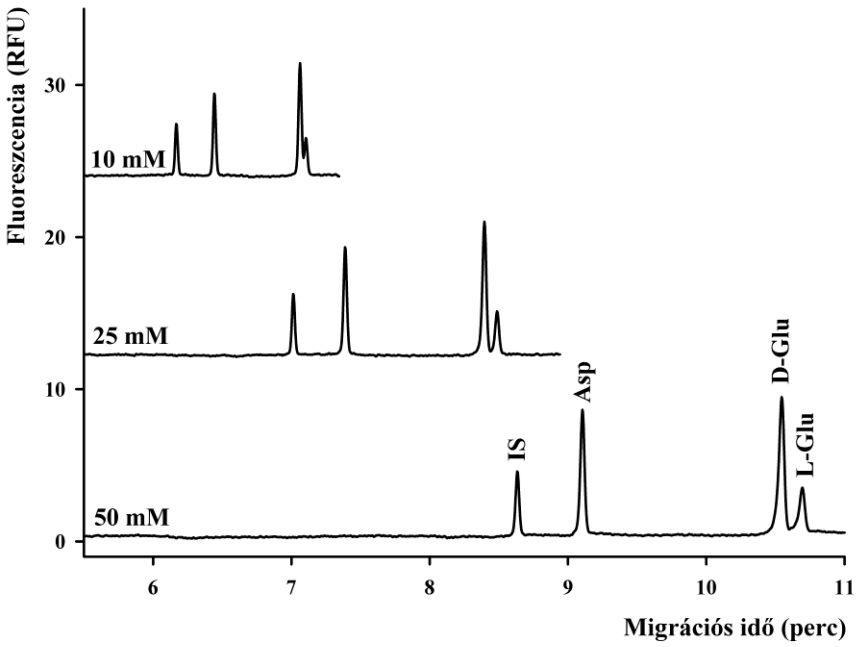
12. ábra a, KCl és az azt megelőző stressz hatása a kísérleti állatok mediális striátumában mérhető extracelluláris aszpartát ill. glutamát koncentrációra; b, KCl hatása megelőző stressz hiányában; c, KCl és TTX együttes hatása; d, KCl és Ca^{2+} mentes ACSF hatása

4.3 Aszpartát és glutamát királis elválasztása

Az excitátoros aminosavak királis elválasztása során hasonló elválasztási körülményeket alkalmaztunk, mint az akirális elválasztásoknál. Borított falú kapillárisban, bázikus pH-n vizsgáltuk az egyes paraméterek elválasztásra gyakorolt hatását. Fluorogén tulajdonsága miatt származékképzőnek a korábban már alkalmazott NBD-F-et választottuk. A származékképzés körülményein nem változtattunk. Belső standardként L-ciszteinsavat használtunk, melynek koncentrációja minden egyes mérésnél rögzített, 1 μM volt.

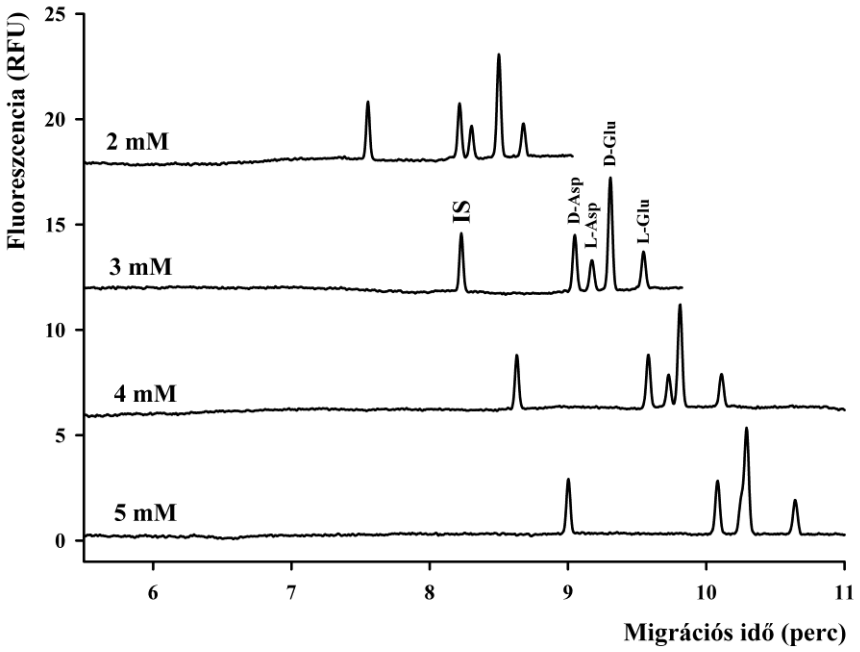
4.3.1 Aszpartát és glutamát egyidejű elválasztása királis szelektorok jelenlétében

A királis szelektorok hatását 100 mM pH 8,0 borát pufferben vizsgáltuk. Figyelembe véve, hogy az enantiomerek megfelelő elválasztásához feltehetően hosszabb effektív kapillárishossz szükséges, az elválasztásokat 50 cm effektív kapillárishosszon végeztük. A vizsgált neutrális ciklodextrinekkel csak részleges elválasztást értünk el. Glutamát esetében β-CD, HP-β-CD és DM-β-CD, valamint RM-β-CD jelenlétében tapasztaltunk királis elválasztást, azonban ezek a szelektorok az aszpartát enantiomerek elválasztására alkalmatlanok voltak. DM-β-CD esetében jelentősen erősebb kölcsönhatást tapasztaltunk a glutamát enantiomerekkel mint az aszpartát enantiomerekkel, amit migrációs idejük jelentősebb növekedése jelzett. A DM-β-CD koncentrációjának emelésével az aszpartát, illetve a glutamát enantiomerek migrációs ideje közti különbség fokozatosan nőtt (13. ábra). RM-β-CD esetében az enantiomer párok migrációja közti különbség kisebb mértékben nőtt a szelektor koncentrációjával. Aszpartát esetében γ-CD segítségével sikerült részleges elválasztást elérni, ami viszont nem mutatott enantioszelektivitást a glutamát felé.



13. ábra DM-β-CD hatása az excitátoros aminosav enantiomerek elválasztására.
1 µM L-Asp/L-Glu ill. 2 µM D-Asp/D-Glu tartalmú minta
Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20s; 100 mM borát puffer pH 8,0; változó DM-β-CD koncentráció; 400 V/cm, 25 º C

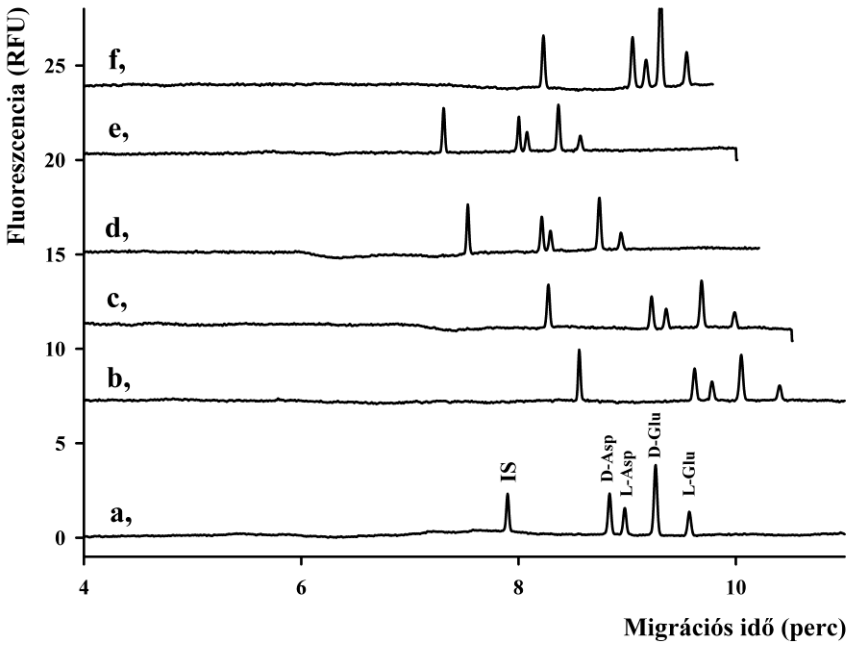
Az amin-módosított ciklodextrin származék, a HPA-β-CD alkalmazásával sikeresen értünk el alapvonali elválasztást mindkét enantiomer párra. Az enantioszelektivitás erősen függött az elválasztó puffer pH-jától valamint a szelektor koncentrációjától. pH 7,0, illetve pH 7,5 esetén az enantioszelektivitás megszűnt, míg pH 8,5 vagy magasabb pH értékeknél erőteljes csúcsszélesedést és a csúcsok együttvándorlását tapasztaltuk. Az elválasztás szempontjából a pH 8,0 értéket találtuk megfelelőnek. A szelektor koncentráció hatását 2-5 mM koncentrációtartományban vizsgáltuk. Három mM szelektor koncentráció esetén alapvonali elválasztást értünk el, a további koncentrációnövelés azonban az L-aszpartát és D-glutamát csúcsok együttes vándorlását idézte elő (14. ábra).



14. ábra pH ill. HPA-β-CD koncentráció hatása az excitátoros aminosav enantiomerek elválasztására.
1 µM L-Asp/L-Glu ill. 2 µM D-Asp/D-Glu tartalmú minta
Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20s; 100 mM borát puffer pH 8,0; változó HPA-β-CD koncentráció; 400 V/cm, 25 º C

4.3.2 Aszpartát és glutamát egyidejű elválasztása kettős ciklodextrin rendszerben

Az elválasztás hatékonyságának további növelése érdekében HPA-β-CD-t és DM-β-CD-t tartalmazó kettős ciklodextrin rendszereket vizsgáltunk. Míg a HPA-β-CD alkalmasnak bizonyult a megfelelő enantioszelektivitás eléréséhez, a korábbi tapasztalatok alapján a DM-β-CD-t választottuk a kémiai szelektivitás növelésére. A várt hatásnak megfelelően a DM-β-CD ugyan javította az L-aszpartát és a D-glutamát csúcsok elválasztását, de rontotta az aszpartát enantiomerek királis megkülönböztetését. A HPA-β-CD koncentrációjának növelésével az aszpartát csúcsok felbontása javult, mindkét szelektor magas koncentrációja azonban jelentősen megnövelte az analízisidőt (15. ábra). Kompromisszumként mindkét szelektor esetén egy köztes koncentrációértéket választottunk: 5 mM HPA-β-CD, valamint 8 mM DM-β-CD keveréke megfelelő felbontás mellett biztosította a vizsgálni kívánt vegyületek hatékony elválasztását, míg az analízisidő kevesebb volt, mint 10 perc.



15. ábra Excitátoros aminosav enantiomerek elválasztása kettős ciklodextrin rendszerben.
1 µM L-Asp/L-Glu ill. 2 µM D-Asp/D-Glu tartalmú minta
a, 5+8; b, 6+10; c, 5+10; d, 3+10; e, 3+5 mM HPA-β-CD ill. DM-β-CD; 3 mM HPA-β-CD
Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20s; 100 mM borát puffer pH 8,0; 400 V/cm, 25 ° C

4.3.3 Módszer validálás

Az elválasztás paramétereinek optimalizálása után elvégeztük a módszer validálását is. Előzetes vizsgálataink, valamint szakirodalmi adatok alapján a vizsgálni kívánt szövetmintákban az L-, illetve D-aszpartát arányát hozzávetőleg ötvenszeresnek találtuk. Ennek megfelelően a teljes validációs folyamat alatt mindkét aminosav esetén ötvenszeres koncentrációkülönbséget alkalmaztunk az L-enantiomer javára. Mind a négy vizsgált vegyületre hatpontos kalibrációs görbét készítettünk a D-enantiomerek esetében 0,05 µM és 1 µM, az L-enantiomerek esetében pedig 2,5 µM és 50 µM koncentrációtartományban. A regressziós paramétereket az alábbi táblázatban foglaltam össze (VII. táblázat). A módszert a vizsgált koncentrációtartományban mind a négy aminosavra lineárisnak találtuk.

VII. táblázat Excitátoros aminosavak regressziós paraméterei.

	Egyenletek	Korrelációs koefficiens
D-Asp	**y = 2,4048x + 0,0060**	**0,9999**
L-Asp	**y = 1,8367x + 0,4402**	**0,9993**
D-Glu	**y = 1,3144x - 0,0015**	**0,9994**
L-Glu	**y = 1,8567x + 0,2692**	**0,9999**

A detektálási határt D-aszpartát esetében 17 nM-nak D-glutamát esetében pedig 9 nM-nak találtuk. A módszer pontossága és torzítatlansága D-aszpartát, valamint D-glutamát esetén megfelelő volt 0,05 µM, 0,5 µM és 1 µM koncentrációértékek esetén. Az egyidejűleg 2,5 µM, 25 µM és 50 µM koncentrációban vizsgált L-enantiomer párok esetén is megfelelő pontosság, valamint torzítatlanság értékeket kaptunk. A módszer kvantitatív mérési határát a D-aminosavakra 0,05 µM-nak találtuk (VII. és VIII. táblázat).

VIII. táblázat A módszer napon belüli megbízhatóság értékei (n = 6).

	0,05 µM[c] / 2,5 µM[d]		0,5 µM[c] / 25 µM[d]		1 µM[c] / 50 µM[d]	
	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)
D-Asp	**104**	**17,2**	**106**	**2,4**	**107**	**11,5**
L-Asp	**94**	**13,9**	**106**	**9,8**	**112**	**12,7**
D-Glu	**89**	**15,3**	**107**	**10,3**	**107**	**4,0**
L-Glu	**107**	**4,3**	**106**	**7,0**	**114**	**8,7**

[a] Torz.: torzítatlanság
[b] Pont.: pontosság
[c] D-Asp és D-Glu
[d] L-Asp és L-Glu

IX. táblázat A módszer napok közötti megbízhatóság értékei (öt egymást követő napon 3-3 párhuzamos).

	0,05 µM[c] / 2,5 µM[d]		0,5 µM[c] / 25 µM[d]		1 µM[c] / 50 µM[d]	
	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)	Torz.[a] (%)	Pont.[b] (RSD%)
D-Asp	**97**	**14,7**	**101**	**8,3**	**103**	**7,4**
L-Asp	**90**	**5,8**	**103**	**4,9**	**103**	**7,4**
D-Glu	**94**	**14,3**	**103**	**7,4**	**96**	**7,1**
L-Glu	**97**	**3,7**	**103**	**7,4**	**99**	**7,9**

[a] Torz.: torzítatlanság
[b] Pont.: pontosság
[c] D-Asp és D-Glu
[d] L-Asp és L-Glu

A validálási folyamat során vizsgáltuk a mintastabilitást is. Az elkészített minták -20 °C-on történő tárolás esetén legalább 2 napig, 4 °C-on történő tárolás esetén legalább 24 óráig, míg a készülék mintatartójában történő állás során 1 óráig voltak stabilak (X. táblázat).

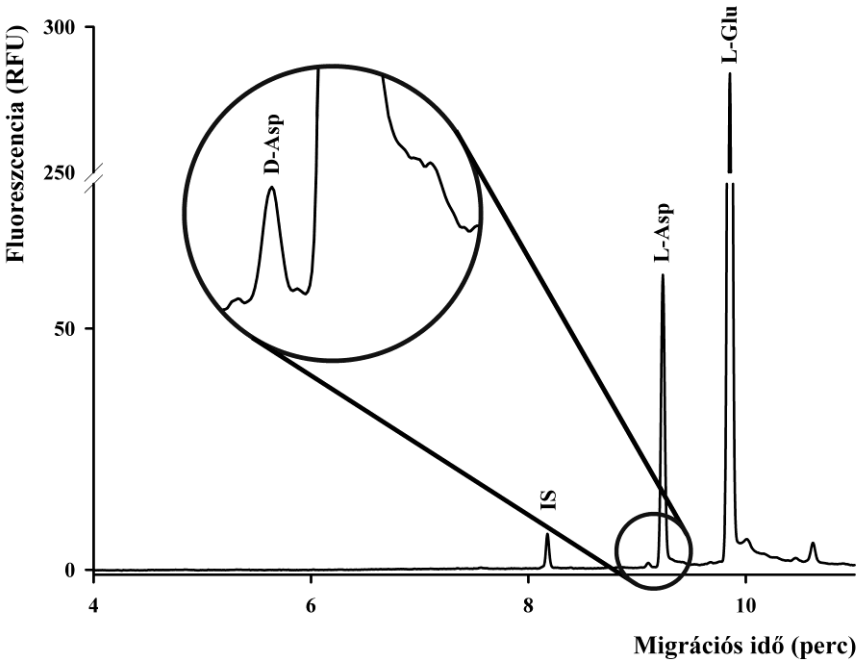
X. táblázat Az elkészített minták stabilitása -20°C-on , 4°C-on ill. a készülék mintatartójában történő 1 ill. 2 órás tárolást követően (3-3 párhuzamos).

	D-Asp[a]	L-Asp[b]	D-Glu[a]	L-Glu[b]
1 h*	**99 %**	**96 %**	**100 %**	**93 %**
2 h*	**84 %**	**89 %**	**81 %**	**80 %**
24 h**	**90 %**	**95 %**	**88 %**	**89 %**
48 h***	**98 %**	**97 %**	**99 %**	**92 %**

[a)] 0,1 μM
[b)] 5 μM
*) Készülék mintatartójában történő tárolás esetén
**) 4 °C-on történő tárolás esetén
***) -20 °C-on történő tárolás esetén

4.3.4 Biológiai minták vizsgálata

A módszerfejlesztést és a validálást követően a módszer alkalmazhatóságát naposcsirkékből származó agyszövet minták vizsgálatával bizonyítottuk. A mérések során három agyterületet vizsgáltunk: a szubventrikuláris zónát (SVZ), a nidopalliumot és a cerebellumot. A mintaelőkészítés optimalizálása során 100-szoros hígítást találtunk megfelelőnek. Ennél alacsonyabb hígításnál a minta magas vezetőképessége miatt a csúcsalakok torzultak, míg nagyobb hígításnál a D-aszpartát már nem volt detektálható. A minták D-aszpartát koncentrációja 0,15 – 0,45 μM között változott (15-45 nmol/mg szövet), mely a teljes aszpartát mennyiség 1-2%-át tette ki. A mintákban D-glutamátot nem tudtunk kimutatni. A mintákhoz adott D-aszpartát tartalmú törzsoldattal azonosítottuk a csúcsokat.



16. ábra Csirke agyszövetéből készült mintában történő excitátoros aminosavszármazékok elválasztása.
Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20s; 100 mM borát puffer pH 8,0 + 8 mM DM-β-CD + 5 mM HPA-β-CD; 400 V/cm, 25 º C

5 Megbeszélés

5.1 Aszpartát és glutamát egyidejű akirális elválasztása

5.1.1 Származékképzés

A megfelelő származékképző kiválasztása az analízis szempontjából kulcsfontosságú. A származékképző befolyásolja a módszer érzékenységét, pontosságát, valamint meghatározza az elválasztás körülményeit. Az amin-reaktív származékképzőkkel történő reakció feltétele a deprotonált amino-csoport jelenléte. A deprotonáltság mértéke enyhén bázikus közegben alacsony, a túlzottan magas pH viszont gyorsíthatja a származékképző vegyület hidrolízisét, így ezeken a pH értékeken a reakció hatékonysága nem megfelelő. Mindhárom esetben köztes pH értékeket találtunk optimálisnak (pH 8,5-9,0) a származékképzéshez, ami alátámasztja ezt a megfontolást, és nem tér el jelentősen az irodalomban korábban közölt értékektől [136-138,129].

5.1.2 Elválasztás

Aminosavak kapilláris elektroforézissel történő elválasztása jellemzően bázikus közegben (pH= 8,5-10) történik [139,140]. Ilyen körülmények között az elválasztás során erős katód irányú EOF lép fel, mely meghatározza a vegyületek vándorlási irányát. A tényleges vándorlási sebesség az EOF és az aminosavak nettó negatív töltése következtében fellépő ellenirányú vándorlás eredőjeként alakul ki. Mind az aszpartát, mind a glutamát két deprotonált karboxil-csoportja révén relatív magas töltés-tömeg aránnyal rendelkezik, ezért igen jelentős az EOF-el ellentétes irányú elektroforetikus mozgékonyságuk, mely általában hosszú analízisidőt (15-20 perc) eredményez [136,141,142]. Problémát jelenthet továbbá a kis szelektivitás és az egyéb amin-, illetve aminosav származékokkal, valamint a származékképző hidrolízistermékeivel és a reagensfelesleggel történő együttes vándorlás, ami rendszerint csak több, jellemzően micellaképző segédanyagok alkalmazásával küszöbölhető ki [136,142]. Munkánk során nagyszámú mikrodializátum aszpartát, valamint glutamát tartalmát kívántuk meghatározni. Mivel a minták további amino-csoportot tartalmazó komponensei nem képezték vizsgálatunk tárgyát, célszerű volt az EOF elnyomásával a migrációs sorrend megfordítása, aminek eredményeként a többszörös negatív töltéssel rendelkező

mintakomponensek vándorolnak a leggyorsabban az anód irányába. Így az aszpartát és glutamát meghatározásának analízisideje jelentősen lerövidíthető volt. Az EOF visszaszorítására a kapillárisfal poliakrilamiddal történő borítását alkalmaztuk. Ilyen körülmények között az excitátoros aminosavak eredő elektroforetikus mozgékonysága a többi mintakomponensnél jelentősen nagyobb. Kutatócsoportunk elsőként alkalmazott borított falú kapillárist agyi mikrodializátum minták glutamát és aszpartát tartalmának kvantitatív vizsgálatára. Előnyös tulajdonságai révén a borát puffer alkalmazása igen elterjedt lúgos közegben történő elválasztások során. A megfelelő pufferkapacitás biztosítása mellett kedvező, hogy a lassan vándorló borát ionok alacsony áramot generálnak, ami a csúcsalak és a reprodukálhatóság szempontjából jelent előnyt. Egy adott koncentrációtartományon belül érvényes szabály, hogy a puffer koncentrációjának, az ionerősségnek a növelésével javul a csúcsok felbontása. Az elválasztások optimalizálása során ezt szem előtt tartva 100 mM koncentrációjú borát puffert alkalmaztunk.

5.1.3 Módszer validálás

A szakirodalomban számos közleményt találunk aminosavak kapilláris elektroforézissel történő meghatározására [143-146,140]. Míg a detektálási határ megállapítása minden esetben a jel-zaj arány alapján történik (jel/zaj = 3:1), a kvantitatív meghatározás határának megállapítására több, egymástól eltérő módszert alkalmaznak, leggyakrabban a detektálási határhoz hasonlóan a jel-zaj arány alapján (jel/zaj = 10:1) állapítják meg [138,147]. Sok szerző azonban a kalibráció lineáris tartományának alsó értékét fogadja el a kvantitatív mérés határának [136,137,142]. Ha azonban két vagy akár három nagyságrendet is átfogó kalibrációs tartomány alapján történik a becslés, még a 0,995-ös értéket meghaladó R^2 esetben is félrevezető lehet ezen módszer alkalmazása. Ennek oka, hogy a regressziós koefficiens a mért adatoknak az illesztett egyenestől való abszolút eltérését tükrözi, így az alacsony koncentrációtartományban előforduló jelentős relatív eltérés is csak minimális hatással van a regressziós koefficiens értékére. A legkisebb négyzetek módszere segítségével illesztett regressziós egyenesek esetén a legalacsonyabb koncentráció értéknél kapott eltérés relatív értéke akár a 70%-ot is elérheti, még abban az esetben is, amikor az R^2 meghaladta a 0,999-es értéket [148]. A lineáris regresszió ezen tulajdonsága miatt a kalibráció linearitása önmagában nem

garantálja a megfelelő kvantitatív mérést az alacsony koncentrációtartományban. A több nagyságrendet átfogó kalibrációk esetében a torzítás csökkenthető, ha a regresszió a hagyományos legkisebb négyzetek módszere helyett az ún. súlyozott legkisebb négyzetek módszerével történik [149]. Egyes szerzők relatív magas (1-10 μM) koncentrációkon végzik el a származékképzést, majd a minták 100-1000-szeres hígítását követően állapítják meg az LOD és az LOQ paramétereket [150]. A előzőekhez hasonlóan ez a módszer sem veszi figyelembe a hidrolízis kis koncentrációkon fellépő torzító hatását. A valóságot pontosan tükröző paraméterek csak egy teljes körű, mindenre kiterjedő validációs folyamat során nyerhetők.

Megfelelően kivitelezett módszervalidálás során három, a mérési tartományt átfogó ismert koncentrációjú standard minták napon belüli, valamint napok közötti mérési adataiból kell megállapítani a pontosság és a torzítatlanság értékeket. Az FDA irányelvei [134] szerint az a legalacsonyabb koncentrációérték fogadható el kvantitatív mérési határnak, ahol a torzítatlanság értéke 80% és 120% közé esik, a pontosság pedig nem haladja meg a 20%-ot. Az ily módon megállapított érték azonban egy vagy akár két nagyságrenddel is nagyobb lehet a detektálási határnál [108]. Ez a jelenség az alacsony koncentrációk esetében már nem megbízható származékképzési reakcióval magyarázható [151,123]. Lau és munkatársai vizsgálatai alapján a tized mikromólosnál kisebb mintakoncentrációk esetében a származékképzési reakció nagymértékben visszaszorul, és a származékképző hidrolízise válik meghatározóvá [123]. Így, bár maguk a származékok rendkívül alacsony koncentrációban detektálhatók, ebben a tartományban a pontos meghatározás már nem lehetséges, amelyből adódik a detektálási és a kvantitálási határ több nagyságrendbeli eltérése.

Számos kutatócsoport ért el tized nanomólos detektálási határt aminosavak fluoreszcens származékképzését követő elválasztása során, ugyanakkor ezeket a módszereket nem, vagy csak részben validálták és kevés esetben alkalmazták biológiai minták kvantitatív vizsgálatára. A biológiai minták analízisére optimalizált módszerek esetében is hiányzik, vagy részleges a módszervalidálás [136-138,125,124]. A megfelelő validációs adatok hiányában azonban ezeknek a módszereknek a pontossága a mikromól alatti mintakoncentrációk esetében megkérdőjelezhető.

5.1.4 NBD-F származékok elválasztása

Kiindulva kutatócsoportunk korábbi sikeres eredményeiből, elsőként a fluorogén tulajdonságú NBD-F származékképző alkalmazhatóságát vizsgáltuk. A fluorogén származékképzők előnye a fluorofór vegyületekkel szemben, hogy az elválasztás során kevesebb zavaró csúccsal kell számolni, melyek jellemzően a reagens hidrolízise során képződnek [120]. Az utóbbi évtizedekben az NBD-F-ot számos kutatócsoport alkalmazta amin funkciós-csoportot tartalmazó vegyületek elválasztása során [152-154,135], ugyanakkor aminosavak biológiai mintából történő meghatározásával csak néhány tanulmány foglalkozik [155,156,113]. Hu és munkatársai NBD-F-el történő származékképzést követően sikeresen választottak el 15 aminosavat. A megfelelő felbontás eléréséhez azonban kétféle detergensből és szerves módosítóból álló komplex puffert használtak, a teljes analízisidő 22 perc volt. Zhu és munkatársai hasonló körülmények között 19 aminosavat választottak el sikeresen, melyhez azonban a nagyobb szerves módosító, illetve detergens koncentrációk mellett β-CD-re is szükség volt. Nagyobb feszültség alkalmazása mellett 17 percre rövidült az analízisidő. Kapillárison történő származékképzéssel Klinker és munkatársai egy percen belül választottak el mikrodializátumban lévő aminokat és aminosavakat. A rendkívül gyors módszer hátránya azonban, hogy csak a mintában lévő glutamát mennyiségét képes meghatározni, a korábbi módszerekhez képesti lényegesen magasabb detektálási határral. Az általunk származékképzésre ideálisnak talált 15 perc reakcióidő eltér a korábban publikáltaktól (1 perc [155], 3 perc [156], 5 perc [157]). A reakcióközeg pH-jának vizsgálata során a legnagyobb csúcsterületeket 8,5 pH-jú puffer alkalmazásával kaptuk hasonlóan a korábban közöltekhez [157].

Az NBD-F származékok elválasztása során nem tapasztaltunk jelentős pH függést, mely azzal magyarázható, hogy a származékképző molekulával történő reakció során nem nő a deprotonálható csoportok száma, így a pufferközeg pH-ja csak kismértékben befolyásolja az elválasztás minőségét. A feltehetőleg a reagensfelesleg hidrolíziséből származó komponensek zavaró hatását így segédanyagok alkalmazásával kíséreltük meg megszűntetni. A királis elválasztások során gyakran alkalmazott ciklodextrinek számos vendégmolekulával képesek stabil zárványkomplexet alkotni. Vizsgálataink során 8 mM β-CD jelenlétében a hidrolízistermékek migrációja nagyobb mértékben lassult, mint az aminosavaké (3. ábra), így az elválasztást zavaró közeli vándorlásuk

megszűntethetővé vált. A tapasztalt jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a hidrolízistermékek lipofilebb karakterük révén jobban illeszkednek a ciklodextrin molekula hidrofób üregébe, melynek következtében stabilabb komplexet képeznek. A stabil komplexképzés a vegyületek gyors vándorlása ellen hat, mivel a kialakult komplex mobilitása töredéke a szabad molekuláénak.

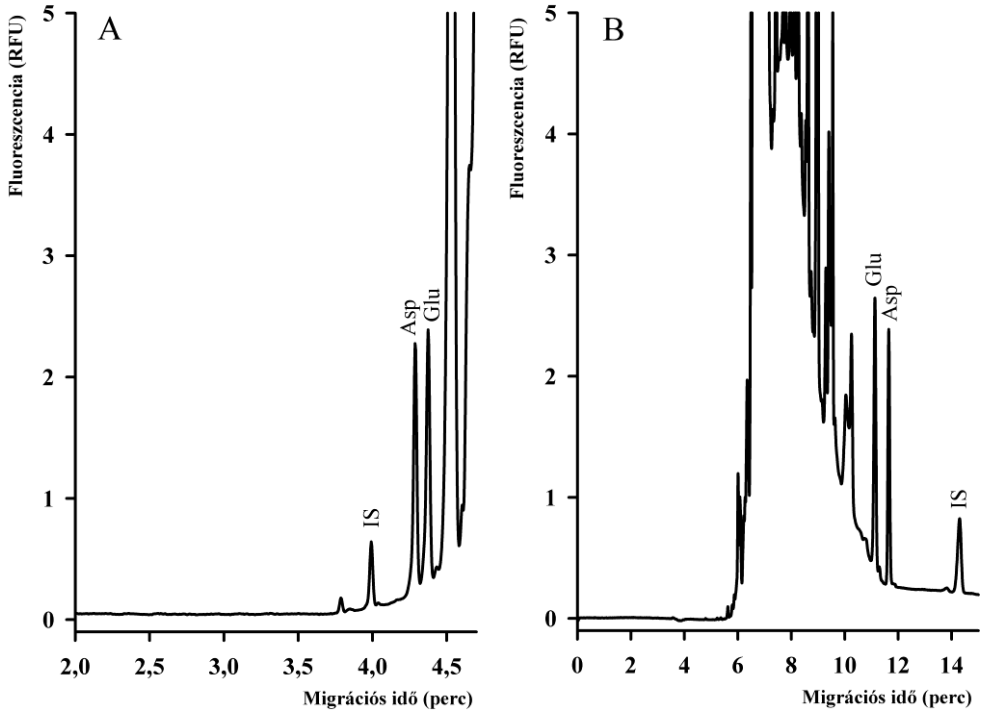
Az NBD-F származékok elválasztása során törekedtünk az analízisidő rövidítésére. A migrációs időt meghatározó két leglényegesebb tényező az effektív kapillárishossz, valamint az alkalmazott feszültség. Ez utóbbi paraméter növelésének gátat szab, hogy a feszültség által generált áramerősség, is növekszik, s a keletkező Joule-hő a csúcsok kiszélesedéséhez, az elválasztás hatékonyságának romlásához vezet. A maximális, még megfelelő elválasztást nyújtó feszültségértéket -300 V/cm-nek találtuk, ami 40 μA áramot generált. Az effektív kapillárishossz vizsgálata során már 10 cm effektív kapillárishossz esetében megfelelőnek találtuk az elválasztást. Korábban publikált elválasztások során jellemzően 40 cm effektív kapillárishosszt alkalmaztak, ami jelentősen hosszabb analízisidőt eredményezett. Esetünkben csak a két savas karakterű aminosav megfelelő elválasztása volt a cél, amihez lényegesen rövidebb kapillárishossz is elegendő. Az így elért 3,5 perces analízisidő a korábban publikált módszerekhez képest lényegesen rövidebb [155,156,113,157]. Figyelembe véve a nagyszámú vizsgálandó mikrodializátumot ez igen kedvező volt, azonban a mintastabilitást nem találtuk megfelelőnek.

Bár a detektálási határ mindkét aminosav esetben 10 nM alatti értéknek adódott, a kalibráció során a tized mikromól alatti tartomány esetében a csúcsterületek gyors csökkenése volt megfigyelhető, ami a kalibrációs pontokra illesztett egyenestől való növekvő eltérésben nyilvánult meg. A tapasztalt jelenség egyik lehetséges magyarázata a származékképzési reakció kvantitatív jellegének megszűnése alacsony koncentrációk esetében. Ez lehet a származékképzőre jellemző reakciómechanizmus sajátsága, bár erre vonatkozó szakirodalmi adatot nem találtunk. A jelenséget ugyanakkor okozhatja a párhuzamosan végbemenő származékképző-hidrolízis dominánsá válása. Míg magasabb koncentrációkon a hidrolízis sebessége összevethető a származékképzési reakció sebességével, alacsony aminosav koncentrációk esetében a származékképzési reakció sebessége lényegesen lecsökken [123].

A kvantitálási határ csökkentése, valamint a módszer érzékenységének növelése érdekében a továbbiakban olyan származékképzőket vizsgáltunk, amelyek esetében hatékonyabb származékképzési reakciót, lassabb hidrolízist, továbbá nagyobb érzékenységet és mintastabilitást vártunk.

5.1.5 FITC származékok elválasztása

A fluoreszcein típusú vegyületek származékai stabilak és erőteljes fluoreszcenciával rendelkeznek [115], ugyanakkor hátrányuk a hosszú reakcióidő (~16 óra) és a reagensből, illetve a hidrolízistermékekből származó csúcsok, melyek megnehezítik az elválasztást. A fluoreszcein típusú vegyületek közül a FITC a leggyakrabban alkalmazott származékképző aminosavak kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata során [110,115]. Bár számos kutató beszámolt magas hőmérsékleten rövid ideig történő származékképzésről [125,126], a kis térfogatú minták párolgásának elkerülésére a szobahőmérsékleten történő származékképzést részesítettük előnyben. A Nouadje és munkatársai által kidolgozott protokollt számos más kutatócsoport is sikerrel alkalmazta [142,55], így munkánk során minimális módosításokkal mi is ezt követtük. A FITC-el történő származékképzést követő elválasztás tipikusan csak több segédanyagot tartalmazó, bonyolult összetételű pufferrendszer alkalmazásával kivitelezhető. Esetünkben a borított falú kapillárisban történő elválasztás során az aszpartát és a glutamát nagy elektroforetikus mobilitásuk révén az interferáló csúcsok előtt vándorolnak. Azonos elválasztási körülmények között, ha nem borított falú kapillárisban történő elválasztást választottuk volna, közel háromszor hosszabb lenne az analízisidő a borított falú kapillárishoz képest (17. ábra)



17. ábra Kapilláris borítás hatása a FITC származékok analízisidejére.
A, borított falú kapilláris; B hagyományos kapilláris; 1 µM Asp, Glu ill. 0,5 µM IS tartalmú minta; Elválasztási körülmények: 20/30 cm x 75 µm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3447 Pa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5, 20 mM SDS; 300 V/cm, 25 ºC

Míg a puffer pH-jának változtatása nem gyakorolt jelentős hatást az elválasztás szelektivitására, a csúcsalakok 20 mM SDS jelenlétében egyértelműen javultak. Az analízisidő 5 percnek adódott, mely az aszpartát és a glutamát mikrodializátumokból történő egyidejű meghatározására optimalizált korábbi módszerekhez képest gyorsabb. A módszervalidálás során kapott kalibrációs pontokra illesztett egyenes alapján mindkét aminosav esetén lineáris összefüggést állapítottunk meg a 0,03-1 µM koncentrációtartományban (R^2_{Asp}= 0,9988, R^2_{Glu}= 0,9986). A legalacsonyabb, még megfelelő pontossággal és torzítatlansággal mérhető koncentráció ugyanakkor az NBD-F származékok során kapotthoz hasonlóan 0,1 µM volt. Számos, biológiai minták analízisére optimalizált módszer esetében publikáltak nanomólos, illetve tized nanomólos tartományba eső detektálási határokat. Ezen tanulmányok közül ugyanakkor a kvantitálási határt csak Li és munkatársai állapították meg módszervalidálással [125]. Az általuk kidolgozott módszerrel 0,1 µM aszpartátot, illetve glutamátot megfelelő pontossággal tudtak mérni, mely egybevág az általunk talált értékekkel. A hasonló tanulmányok [137,158] szerzői jellemzően csak lineáris tartományt adtak meg.

5.1.6 CFSE származékok elválasztása

Az érzékenység további növelésének érdekében egy harmadik, kevésbé elterjedt fluorofór származékképzőt, a CFSE-t is megvizsgáltuk. Lau és munkatársai 1998-ban megjelent közleményükben a FITC és a CFSE származékképző tulajdonságait hasonlították össze. Eredményeik alapján nagyságrendekkel hatékonyabb származékképzés érhető el CFSE-vel, mint FITC-cel, bár eredményüket módszervalidálásból származó adatokkal nem támasztották alá. Mindemellett a CFSE-vel történő származékképzés során kevesebb zavaró hidrolízistermék keletkezett, ami az elválasztás optimalizálása szempontjából kedvező volt [123]. Az elmúlt másfél évtizedben azonban csak néhány olyan tanulmányt közöltek, melyben amino-vegyületeket vizsgálnak CFSE-vel történő származékképzést követően kapilláris elektroforézissel. A vizsgált vegyületek jellemzően gyógyszervegyületek voltak (baclofen [159], gabapentin [160], illetve aminoglikozid antibiotikumok [161]). Egyetlen 2009-ben megjelent tanulmány foglalkozik patkány PAG-mikrodializátumából történő aszpartát és glutamát mennyiség meghatározásával [162]. Chen és munkatársai sikeresen választottak el a mikrodializátum mintákban lévő excitátoros aminosavakat pH 8,5 borát puffer segítségével. Detektálási határnak tized nanomólos értéket kaptak mindkét aminosav esetén, míg kvantitálási határnak a kalibrációs tartomány legkisebb koncentrációjú pontját adták meg, ami 20 nM aszpartátra és 40 nM glutamátra.

Az Asp és Glu CFSE-vel képzett származékainak elválasztása során jelentős pH függést tapasztaltunk. Megfigyelhető a pH növekedésével párhuzamosan csökkenő migrációs idő, ami a származékok deprotonáltsági fokának növekedésével magyarázható. Magas pH-n (9,0-8,5) a glutamát nem választható el megfelelően a reagenscsúcstól, míg semlegeshez közeli pH-n (7,0-7,5) a minor hidrolízistermékekkel történő interferencia válik jelentőssé. Köztes, pH 8,0 érték esetében megfelelő elválasztást kaptunk, ugyanakkor még ilyen körülmények között sem tudtunk minden interferenciát kiküszöbölni. Az együttes vándorlást segédanyagokkal nem tudtuk megszüntetni. Vizsgáltuk a származékképzés reakcióidejének hatását a hidrolízis termékek képződésére, s azt tapasztaltuk, hogy a hidrolízistermék eredetű csúcsok a származékképzés idejével arányosan nőnek. Míg az aminosav-származékok csúcsai már 4 órás reakcióidő után elérték a maximumot, az interferenciát okozó zavaró csúcsok a

reakcióidővel lineárisan nőttek tovább. A származékképzés idejének lerövidítésével és a megfelelő puffer pH megválasztásával tudtuk minimalizálni a zavaró hatást.

A módszervalidálás során még alacsonyabb detektálási határokat kaptunk, mint a két megelőző származékképző esetében, ugyanakkor a korábbiakhoz hasonlóan a kvantitálási határ itt sem volt 0,1 μM-nál kisebb egyik aminosav esetében sem. Bár a korábbi közlemények alapján javulást reméltünk, a kvantitatív mérés alsó határában, ennek elmaradása részben a zavaró csúcsok jelenlétével magyarázható. A korábban közölt módszer 15 perces analízisidejéhez képest ugyanakkor az általunk kidolgozott módszerrel 4 perces analízisidő érhető el.

Mindhárom módszer esetében azonos kvantitálási határt állapítottunk meg, mellyel bizonyítottuk, hogy a detektálás érzékenysége nem befolyásolja a mérés pontosságát, s az LOD és LOQ értékek között egy-két nagyságrend különbség is lehet. Vagyis hiába érhető el adott származékképzővel nanomoláris detektálási határ, megfelelő pontossággal és torzítatlansággal történő mérés csak ennél mintegy százszor nagyobb koncentrációértéknél lehetséges. Ennek legvalószínűbb oka az alacsony koncentrációkon már nem kvantitatív származékképzési reakció, ami a hidrolízis felerősödő kompetitív hatásának következménye.

Ennek megfelelően a szakirodalomban sem találtunk egyik általunk vizsgált származékképző esetében sem olyan megfelelően validált módszert, mellyel az általunk megállapított kvantitálási határnál alacsonyabb értéket lehetett volna elérni. A kapott eredmények alapján, figyelembe véve a vizsgálandó minták magas számát és a származékok stabilitásában tapasztalt különbséget, a biológiai minták analíziséhez FITC-et, a legnagyobb stabilitású származékot adó reagenst választottuk. A biológiai minták elválasztása során nem észleltünk együtt vándorló zavaró csúcsokat, a kidolgozott módszer alkalmasnak bizonyult agyi mikrodializátumok vizsgálatára.

5.2 Aszpartát és glutamát extracelluláris koncentrációváltozásának *in vivo* vizsgálata

A madarak mediális striátuma (MSt) központi szerepet játszik az egyes tanulási folyamatokban (passzív elkerülési teszt), valamint a memória kialakulásában [163-165]. Az MSt neuronjainak szinaptikus végkészülékeiben a glutamát mellett aszpartát is kimutatható [166], pontos funkciója azonban nem ismert. Az összetettebb

viselkedésformák neurokémiai hátterének vizsgálatát megelőzően azonban igazolni kell ezen transzmitterek szinaptikus eredetét. Vizsgálatainkban elsősorban arra kerestük a választ, hogy az általunk tanulmányozni kívánt neurotranszmitterek ürülése kiváltható-e fizikai, illetve kémiai stimulációval (stressz, KCl), valamint gátolható-e szinaptikus ürülést blokkoló kezeléssel (Ca^{2+}-megvonás, TTX).

Az 1-4 napos éber, mozgásukban nem akadályozott csirkéken végzett kísérletek során az excitátoros aminosavak megállapított alapkoncentrációi összevethetőek voltak a korábban emlősök esetében talált alapkoncentrációkkal [167]. Az aszpartát aránya ugyanakkor az össz-excitátoros aminosavtartalomhoz képest jelentősen magasabb volt, mint az éber, illetve altatott patkányok esetében mért értékek. A tapasztalt eltérések a madarak striátumának jellegzetességeit tükrözik.

Korábban Gruss és munkatársai csirkék striatumában jelentősen alacsonyabb extracelluláris aminosav koncentrációkat mértek ([Asp] = 0,012 μM), [Glu] = 0,36 μM) [168], ez azonban a metodikai eltérésekkel is magyarázható.

Vizsgálatainkban az egyes kezelések hatására mindkét excitátoros aminosav esetében hasonló koncentrációváltozás-mintázatot tapasztaltunk. Mind fizikai stresszelés, mind KCl-dal történő kezelés során az aminosavak koncentrációjában jelentős emelkedést észleltünk, az aszpartát koncentrációváltozása ugyanakkor nagyobb variabilitást mutatott az egyes kísérleti állatok között. Kiugróan magas emelkedést tapasztaltunk a transzmitterek extracelluláris koncentrációjában abban az esetben, amikor a KCl kezelést fizikai stresszelés előzte meg. Ezt a jelenséget a viselkedés kiváltotta szinaptikus potenciációval magyarázhatjuk. Az emelkedést azonban a kezelés fennállása ellenére is gyors csökkenés követte, ami feltehetőleg a transzmitter raktárak kiürülésének következménye. A stimulációk okozta transzmitterürülést a TTX egyidejű jelenléte hatékonyan gátolta, ami igazolja ezen transzmitterek szinaptikus eredetét. A Ca^{2+}-hiányos környezet hasonlóan csökkentette a kezelés hatására ürülő Glu mennyiséget, kisebb mértékben ugyan, mint a TTX esetében. Az alapkoncentráció értékeket ugyanakkor mindkét kezelés csak minimális mértékben befolyásolta, melyből következik, hogy az aminosavak nyugalmi alapkoncentrációjának fenntartásáért döntően nem szinaptikus folyamatok felelősek. Az egyes stimulációk hatására megnövekedő glutamát szint esetén a felszabaduló aszpartát mennyisége is megnőtt, és aránya elérte az 50-60%-ot a teljes excitátoros aminosav mennyiséghez képest.

Jellemzően stimuláció hiányában a felszabaduló aszparát mennyisége független volt a felszabaduló glutamáttól, és aránya 10-60% között változott. Ebből arra következtethetünk, hogy az aszpartát felszabadulása egy glutamát-független és egy glutamát-függő komponensből tevődik össze, ennek igazolása azonban további kísérleteket igényel.

Az aszpartátnak a glutamáttól részben független felszabadulása az idegrendszerben betöltött eltérő funkció lehetőségét veti fel. Nem kizárható lehetőség, hogy az extracelluláris aszpartát egy része Ca^{2+}-független mechanizmus révén szabadul fel, és hosszabbtávú metabotróp hatást fejt ki a striatális szubventrikuláris zóna progenitor sejtjeire, míg a Ca^{2+}-függő aszpartát felszabadulás feltehetőleg a glutamáthoz hasonlóan az ionotróp receptorokat stimulálja. Bradford és munkatársai eredményei arra mutatnak, hogy az L-aszpartát az extraszinaptikus elhelyezkedésű NMDA receptorok fő agonistája, mivel az aszpartát főként a szinaptikus zónákon kívül ürül. Fontos megjegyezni, hogy a tanulmányok nagy része szinaptoszóma frakció vizsgálatával nyert eredményeket közöl, ugyanakkor esetünkben az asztrocitákat, mint lehetséges aszpartát forrásokat sem zárhatjuk ki. A kísérleteink során mért eltérő arányú aszpartát, illetve glutamát felszabadulás megerősíti azt a feltételezést, hogy az aszpartát egy része a madarak striatumában neurotranszmitterként ürül, mind kémiai mind viselkedésbeli stimuláció hatására. Mindkét aminosav esetében a felszabadulás nagymértékben a depolarizációt követő exocitózis következtében jön létre, mindemellett aminosav transzportereken keresztül megvalósuló mechanizmusok is közrejátszhatnak ezen neurotranszmitterek koncentrációjának emelkedésében. Ezen eredmények megerősítik azt a hipotézist, miszerint az aszpartát részben neurotranszmitter részben neuromodulátor funkciót tölt be, így szerepet játszhat egyes agyi folyamatokban, mint például a tanulás vagy a memória kialakulásában. Kísérleteink során az emlősökkel ellentétben a csirkék striátumában sokkal magasabb aszpartát-glutamát arányt találtunk, mely pontosabb mérést tesz lehetővé. Ennek következtében ezen állatmodell alkalmasabb lehet az aszpartáterg mechanizmusok szerepének, illetve kinetikájának további tanulmányozására

5.3 Aszpartát és glutamát királis elválasztása

Korábbi tanulmányok alapján a D-aszpartát koncentrációja az agyszövetben kísérleti állattól függően 10-500 nmol/g szövet tartományban változott [169,75]. Ez a mintafeldolgozás során jelentkező 10-100-szoros hígítást figyelembe véve mikromól, illetve az alatti koncentrációtartományban történő meghatározást jelent. Kvantitatív mérés ebben a tartományban hagyományos UV elnyelésen alapuló detektálási módszerrel már nem lehetséges, ezért a korábbi méréseink során alkalmazott lézerindukálta-fluoreszcencia detektálás használata indokolt. Az excitátoros aminosavak akirális elválasztásához hasonlóan a királis elválasztás során is fellépnek a származékképzésből adódó problémák. A királis elválasztás során azonban a melléktermékekkel történő együttes vándorlás fokozott problémát jelent. Ennek következtében a fluorogén származékképzők használata elterjedtebb királis elválasztásra optimalizált módszerek esetében [70,100].

Aminosav enantiomerek biológiai mintákból történő meghatározása során leginkább NDA-t, illetve NBD-F-et alkalmaznak származékképzőként [170,171,100]. Bár az NDA számos kedvező tulajdonsága révén optimális származékképzőnek bizonyulna, a detektáláshoz az argon-ion lézernél alacsonyabb hullámhosszú, költséges lézerforrás szükséges. Mindemellett a reakció csak cianid-ionok jelenlétében megy végbe megfelelően, ami veszélyessé teszi a mintaelőkészítést és problémát okoz a minták további kezelése is. Excitátoros aminosavak akirális elválasztása során már sikerrel alkalmaztuk származékképzőként az NBD-F-ot, ugyanakkor a nagyszámú mikrodializátum vizsgálatánál hátrányt jelentett a származékok alacsony stabilitása. Szövetmintából történő királis elválasztás esetében kisebb mintaszámmal és jelentősen hosszabb analízisidővel kell számolni, így a módszer kevésbé automatizálás-igényes, és könnyebben megoldható, hogy a minták viszonylag rövid ideig tartózkodjanak a készülék mintatartójában. Az enyhe körülmények között gyorsan kivitelezhető származékképzés további előnyt jelentett. A származékképzés körülményeit a továbbiakban nem vizsgáltuk, a korábbi munkánk során optimálisnak talált körülményeket alkalmaztuk.

A módszer szelektivitásának növelése, valamint az analízisidő lerövidítése érdekében a korábbiakhoz hasonlóan az elválasztást borított falú kapillárisban lúgos pH-n végeztük. Belső standardnak az aminosav-származékokhoz hasonló tulajdonságú L-ciszteinsavat

választottuk. Az ismert koncentrációjú aminosav törzsoldatok, valamint a megfelelő hígítások elkészítéséhez ACSF-et használtunk, mellyel a biológiai minták ionösszetételéhez hasonló mintamátrixot kaptunk.

5.3.1 Királis elválasztás optimalizálása

Az elmúlt évtizedben aminosavak királis elválasztására döntően ciklodextrineket, valamint különböző származékaikat alkalmazták [99,172]. Az adott ciklodextrin enantioszelektivitását ugyanakkor nagyban befolyásolja az alkalmazott származékképző, illetve az elválasztó közeg pH-ja, hiszen a kialakult származék mérete, lipofilitása, valamint töltése határozza meg a ciklodextrin molekula üregébe történő illeszkedés mértékét [173]. Így a szakirodalomban más származékképzőre optimalizált királis elválasztás körülményei esetünkben nem alkalmazhatóak. Tsunoda és munkatársai biológiai mintából heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciklodextrin (TM-β-CD) segítségével választott el aszpartát enantiomereket NBD-F-dal történő származékképzést követően, enyhén savas (pH=4) körülmények között [170]. Esetünkben az aszpartát és a glutamát lúgos pH-n történő egyidejű királis elválasztása elkerülhetetlenné tette új módszer kidolgozását, a rendelkezésünkre álló ciklodextrinek, valamint származékaik vizsgálatát.

5.3.1.1 Királis elválasztás natív ciklodextrinek és származékaik jelenlétében

Aminosavak királis elválasztása során leggyakrabban β-ciklodextrint alkalmaznak önmagában, vagy más királis szelektorokkal (tipikusan királis micellaképző epesavakkal) kombinálva. OPA, illetve NDA származékokat sikeresen választottak el β-ciklodextrin segítségével, azonban ezeket a módszereket jellemzően nem az aszpartát és a glutamát egyidejű elválasztására optimalizálták [172]. Esetünkben a β-ciklodextrin csak a glutamát irányában volt enantioszelektív, míg az aszpartát enantiomerek esetében nem mutatott királis megkülönböztetést. A β-ciklodextrin nem-ionos származékai a királis elválasztást érdemben nem javították, azonban a DM-β-CD alkalmazása során koncentráció-függően a glutamát enantiomerek vándorlási sebessége jelentősen nagyobb mértékben lassult, mint az aszpartát enantiomereké. A jelenség a szelektor glutamát enantiomerekkel történő lényegesen stabilabb komplexképzésével magyarázható. A β-ciklodextrin random metilált származéka sem nyújtott érdemi

javulást az elválasztásban a DM-β-CD-hez képest. Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy míg a glutamát enantiomerek esetében közel alapvonali elválasztást lehetett elérni, az aszpartát enantiomerek elválasztására sem a natív β-ciklodextrin sem pedig töltéssel nem rendelkező származékai nem voltak alkalmasak. γ-Ciklodextrin jelenlétében ugyanakkor az aszpartát enantiomerek részleges elválasztását tapasztaltuk, azonban ez a szelektor glutamát enantiomerek irányában nem mutatott királis megkülönböztetést.

5.3.1.2 Királis elválasztás ionos ciklodextrinek jelenlétében

Számos kutatócsoport sikeresen választott el töltéssel rendelkező enantiomereket ellentétesen töltött ciklodextrin származékokkal [174,175]. Abban az esetben, amikor mind a vendégmolekula, mind a komplexképző töltéssel rendelkezik, a Van der Waals, valamint a hidrogén-híd kölcsönhatások mellett lehetőség van ionos kölcsönhatás kialakulására is. Az ionos kölcsönhatás következtében a komplexképzés enantioszelektivitása nőhet, ami lehetővé teszi a megfelelő elválasztást [176]. Iványi és munkatársai enyhén savas körülmények között (pH=6) vizsgálták anionos vegyületek különféle amino-szubsztituált ciklodextrinekkel történő kölcsönhatását [177]. Az egyes vegyületek alapvonali elválasztása már egészen alacsony szelektor koncentrációnál (1-5 mM) lehetővé vált, amelyet részben a kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásokkal magyaráztak. Esetünkben a negatív töltéssel bíró aminosav származékok elválasztását kíséreltük meg HPA-β-CD alkalmazásával. Semlegeshez közeli pH értékeken, ahol mind az aminosavak, mind a szelektor molekulák töltéssel rendelkeznek nem tapasztaltunk királis megkülönböztetést, viszont a migrációs idők jelentősen megnövekedtek, ami erős, nem enantioszelektív kölcsönhatásra utal. A pufferközeg pH-ját növelve 8-as pH érték esetén kapunk megfelelő királis elválasztást, míg ennél magasabb pH értéken torzulnak a csúcsalakok, és az aszpartát esetében megszűnik a királis megkülönböztetés. Az elválasztás pH-függése alapján arra következtethetünk, hogy a komplexképzésben a királis szelektor protonált, illetve deprotonált formája is szerepet játszik. Míg a töltéssel rendelkező protonált forma az erős, de nem enantioszelektív komplexképzésért lehet felelős, az aszpartát királis megkülönböztetése a deprotonált, semleges forma esetében valósul meg. A vizsgált vegyületek alapvonali elválasztását a szelektor két protonáltsági állapotának megfelelő aránya mellett, pH=8

esetén értük el. Az enantioszelektivitás a szelektor koncentrációjával arányosan növekedett, ugyanakkor a kémiai szelektivitás romlott. 5 mM HPA-β-CD jelenlétében az L-aszpartát csúcs együtt vándorolt a D-glutamát csúccsal. Ebből a jelenségből arra következtethetünk, hogy az aszpartát enantiomerekkel a királis szelektor stabilabb komplexet képez, mint a glutamát enantiomerekkel, hiszen a magasabb szelektor koncentrációnál az aszpartát enantiomerek migrációs ideje nagyobb mértékben nő, mint a glutamát enantiomereké.

5.3.1.3 Királis elválasztás kettős ciklodextrin rendszer jelenlétében

Kettő vagy több enantiomerpár egyidejű elválasztására gyakran használnak két királis szelektort tartalmazó rendszert [178-180]. Ekkor jellemzően az egyik szelektor az enantioszelektivitást, a másik a kémiai szelektivitást biztosítja [181,182]. A gyakorlatban elterjedt a töltéssel rendelkező, illetve neutrális ciklodextrinek kombinációja [94].

Bár önmagában a HPA-β-CD alapvonali elválasztást biztosított mindkét aminosav esetében, a biológiai mintákban várt közel 50-szeres enantiomerfelesleg miatt szükségesnek láttuk az elválasztás szelektivitásának növelését. A korábbiakban láttuk, hogy a DM-β-CD eltérő stabilitású komplexeket képez az aszpartát és a glutamát enantiomerekkel, s az utóbbiak migrációját jelentősebben lassítja, így megfelelő választásnak tűnt a rendszer kémiai szelektivitásának növelésére. A két szelektor közti versengés következtében 3 mM HPA-β-CD már nem bizonyult elegendőnek a megfelelő enantioszelektivitás eléréséhez 5, illetve 10 mM DM-β-CD jelenlétében. A HPA-β-CD koncentrációjának növelése ugyan javította az enantioszelektivitást, azonban egy bizonyos határon túl a szelektorok koncentrációjának növelése az analízisidőt jelentősen meghosszabbította, míg a kémiai szelektivitás érdemben nem nőtt. Mindkét szelektor esetében egy olyan köztes koncentrációértéket választottunk (5 mM HPA-β-CD 5, illetve 8 mM DM-β-CD), ahol a már megfelelőnek talált kémiai szelektivitás mellett elfogadhatóan rövid, 10 perces analízisidőt kaptunk. Ezzel az általunk kidolgozott elválasztási módszer jelentősen gyorsabbnak bizonyult számos korábban publikált módszernél [183,184,171,185].

5.3.2 Módszervalidálás

Az excitátoros aminosavak D-enantiomerjeinek szövetmintákból történő pontos meghatározását nagyban megnehezítheti a jelenlévő L-enantiomer jelentős feleslege. Aszpartát esetében számos szerző különböző kísérleti állatok agyszövetét vizsgálva jellemzően egy, illetve két nagyságrendbeli különbséget írt le az L-enantiomer javára [35,75]. Előzetes vizsgálatainkban a csirkék agyszövetéből készült minták vizsgálata során az aszpartát enantiomerek közel 50-szeres koncentrációkülönbségét találtuk. Ezek alapján a teljes validálási folyamat során mindkét aminosav esetén 50-szeres L-enantiomer-felesleget alkalmaztunk. A biológiai mintákra jellemző koncentrációviszonyokat figyelembe vevő validálásra ez idáig nem találtunk példát a kapilláris elektroforézissel foglalkozó szakirodalomban. Validált módszerünk nagy előnye, hogy lényegesen megbízhatóbb információkat szolgáltat a biológiai mintákból történő meghatározások során. A szakirodalomban található, az aszpartát és glutamát enantiomerek biológiai mintákból történő egyidejű királis meghatározására fejlesztett CE-LIF módszerek esetében nem, vagy csak részleges validálás történt. Thorsén és munkatársai (+/-)-1-(9-antranil)-2-propil-kloroformáttal (APOC) történő diasztereomer származékképzést követően választottak el aszpartát, glutamát, illetve egyéb aminosav enantiomereket. Bár a detektálási határ D-Glu esetében 7 nM volt, a módszer a megfelelő validációs adatok hiányában kvantitatív meghatározásra nem, csak a vizsgált mintában lévő D-aminosavak százalékos arányának megadására volt alkalmas [183]. Simó és munkatársai FITC származékképzést követően választottak el többek között aszpartát és glutamát enantiomereket ételmintákban. Kalibráció hiányában a mérési adatokat az abszolút koncentrációk helyett korrigált csúcsterületekben adták meg, melyek így mások méréseivel nehezen összevethetők. Az általuk kidolgozott módszert a későbbiekben kisebb módosításokkal sikeresen alkalmazták más biológiai eredetű minták analízisére, azonban egyetlen esetben sem végeztek módszervalidálást. Kirschner és munkatársai savas pH-n negatív töltésű ciklodextrinnel választottak el aminosav enantiomereket (Asp, Glu, Ser, Arg, Ala) NDA-vel történő származékképzést követően. Hatékony prekoncentrációs lépést követően a módszer érzékenységét közel százszorosra tudták növelni. Ugyanakkor a kísérleti állatokból származó mikrodializátumok esetében ezt a lépést nem lehetett alkalmazni, az így elérhető érzékenység (detektálási határ ~50 nM) nem bizonyult elegendőnek D-aminosavak

detektálásához. Wang és munkatársai sok más szerzőhöz hasonlóan a kalibrációs tartomány alsó pontját adták meg kvantitálási határnak, ami a korábbi tapasztalatok alapján nem tekinthető megbízhatónak [186].

Mindkét aminosav esetében a módszervalidálás során kapott detektálási, valamint kvantitálási határ módszerünk esetében a jelenleg ismert szakirodalom alapján a legalacsonyabbak, összevetve a hasonló NBD-F-el történő származékképzést követő kapilláris elektroforézis módszerekkel, ideértve az akirális elválasztásokat is. Láthattuk, hogy korábban az akirális elválasztás során, származékképzőtől függetlenül 0,1 μM kvantitálási határt találtunk mindkét aminosavra. Ugyanakkor a királis elválasztás során a D-aminosavakra kapott alacsonyabb kvantitálási határ látszólag ellentmondásos lehet. A kvantitatív reakció egyik feltétele a megfelelő reagensfelesleg jelenléte. Párhuzamosan azonban a reagens hidrolízise is végbemegy, amely a reagens koncentrációt csökkenti. Alacsony koncentrációk (< 0,1 μM) esetében míg a hidrolízis sebessége közel állandó marad, a származékképzés sebessége olyan mértékben lelassul, hogy a reakció már nem megy kvantitatívan végbe. Feltételezzük, hogy a származékképzés kinetikája mindkét enantiomer esetében azonos, vagyis a reagens nem diszkriminál az izomerek között. Ekkor a nagy feleslegben jelenlévő L-enantiomer miatt a származékképzés sebessége nem csökken a kritikus szint alá, és a 0,1 μM alatti koncentrációjú D-enantiomer származékképzése is kvantitatívan végbemegy. Így bár a magas L-enantiomer felesleg megnehezíti az elválasztást, ugyanakkor hozzájárulhat az alacsony koncentrációban lévő D-enantiomer kvantitatív származékképzéséhez.

5.3.3 Szövetminták vizsgálata

A szövetmintákból történő D-aminosav meghatározás során fiatal, 1-4 napos csirkékből származó agyszöveteket használtunk. Korábbi vizsgálatok alapján a szubventrikuláris zonában ebben az életkorban még aktív sejtosztódás figyelhető meg, míg a nidopallium, valamint a cerebellum már nem tartalmaz neuronális őssejteket. Az agyszövetmintákban mért értékek korábban más szerzők által a csirkeembriónál (1 és 12 hetes), valamint az újszülött patkánynál talált értékeknél alacsonyabbak, míg a felnőtt patkányok agyában mért D-aszpartát koncentrációnál magasabbak. Az egyes agyterületek D-aszpartát tartalma állatonként nagy szórást mutatott, ugyanakkor állatonként az SVZ D-aszpartát tartalmát magasabbnak találtuk, mint a kontroll régiókét (nidopallium, cerebellum). A mintaszám azonban nem volt elegendő a szignifikáns különbség megállapításához.

6 Következtetések

Munkánk során olyan nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszereket fejlesztettünk ki, melyek alkalmasak kis mennyiségű biológiai minták aszpartát, illetve glutamát tartalmának egyidejű meghatározására. A megfelelő érzékenység elérése érdekében lézerindukálta fluoreszcencia detektálást alkalmaztunk, és három különböző származékképző vegyületre épülő módszert dolgoztunk ki. Az elválasztásokat lúgos pH-n, borított falú kapillárisban végeztük, így az analízisidő egyik származékképző esetében sem haladta meg az 5 percet. A módszerek validálása során az egyes származékképzők érzékenysége között jelentős különbséget találtunk, ugyanakkor mindegyik módszer csak egy, a detektálási határhoz képest viszonylag magas koncentrációértékig (0,1 μM) nyújtott megfelelő pontosságot. A jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a származékképzési reakció alacsony koncentrációtartományban már nem kvantitatív, így bár a vizsgálandó vegyületek nanomólos koncentrációtartományban még detektálhatóak, megfelelő pontossággal történő meghatározásuk már nem kivitelezhető. Demonstráltuk, hogy a módszer pontosságának és torzítatlanságának megfelelő bizonyítására kizárólag egy teljes körű validációs folyamat alkalmas. Ezzel szemben a becsült, vagy a kalibráció linearitása alapján meghatározott analitikai paraméterekkel rendelkező módszerek pontossága különösen alacsony mintakoncentráció esetében megkérdőjelezhető. A biológiai minták vizsgálatára a továbbiakban a legnagyobb stabilitást nyújtó származékképzőt (FITC) választottuk.

A Semmelweis Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben vizsgáltuk házi csirkék striátumából származó agyi mikrodializátumok excitátoros aminosav tartalmát, valamint ezen transzmitterek koncentrációváltozását eltérő stimulusok hatására. Kísérleteinkben az aszpartát és a glutamát ürülése mind fizikai stresszeléssel, mind kémiai stimulációval (KCl) kiváltható volt. Tetrodotoxin alkalmazása, illetve a lokális Ca^{2+}-megvonás a transzmitterek felszabadulását gátolta, ami alátámasztja a stimuláció hatására ürült transzmitterek szinaptikus eredetét. Az aszpartát glutamáttól részben független felszabadulása az eltérő biológiai funkció lehetőségét veti fel. A kidolgozott állatmodellen számos összetett viselkedés neurokémiai háttere, illetve farmakonok neurotranszmisszióra gyakorolt hatása is vizsgálható a továbbiakban.

Kidolgoztunk továbbá egy aszpartát és glutamát enantiomerek biológiai mintákból történő egyidejű meghatározására alkalmas királis kapilláris elektroforézis módszert is. Az akirális módszerekhez hasonlóan itt is fluoreszcens származékképzést alkalmaztunk. Az elválasztást azonban nemcsak a D-enantiomerek alacsony koncentrációja, hanem az egyidejűleg jelen lévő nagy L-enantiomerfelesleg is megnehezítette. A rendszer szelektivitásának beállítására kettős ciklodextrin rendszert fejlesztettünk ki, az 5 mM HPA-β-CD mellett 8 mM DM-β-CD-t alkalmazva lehetőség nyílt valamennyi vizsgált vegyület enantiomereinek egyidejű elválasztására. A hasonló szakirodalomban közölt módszerekkel szemben elsőként, a módszervalidálás során figyelembe vettük és alkalmaztuk a vizsgálandó szövetmintákra jellemző koncentrációarányokat. A módszer alkalmazhatóságát házi csirkékből származó agyszövet minták analízisével demonstráltuk.

A nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis különösen alkalmasnak bizonyult kis mintatérfogatok vizsgálatára, illetve alacsony koncentrációjú vegyületek kompex mintamátrixból történő meghatározására. Az általunk kidolgozott módszerekkel a jövőben lehetőség nyílik az excitátoros aminosav neurotranszmitterek, ezen belül is az aszpartát enantiomerek összetett élettani funkcióinak felderítésére.

7 Összefoglalás

A glutamát és az aszpartát a központi idegrendszer két legjelentősebb excitátoros neurotranszmittere. Míg a glutamát szerepét széleskörűen vizsgálják, az aszpartát funkciójának tisztázása számos folyamatban, mint pl. tanulás, vagy a memória kialakulása további vizsgálatokat igényel. Az elmúlt évtizedekben számos aminosav D-formáját, többek között a D-aszpartátot is kimutatták madarak, illetve emlősök agyszövetében. A kis számú rendelkezésre álló kísérleti adat alapján a D-aszpartátnak az idegrendszer korai fejlődésben lehet szerepe.

Munkám során olyan akirális és királis kapilláris elektroforézis módszereket dolgoztam ki, amelyek alkalmasak az excitátoros aminosavak, valamint enantiomerjeik biológiai mintákból történő meghatározására. A megfelelő érzékenység elérése érdekében lézerindukálta fluoreszcencia detektálást alkalmaztunk, mely azonban megköveteli a minták analízist megelőző származékképzését. Három, különböző származékképző reagensen alapuló akirális elválasztási módszert, továbbá egy 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazollal (NBD-F) történő származékképzést követő királis módszert. Az akirális módszerek közül a fluoreszcein izotiocianát (FITC) származékok elválasztására épülő módszert alkalmaztuk az agyi mikrodializátumok vizsgálatára. A Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben mikrodialízis kísérletek során vizsgáltuk házi csirkék striátumában az aszpartát és a glutamát felszabadulást különböző stimulusok hatására. A királis elválasztási módszerrel házi csirkék agyszövetének D-aszpartát tartalmát, valamint annak arányát vizsgáltuk a teljes aszpartát mennyiséghez képest.

A módszervalidálás során a detektálási és a kvantitálási határok között jelentős különbséget találtunk, amely feltehetőleg az alacsony koncentrációk esetében már nem kvantitatív származékképzési reakció következménye. A mikrodialízis kísérletekben bebizonyítottuk, hogy az aszpartát a glutamáttal együtt szinaptikus úton ürül. Az eltérő agyterületekből származó agyszövetminták D-aszpartát tartalmának meghatározása során bizonyítottuk, hogy az általunk kidolgozott módszer alkalmas biológiai minták vizsgálatára.

Summary

Glutamate and aspartate are the primary excitatory neurotransmitters in the central nervous system, playing an important role, e.g. in learning including memory formation and memory retrieval. While glutamate is widely investigated, the exact role of aspartate is less well understood. In the last few decades, the D-enantiomers of some amino acids were also detected in higher living organisms. The transient high concentration of D-aspartate found in embryonic brain suggests its crucial role in the early development of the nervous system. However, the quantification of the excitatory amino acids and their enantiomers requires proper analytical methods. Because of its high sensitivity, small required sample volume and the relatively fast analysis time, capillary electrophoresis is a suitable analytical technique for analyzing various biological samples.

In our work we have developed new capillary electrophoresis methods capable of quantifying excitatory amino acids in biosamples. In order to increase the sensitivity, laser induced fluorescence was applied. Because of the lack of proper fluorophore, sample derivatization prior to analysis was required. Three capillary electrophoretic separation method based on different fluorescent labeling reagents were developed. Method validation has revealed similar quantification limit of 0,1 μM of analytes using either of the labels, although detection limits were different. The almost two orders of magnitude difference between the detection and the quantification limits is likely due to the unreliable derivatization reaction at low sample concentration. Based on its superior stability, fluorescein isothiocyanate (FITC) was chosen in order to analyze striatal brain microdialysates. A chiral capillary electrophoresis method using 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) as a labeling reagent has also been developed. Using dual cyclodextrin system, the baseline separation of aspartate and glutamate enantiomers has been achieved within 10 minutes. This method was also validated for biological application. In cooperation with the Institute of Anatomy, Histology and Embryology at the Semmelweis University, the release mechanism of aspartate and glutamate were investigated using one-day-old domestic chickens and brain microdialysis. The applicability of the chiral method was demonstrated by analyzing various brain regions of one-day-old chickens.

8 Irodalomjegyzék

1. George J. Siegel RWA, Scott T. Brady, Donald L. Price (2006) Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7th edn. Academic Press, New York

2. Watkins JC (2000) L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. Biochem Soc Trans 28 (4):297-309

3. Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. Br J Pharmacol 147 Suppl 1:S100-108

4. Braitenberg V. SA (1998) Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity 2nd edn. Springer-Verlag, New York

5. Marmiroli P, Cavaletti G (2012) The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. Curr Med Chem 19 (9):1269-1276

6. Konradi C, Heckers S (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. Pharmacol Ther 97 (2):153-179

7. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci USA 93 (24):13445-13452

8. Benjamin AM, Quastel JH (1972) Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. Biochem J 128 (3):631-646

9. Gundersen V, Chaudhry FA, Bjaalie JG, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1998) Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. J Neurosci 18 (16):6059-6070

10. Peterson CL, Thompson MA, Martin D, Nadler JV (1995) Modulation of glutamate and aspartate release from slices of hippocampal area CA1 by inhibitors of arachidonic acid metabolism. J Neurochem 64 (3):1152-1160

11. Zhou M, Peterson CL, Lu YB, Nadler JV (1995) Release of glutamate and aspartate from CA1 synaptosomes: selective modulation of aspartate release by ionotropic glutamate receptor ligands. J Neurochem 64 (4):1556-1566

12. Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, Jr., Edwards RH (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. Science 289 (5481):957-960

13. Patneau DK, Mayer ML (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. J Neurosci 10 (7):2385-2399

14. Curras MC, Dingledine R (1992) Selectivity of amino acid transmitters acting at N-methyl-D-aspartate and amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. Mol Pharmacol 41 (3):520-526

15. Levi G, Aloisi F, Ciotti MT, Gallo V (1984) Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures. Brain Res 290 (1):77-86

16. Wilkinson RJ, Nicholls DG (1989) Compartmentation of glutamate and aspartate within cerebral cortical synaptosomes: evidence for a non-cytoplasmic origin for the calcium-releasable pool of glutamate. Neurochem Int 15 (2):191-197

17. McMahon HT, Nicholls DG (1990) Glutamine and aspartate loading of synaptosomes: a reevaluation of effects on calcium-dependent excitatory amino acid release. J Neurochem 54 (2):373-380

18. Nadler JV, Vaca KW, White WF, Lynch GS, Cotman CW (1976) Aspartate and glutamate as possible transmitters of excitatory hippocampal afferents. Nature 260 (5551):538-540

19. Szerb JC (1988) Changes in the relative amounts of aspartate and glutamate released and retained in hippocampal slices during stimulation. J Neurochem 50 (1):219-224

20. Palmer AM, Reiter CT (1994) Comparison of the superfused efflux of preaccumulated D-[^{3}H]aspartate and endogenous L-aspartate and L-glutamate from rat cerebrocortical minislices. Neurochem Int 25 (5):441-450

21. Cavallero A, Marte A, Fedele E (2009) L-aspartate as an amino acid neurotransmitter: mechanisms of the depolarization-induced release from cerebrocortical synaptosomes. J Neurochem 110 (3):924-934

22. Bradford SE, Nadler JV (2004) Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. Neuroscience 128 (4):751-765

23. Hardingham GE, Bading H (2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. Biochim Biophys Acta 1600 (1-2):148-153

24. Baird DH, Trenkner E, Mason CA (1996) Arrest of afferent axon extension by target neurons in vitro is regulated by the NMDA receptor. J Neurosci 16 (8):2642-2648

25. Rocha M, Sur M (1995) Rapid acquisition of dendritic spines by visual thalamic neurons after blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. Proc Natl Acad Sci USA 92 (17):8026-8030

26. Fujii N, Saito T (2004) Homochirality and life. Chem Rec 4 (5):267-278

27. Fujii N (2002) D-amino acids in living higher organisms. Orig Life Evol Biosph 32 (2):103-127

28. Fujii N (2005) D-amino acid in elderly tissues. Biol Pharm Bull 28 (9):1585-1589

29. Corrigan JJ (1969) D-amino acids in animals. Science 164 (3876):142-149

30. D'Aniello A, Guiditta A (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of Octopus vulgaris Lam. J Neurochem 29 (6):1053-1057

31. D'Aniello A, Giuditta A (1978) Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system. J Neurochem 31 (4):1107-1108

32. Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. Biochem Biophys Res Commun 141 (1):27-32

33. Nagasaki H, Yamada R, Konno R, Yasumura Y, Iwashima A (1990) D-aspartate oxidase activity and D-aspartate content in a mutant mouse strain lacking D-amino acid oxidase. Experientia 46 (5):468-470

34. Neidle A, Dunlop DS (1990) Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. Life Sci 46 (21):1517-1522

35. D'Aniello S, Somorjai I, Garcia-Fernandez J, Topo E, D'Aniello A (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. FASEB J 25 (3):1014-1027

36. Hashimoto A, Oka T (1997) Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. Prog Neurobiol 52 (4):325-353

37. Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. FEBS J 275 (14):3514-3526

38. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Hayashi T, Takahashi K (1993) Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. FEBS Lett 331 (1-2):4-8

39. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T (1995) Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. Eur J Neurosci 7 (8):1657-1663

40. Imai K, Fukushima T, Santa T, Homma H, Huang Y, Sakai K, Kato M (1997) Distribution of free D-amino acids in tissues and body fluids of vertebrates. Enantiomer 2 (3-4):143-145

41. Wolosker H, D'Aniello A, Snyder SH (2000) D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. Neuroscience 100 (1):183-189

42. Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, et al. (1993) Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. J Neurochem 61 (1):348-351

43. Schell MJ, Cooper OB, Snyder SH (1997) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. Proc Natl Acad Sci USA 94 (5):2013-2018

44. Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H, Snyder SH (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 107 (7):3175-3179

45. Errico F, Napolitano F, Nistico R, Usiello A (2012) New insights on the role of free D: -aspartate in the mammalian brain. Amino Acids

46. Gong XQ, Frandsen A, Lu WY, Wan Y, Zabek RL, Pickering DS, Bai D (2005) D-aspartate and NMDA, but not L-aspartate, block AMPA receptors in rat hippocampal neurons. Br J Pharmacol 145 (4):449-459

47. Errico F, Nistico R, Palma G, Federici M, Affuso A, Brilli E, Topo E, Centonze D, Bernardi G, Bozzi Y, D'Aniello A, Di Lauro R, Mercuri NB, Usiello A (2008) Increased levels of d-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility. Mol Cell Neurosci 37 (2):236-246

48. Topo E, Soricelli A, Di Maio A, D'Aniello E, Di Fiore MM, D'Aniello A (2010) Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. Amino Acids 38 (5):1561-1569

49. Errico F, Nistico R, Napolitano F, Oliva AB, Romano R, Barbieri F, Florio T, Russo C, Mercuri NB, Usiello A (2011) Persistent increase of D-aspartate in D-aspartate oxidase mutant mice induces a precocious hippocampal age-dependent synaptic plasticity and spatial memory decay. Neurobiol Aging 32 (11):2061-2074

50. Billard JM (2012) D: -Amino acids in brain neurotransmission and synaptic plasticity. Amino Acids

51. Ota N, Shi T, Sweedler JV (2012) D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. Amino Acids

52. Kera Y, Aoyama H, Matsumura H, Hasegawa A, Nagasaki H, Yamada R (1995) Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues. Biochim Biophys Acta 1243 (2):283-286

53. Fuchs SA, Berger R, Klomp LW, de Koning TJ (2005) D-amino acids in the central nervous system in health and disease. Mol Genet Metab 85 (3):168-180

54. Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. Arch Int Pharmacodyn Ther 198 (1):9-21

55. Zhang D, Zhang J, Ma W, Chen D, Han H, Shu H, Liu G (2001) Analysis of trace amino acid neurotransmitters in hypothalamus of rats after exhausting exercise using microdialysis. Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications 758 (2):277-282

56. Wibom C, Surowiec I, Moren L, Bergstrom P, Johansson M, Antti H, Bergenheim AT (2010) Metabolomic patterns in glioblastoma and changes during radiotherapy: a clinical microdialysis study. J Proteome Res 9 (6):2909-2919

57. Notkina N, Dahyot-Fizelier C, Gupta AK (2012) In vivo microdialysis in pharmacological studies of antibacterial agents in the brain. Br J Anaesth 109 (2):155-160

58. Yang H, Peters JL, Allen C, Chern SS, Coalson RD, Michael AC (2000) A theoretical description of microdialysis with mass transport coupled to chemical events. Anal Chem 72 (9):2042-2049

59. Peters JL, Michael AC (1998) Modeling voltammetry and microdialysis of striatal extracellular dopamine: the impact of dopamine uptake on extraction and recovery ratios. J Neurochem 70 (2):594-603

60. Ruiz-Jiménez J, de Castro MDL (2006) Coupling microdialysis to capillary electrophoresis. Trends Anal Chem 25 (6):563-571

61. Faro LR, Oliveira IM, Duran R, Alfonso M (2012) In vivo neurochemical characterization of clothianidin induced striatal dopamine release. Toxicology 302(2-3):197-202

62. Cannazza G, Carrozzo MM, Cazzato AS, Bretis IM, Troisi L, Parenti C, Braghiroli D, Guiducci S, Zoli M (2012) Simultaneous measurement of adenosine, dopamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in cerebral mice microdialysis samples by LC-ESI-MS/MS. J Pharm Biomed Anal 71:183-186

63. Zhou SY, Zuo H, Stobaugh JF, Lunte CE, Lunte SM (1995) Continuous in-vivo monitoring of amino-acid neurotransmitters by microdialysis sampling with online derivatization and capillary electrophoresis. Anal Chem 67 (3):594-599

64. Kushikata T, Hirota K (2011) Neuropeptide microdialysis in free-moving animals. Methods Mol Biol 789:261-269

65. Yamamoto T, Azechi H, Board M (2012) Essential role of excessive tryptophan and its neurometabolites in fatigue. Can J Neurol Sci 39 (1):40-47

66. Lapainis T, Sweedler JV (2008) Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience. J Chromatogr A 1184 (1-2):144-158

67. Westerink BHC (1995) Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. Behav Brain Res 70 (2):103-124

68. Benveniste H, Diemer NH (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. Acta Neuropathol 74 (3):234-238

69. Perry M, Li Q, Kennedy RT (2009) Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. Anal Chim Acta 653 (1):1-22

70. Kirschner DL, Green TK (2009) Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices. J Sep Sci 32 (13):2305-2318

71. Aswad DW (1984) Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthaldialdehyde. Anal Biochem 137 (2):405-409

72. Imai K, Fukushima T, Santa T, Homma H, Hamase K, Sakai K, Kato M (1996) Analytical chemistry and biochemistry of D-amino acids. Biomed Chromatogr 10 (6):303-312

73. Hamase K, Homma H, Takigawa Y, Fukushima T, Santa T, Imai K (1997) Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain. Biochim Biophys Acta 1334 (2-3):214-222

74. Han H, Miyoshi Y, Ueno K, Okamura C, Tojo Y, Mita M, Lindner W, Zaitsu K, Hamase K (2011) Simultaneous determination of D-aspartic acid and D-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879 (29):3196-3202

75. Katane M, Homma H (2011) D-Aspartate - an important bioactive substance in mammals: a review from an analytical and biological point of view. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879 (29):3108-3121

76. Parrot S, Bert L, Mouly-Badina L, Sauvinet V, Colussi-Mas J, Lambas-Senas L, Robert F, Bouilloux JP, Suaud-Chagny MF, Denoroy L, Renaud B (2003) Microdialysis monitoring of catecholamines and excitatory amino acids in the rat and mouse brain: recent developments based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection - a mini-review. Cellular and molecular neurobiology 23 (4-5):793-804

77. Hjertén S (1967) Free zone electrophoresis. Chromatogr Rev 9 (2):122-219

78. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TPEM (1979) High-performance zone electrophoresis. J Chromatogr A 169 (0):11-20

79. Jorgenson JW (1984) Zone electrophoresis in open-tubular capillaries. Trends Anal Chem 3 (2):51-54

80. Jorgenson JW, Lukacs KD (1985) Capillary Zone Electrophoresis. In: Milos VN, Daido I (eds) Journal of Chromatography Library, vol Volume 30. Elsevier, pp 121-131

81. Huhn C, Ramautar R, Wuhrer M, Somsen GW (2010) Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 396 (1):297-314

82. Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. J Chromatogr A 218 (0):209-216

83. Terabe S, Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchya, A., Ando, T. (1984) Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. Anal Chem 56:834-841

84. Gassmann E, Kuo JE, Zare RN (1985) Electrokinetic separation of chiral compounds. Science 230 (4727):813-814

85. Knox JH, Grant, I. H. (1991) Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 mm silica-gels and ODS bonded silica-gels. Chromatogr 32:317-328

86. Cohen AS, Karger BL (1987) High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. J Chromatogr 397:409-417

87. Foret F, Szökő E, Karger BL (1993) Trace analysis of proteins by capillary zone electrophoresis with on-column transient isotachophoretic preconcentration. Electrophoresis 14 (5-6):417-428

88. Hjertén S, Zhu M-d (1985) Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. Journal of Chromatography A 346 (0):265-270

89. Vandenabeele-Trambouze O, Albert M, Bayle C, Couderc F, Commeyras A, Despois D, Dobrijevic M, Loustalot MF (2000) Chiral determination of amino acids by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence at picomolar concentrations. J Chromatogr A 894 (1-2):259-266

90. Dalgliesh CE (1952). The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. J Chem Soc:3940-3942.

91. Wren SAC (1993) Theory of chiral separation in capillary electrophoresis. J Chromatogr A 636 (1):57-62

92. Chankvetadze B (1997) Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors. J Chromatogr A 792 (1–2):269-295

93. Fillet M, Hubert P, Crommen J (2000) Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. J Chromatogr A 875 (1-2):123-134

94. Lelievre F, Gareil P, Bahaddi Y, Galons H (1997) Intrinsic selectivity in capillary electrophoresis for chiral separations with dual cyclodextrin systems. Anal Chem 69 (3):393-401

95. Szejtli J (1982) Cyclodextrins and their inclusion complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest

96. Fanali S (2000) Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. J Chromatogr A 875 (1-2):89-122

97. Blanco M, Valverde I (2003) Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. Trends Anal Chem 22 (7):428-439

98. Gübitz G, Schmid MG (2007) Advances in chiral separation using capillary electromigration techniques. Electrophoresis 28 (1-2):114-126

99. Scriba GK (2008) Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations--recent developments and applications. J Sep Sci 31 (11):1991-2011

100. Kirschner DL, Jaramillo M, Green TK (2007) Enantioseparation and stacking of Cyanobenz[f]isoindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated beta-cyclodextrin. Anal Chem 79 (2):736-743

101. Tang W, Ng SC (2008) Monosubstituted positively charged cyclodextrins: Synthesis and applications in chiral separation. J Sep Sci 31 (18):3246-3256

102. Otsuka K, Terabe S (2000) Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants. J Chromatogr A 875 (1-2):163-178

103. Otsuka K, Terabe S (1993) Enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography. Trends Anal Chem 12 (4):125-130

104. Haginaka J (2000) Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors. J Chromatogr A 875 (1-2):235-254

105. Gasper MP, Berthod A, Nair UB, Armstrong DW (1996) Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations. Anal Chem 68 (15):2501-2514

106. Kuhn R (1999) Enantiomeric separation by capillary electrophoresis using a crown ether as chiral selector. Electrophoresis 20 (13):2605-2613

107. Zhang H, Qi L, Mao L, Chen Y (2012) Chiral separation using capillary electromigration techniques based on ligand exchange principle. J Sep Sci 35 (10-11):1236-1248

108. Szökő E, Tábi T (2010) Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. J Pharm Biomed Anal 53 (5):1180-1192

109. Cai J, Henion J (1995) Capillary electrophoresis-mass spectrometry. J Chromatogr A 703 (1–2):667-692

110. Bardelmeijer HA, Lingeman H, de Ruiter C, Underberg WJ (1998) Derivatization in capillary electrophoresis. J Chromatogr A 807 (1):3-26

111. Paez X, Hernandez L (2001) Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Biophar Drug Dispos 22 (7-8):273-289

112. Bowser MT, Kennedy RT (2001) In vivo monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. Electrophoresis 22 (17):3668-3676

113. Klinker CC, Bowser MT (2007) 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis-capillary electrophoresis. Anal Chem 79 (22):8747-8754

114. Waterval JC, Lingeman H, Bult A, Underberg WJ (2000) Derivatization trends in capillary electrophoresis. Electrophoresis 21 (18):4029-4045

115. Fukushima T, Usui N, Santa T, Imai K (2003) Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis. J Pharm Biomed Anal 30 (6):1655-1687

116. Underberg WJ, Waterval JC (2002) Derivatization trends in capillary electrophoresis: an update. Electrophoresis 23 (22-23):3922-3933

117. Chen Z, Wu J, Baker GB, Parent M, Dovichi NJ (2001) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. J Chromatogr A 914 (1–2):293-298

118. Shou M, Smith AD, Shackman JG, Peris J, Kennedy RT (2004) In vivo monitoring of amino acids by microdialysis sampling with on-line derivatization by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and rapid micellar electrokinetic capillary chromatography. J Neurosci Methods 138 (1–2):189-197

119. Bergquist J, Vona MJ, Stiller C-O, O'Connor WT, Falkenberg T, Ekman R (1996) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: a sensitive method for monitoring extracellular concentrations of amino acids in the periaqueductal grey matter. J Neurosci Methods 65 (1):33-42

120. Ohkura Y, Kai M, Nohta H (1994) Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 659 (1–2):85-107

121. Watanabe Y, Imai K (1981) High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. Anal Biochem 116 (2):471-472

122. Cheng YF, Dovichi NJ (1988) Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. Science 242 (4878):562-564

123. Kei Lau S, Zaccardo F, Little M, Banks P (1998) Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis. J Chromatogr A 809 (1-2):203-210

124. Li H, Wang H, Chen J-h, Wang L-h, Zhang H-s, Fan Y (2003) Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 788 (1):93-101

125. Li YM, Qu Y, Vandenbussche E, Arckens L, Vandesande F (2001) Analysis of extracellular gamma-aminobutyric acid, glutamate and aspartate in cat visual cortex by in vivo microdialysis and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. J Neurosci Methods 105 (2):211-215

126. Roman DA, Carretero AS, Blanco CC, Gutierrez AF (2004) Subminute and sensitive determination of the neurotransmitter serotonin in urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Biomed Chromatogr 18 (7):422-426

127. Banks PR, Paquette DM (1995) Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis. Bioconjug Chem 6 (4):447-458

128. Banks PR (1998) Fluorescent derivatization for low concentration protein analysis by capillary electrophoresis. Trends Anal Chem 17 (10):612-622

129. Molina M, Silva M (2002) Analytical potential of fluorescein analogues for ultrasensitive determinations of phosphorus-containing amino acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. Electrophoresis 23 (7-8):1096-1103

130. Cao L, Wang H, Zhang H (2005) Analytical potential of 6-oxy-(N-succinimidyl acetate)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein for the determination of amino compounds by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Electrophoresis 26 (10):1954-1962

131. Deng YH, Li RJ, Zhang HS, Du XL, Wang H (2007) Liquid chromatographic analysis of phosphoamino acids at femtomole level using chemical derivatization with N-hydroxysuccinimidyl fluorescein-O-acetate. Anal Chim Acta 601 (1):118-124

132. Causse E, Issac C, Malatray P, Bayle C, Valdiguie P, Salvayre R, Couderc F (2000) Assays for total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. I. Preanalytical condition studies. J Chromatogr A 895 (1-2):173-178

133. Hjertén S, Kiessling-Johansson M (1991) High-performance displacement electrophoresis in 0.025- to 0.050-mm capillaries coated with a polymer to suppress adsorption and electroendosmosis. J Chromatogr A 550:811-822

134. Administration FaD (2001) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD

135. Tábi T, Lohinai Z, Pálfi M, Levine M, Szökő E (2008) CE-LIF determination of salivary cadaverine and lysine concentration ratio as an indicator of lysine decarboxylase enzyme activity. Anal Bioanal Chem 391(2):647-51

136. Nouadje G, Rubie H, Chatelut E, Canal P, Nertz M, Puig P, Couderc F (1995) Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr A 717 (1-2):293-298

137. Tucci S, Rada P, Sepulveda MJ, Hernandez L (1997) Glutamate measured by 6-s resolution brain microdialysis: capillary electrophoretic and laser-induced fluorescence detection application. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 694 (2):343-349

138. Zhang L, Chen H, Hu S, Cheng J, Li Z, Shao M (1998) Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence-charge coupled device. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 707 (1-2):59-67

139. Guihen E, O'Connor WT (2010) Capillary and microchip electrophoresis in microdialysis: recent applications. Electrophoresis 31 (1):55-64

140. Poinsot V, Gavard P, Feurer B, Couderc F (2010) Recent advances in amino acid analysis by CE. Electrophoresis 31 (1):105-121

141. Takizawa K, Nakamura H (1998) Separation and Determination of Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Amino Acids by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. Anal Sci 14 (5):925-928

142. Arlt K, Brandt S, Kehr J (2001) Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr A 926 (2):319-325

143. Smith JT (1999) Recent advancements in amino acid analysis using capillary electrophoresis. Electrophoresis 20 (15-16):3078-3083

144. Poinsot V, Bayle C, Couderc F (2003) Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. Electrophoresis 24 (22-23):4047-4062

145. Poinsot V, Lacroix M, Maury D, Chataigne G, Feurer B, Couderc F (2006) Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. Electrophoresis 27 (1):176-194

146. Poinsot V, Rodat A, Gavard P, Feurer B, Couderc F (2008) Recent advances in amino acid analysis by CE. Electrophoresis 29 (1):207-223

147. Zinellu A, Sotgia S, Pisanu E, Scanu B, Sanna M, Franca Usai M, Chessa R, Deiana L, Carru C (2010) Quantification of neurotransmitter amino acids by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection in biological fluids. Anal Bioanal Chem 398 (5):1973-1978

148. Mulholland M, Hibbert DB (1997) Linearity and the limitations of least squares calibration. J Chromatogr A 762 (1-2):73-82

149. Singtoroj T, Tarning J, Annerberg A, Ashton M, Bergqvist Y, White NJ, Lindegardh N, Day NP (2006) A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. J Pharm Biomed Anal 41 (1):219-227

150. Mank AJ, Yeung ES (1995) Diode laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis after pre-column derivatization of amino acids and small peptides. J Chromatogr A 708 (2):309-321

151. Lalljie SPDS, P. (1995) Practical and quantitative aspects in the analysis of FITC and DTAF amino acid derivatives by capillary electrophoresis and LIF detection. Chromatogr 40:519-526

152. O'Brien KB, Miller RF, Bowser MT (2005) D-Serine uptake by isolated retinas is consistent with ASCT-mediated transport. Neurosci Lett 385 (1):58-63

153. Zhang LY, Tang XC, Sun MX (2005) Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 820 (2):211-219

154. Tseng H-M, Li Y, Barrett D (2007) Profiling of amine metabolites in human biofluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. Anal Bioanal Chem 388 (2):433-439

155. Hu S, Li PCH (2000) Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and fluorescent detection of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. J Chromatogr A 876 (1-2):183-191

156. Zhu X, Shaw PN, Pritchard J, Newbury J, Hunt EJ, Barrett DA (2005) Amino acid analysis by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection: application to nanolitre-volume biological samples from Arabidopsis thaliana and Myzus persicae. Electrophoresis 26 (4-5):911-919

157. Park YK, Choi K, Ahmed AY, AlOthman ZA, Chung DS (2010) Selective preconcentration of amino acids and peptides using single drop microextraction in-line coupled with capillary electrophoresis. J Chromatogr A 1217 (20):3357-3361

158. Zhao S, Feng Y, LeBlanc MH, Liu YM (2001) Determination of free aspartic acid enantiomers in rat brain by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 762 (1):97-101

159. Gu Y-S, Whang C-W (2002) Capillary electrophoresis of baclofen with argon-ion laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr A 972 (2):289-293

160. Chang SY, Wang F-Y (2004) Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique. J Chromatogr B 799 (2):265-270

161. Lin Y-F, Wang Y-C, Chang SY (2008) Capillary electrophoresis of aminoglycosides with argon-ion laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr A 1188 (2):331-333

162. Chen H-L, Zhang X-J, Qi S-D, Xu H-X, Sung JJY, Bian Z-X (2009) Simultaneous determination of glutamate and aspartate in rat periaqueductal gray matter microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. J Chromatogr B 877 (27):3248-3252

163. Patterson TA, Rose SP (1992) Memory in the chick: multiple cues, distinct brain locations. Behav Neurosci 106 (3):465-470

164. Izawa E, Zachar G, Aoki N, Koga K, Matsushima T (2002) Lesions of the ventro-medial basal ganglia impair the reinforcement but not the recall of memorized color discrimination in domestic chicks. Behav Brain Res 136 (2):405-414

165. Izawa E, Zachar G, Yanagihara S, Matsushima T (2003) Localized lesion of caudal part of lobus parolfactorius caused impulsive choice in the domestic chick: evolutionarily conserved function of ventral striatum. J Neurosci 23 (5):1894-1902

166. Adam AS, Csillag A (2006) Differential distribution of L-aspartate- and L-glutamate-immunoreactive structures in the arcopallium and medial striatum of the domestic chick (Gallus domesticus). J Comp Neur 498 (2):266-276

167. Herrera-Marschitz M, Goiny M, You ZB, Meana JJ, Pettersson E, Rodriguez-Puertas R, Xu ZQ, Terenius L, Hokfelt T, Ungerstedt U (1997) On the release of glutamate and aspartate in the basal ganglia of the rat: interactions with monoamines and neuropeptides. Neurosci Biobehav Rev 21 (4):489-495

168. Gruss M, Braun K (1996) Stimulus-evoked increase of glutamate in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum ventrale of domestic chick after auditory filial imprinting: an in vivo microdialysis study. J Neurochem 66 (3):1167-1173

169. D'Aniello A (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. Brain Res Rev 53 (2):215-234

170. Tsunoda M, Kato M, Fukushima T, Santa T, Homma H, Yanai H, Soga T, Imai K (1999) Determination of aspartic acid enantiomers in bio-samples by capillary electrophoresis. Biomed Chromatogr 13 (5):335-339

171. Song Y, Feng Y, LeBlanc MH, Zhao S, Liu YM (2006) Assay of trace D-amino acids in neural tissue samples by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Chem 78 (23):8121-8128

172. Kitagawa F, Otsuka K (2011) Recent progress in capillary electrophoretic analysis of amino acid enantiomers. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879 (29):3078-3095

173. Scriba GK (2012) Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. Chromatogr 75:815-838

174. Galaverna G, Corradini R, Dossena A, Marchelli R, Vecchio G (1997) Histamine-modified beta-cyclodextrins for the enantiomeric separation of dansyl-amino acids in capillary electrophoresis. Electrophoresis 18 (6):905-911

175. Rudaz S, Geiser L, Souverain S, Prat J, Veuthey JL (2005) Rapid stereoselective separations of amphetamine derivatives with highly sulfated gamma-cyclodextrin. Electrophoresis 26 (20):3910-3920

176. Chankvetadze B (2009) Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. Electrophoresis 30 Suppl 1:S211-221

177. Ivanyi R, Jicsinszky L, Juvancz Z, Roos N, Otta K, Szejtli J (2004) Influence of (hydroxy)alkylamino substituents on enantioseparation ability of single-isomer amino-beta-cyclodextrin derivatives in chiral capillary electrophoresis. Electrophoresis 25 (16):2675-2686

178. Fillet M, Hubert P, Crommen J (1997) Enantioseparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using mixtures of anionic and uncharged beta-cyclodextrins as chiral additives. Electrophoresis 18 (6):1013-1018

179. Lelievre F, Gareil P, Jardy A (1997) Selectivity in capillary electrophoresis: application to chiral separations with cyclodextrins. Anal Chem 69 (3):385-392

180. Tábi T, Magyar K, Szökő E (2003) Chiral characterization of deprenyl-N-oxide and other deprenyl metabolites by capillary electrophoresis using a dual cyclodextrin system in rat urine. Electrophoresis 24 (15):2665-2673

181. Jakubetz H, Juza M, Schurig V (1998) Dual chiral recognition system involving cyclodextrin derivatives in capillary electrophoresis II. Enhancement of enantioselectivity. Electrophoresis 19 (5):738-744

182. Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, Blaschke G (1999) Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioseparation selectivity in capillary electrophoresis. Electrophoresis 20 (13):2691-2697

183. Thorsen G, Bergquist J (2000) Chiral separation of amino acids in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 745 (2):389-397

184. Simo C, Barbas C, Cifuentes A (2002) Sensitive micellar electrokinetic chromatography-laser-induced fluorescence method to analyze chiral amino acids in orange juices. J Agric Food Chem 50 (19):5288-5293

185. Samakashvili S, Ibanez C, Simo C, Gil-Bea FJ, Winblad B, Cedazo-Minguez A, Cifuentes A (2011) Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. Electrophoresis 32 (19):2757-2764

186. Wang S, Fan L, Cui S (2009) CE-LIF chiral separation of aspartic acid and glutamic acid enantiomers using human serum albumin and sodium cholate as dual selectors. J Sep Sci 32 (18):3184-3190

9 Saját közlemények

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Wagner Zs, Tábi T, Zachar G, Csillag A, Szökő É. (2011) Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE-LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. Electrophoresis, 32: 2816–2822. **IF: 3,303**

Zachar G, **Wagner Zs**, Tábi T, Bálint E, Szökő É, Csillag A. (2012) Differential Changes of Extracellular Aspartate and Glutamate in the Striatum of Domestic Chicken Evoked by High Potassium or Distress: An In Vivo Microdialysis Study. Neurochem Res, 37: 1730-1737. **IF: 2,24**

Wagner Zs, Tábi T, Jakó T, Zachar G, Csillag A, Szökő É (2012) Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system. Anal Bioanal Chem, 404: 2363-2368. **IF: 3,778**

Egyéb közlemények

Balogh B, Jójárt B, **Wagner Zs**, Kovács P, Máté G, Gyires K, Zádori Z, Falkay G, Márki Á, Viskolcz B, Mátyus P. (2007) 3D QSAR models for α_{2A}-adrenoceptor agonists. Neurochem Int, 51: 268-276. **IF: 2,975**

10 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szökő Éva** Professzor Asszonynak, aki kezdetektől fogva támogatott, és tanácsaival folyamatosan irányította kutatói munkámat.

Köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György** Professzor Úrnak a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Köszönettel tartozom **Dr. Tábi Tamás** kollegámnak, a kapilláris elektroforézis kísérletekben nyújtott segítségéért, valamint számos értékes gyakorlati tanácsáért és javaslatáért.

Köszönettel tartozom továbbá a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak, **Dr. Zachar Gergelynek** és **Dr. Csillag András** Professzor Úrnak a mikrodialízis kísérletekért, valamint a közös munkánkba vetett töretlen bizalmukat.

Köszönettel tartozom a **Gyógyszerhatástani Intézet,** valamint a **NET Központi Izotóp Labor** munkatársainak szakmai és baráti segítségükkel járultak hozzá, hogy munkámat színvonalas szakmai környezetben végezhessem.

Köszönettel tartozom az **Aesculap Alapítványnak**, valamint a **Richter Gedeon Centenáriumi Alapítványának** anyagi támogatásukért.

Köszönettel tartozom **családomnak**, akik odaadóan támogatták elképzeléseim megvalósítását, biztos hátteret nyújtottak tudományos munkámhoz, és ezen dolgozat létrejöttéhez.