

Bioanalitikai kihívások a toxikológiában:
Innovatív megoldások a xenobiotikumok és metabolitjaik
bioanalíziséhez

Doktori értekezés
Széles Aliz

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Gyógyszertudományok és Egészségügyi Technológiák Tagozat



Témavezető: Dr. Monostory Katalin, DSc
Konzulens / Vállalati szakértő: Dr. Renkecz Tibor, PhD

Hivatalos Bírálók: Dr. Szabó Pál, PhD
Dr. Tóthfalusi László, DSc

Komplex vizsgabizottság elnöke:
Dr. Benyó Zoltán, DSc

Komplex vizsgabizottság tagjai:
Dr. Ludányi Krisztina, PhD
Dr. Tóth Blanka, PhD

Budapest
2026

1. Bevezetés

A kémiai biztonságértékelés során alapvető fontosságú a különböző anyagok (ipari vegyületek, endogén biomarkerek, gyógyszerek) expozíciójának és toxikokinetikájának pontos meghatározása a szervezetben. Mivel a vizsgálandó vegyületek szerkezete és fiziko-kémiai tulajdonságai nagy változatosságot mutatnak, a bioanalitikai módszereket a meghatározandó komponensre, és mintamátrixra kell szabni. A disszertáció célja olyan célzott bioanalitikai módszerek fejlesztése és validálása volt, amelyek megoldást nyújtanak három eltérő vegyületcsoportba tartozó anyagok analitikai kihívásaira:

1. Reaktív ipari vegyületek (izopropil-glicidil-éter - IPGE): Ezen anyagok mérését megnehezíti a reakcióképességük (bomlékonyság), a kis molekulatömegük, a kromofór csoportok hiánya, és az alacsony ionizációs hatékonyságuk a tömegspektrometriás vizsgálatok során.

2. Endogén biomarkerek (protoporfirin IX): Az endogén (a szervezetben keletkezett) jelenlét miatt a fő kihívást a valódi, analitmentes biológiai mátrix hiánya, valamint ezen példa esetében a mérendő molekula fényérzékenysége jelenti.

3. Gyógyszerek (gentamicin, amoxicillin, klavulánsav, paracetamol, doxorubicin, izoprenalin): A szervspecifikus (pl. máj-, vese-, szív-) toxicitási modellek vizsgálata során elengedhetetlen az akár toxikus dózistartományokhoz rendelhető koncentrációértékek gyors, specifikus és robusztus LC-MS/MS alapú bioanalitikai meghatározása komplex mátrixokban (plazma és vizelet).

2. Célkitűzés

- I. Izopropil-glicidil-éter toxikokinetikai jellemzése (ipari vegyianyag)
 - a. Érzékeny LC-MS/MS módszer kidolgozása és validálása az izopropil-glicidil-éter mennyiségi meghatározására patkányplazmában.
 - b. Az izopropil-glicidil-éter toxikokinetikai profiljának jellemzése és potenciális metabolitjainak azonosítása.
- II. Protoporfirin IX bioanalízise (endogén biomarker)
 - a. Szelektív és érzékeny HPLC-FLD módszer kifejlesztése a protoporfirin IX mennyiségi meghatározására biológiai mintákban, a protoporfirin IX endogén jelenléte által a plazmában okozott analitikai kihívások kezelésére.
 - b. A módszer alkalmazhatóságának igazolása a patkányokban, 5-aminolevulinsav által kiváltott protoporfirin IX képződés kinetikájának monitorozásával.
- III. Toxicitási vizsgálatok bioanalitikai támogatása
 - a. Analitikai módszerek kidolgozása és validálása modellvegyületek meghatározására szerszpecifikus toxicitási vizsgálatokban (gentamicin, amoxicillin és klavulánsav, paracetamol, doxorubicin, izoprenalin).

3. Módszerek

3.1. Az izopropil-glicidil-éter (IPGE) vizsgálata

Analitikai technika: A méréseket folyadékkromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS) végeztük. Az IPGE alacsony ionizációs hatékonyságát egy innovatív, plusz mintaelőkészítési lépéseket nem igénylő, ionforráson belüli származékképzési eljárással (gázfázisú Meerwein-reakció) küszöböltük ki, atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (APCI) forrást alkalmazva. Az zárójelben szereplő ionátmenetek alkalmaztuk az IPGE [157.90 $\rightarrow$ 116.10 m/z] és a belső sztenderd (IS) - *terc*-butil glicidil éter [172.00 $\rightarrow$ 116.10 m/z] esetében.

Minta-előkészítés: A patkányplazma mintákból a fehérjét acetonitrillel csaptuk ki, majd a felülúszót közvetlenül injektáltuk a rendszerbe.

Toxikokinetikai vizsgálat: Han Wistar patkányoknak (hím és nőstény) egyszeri *per os* dózisban (1000, 1500 és 2000 mg/kg) adtuk az IPGE-t. A vérmintákat a dózis beadása előtt, majd utána 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, és 24 óra időpontokban vettük. A toxikokinetikai paramétereket non-kompartmentális analízissel a Phoenix WinNonlin szoftver segítségével számítottuk ki.

3.2. A protoporfirin IX (PPIX) vizsgálata

Analitikai technika: A PPIX méréséhez nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát alkalmaztunk fluoreszcens detektálással (HPLC-FLD). A gerjesztési hullámhossz 400 nm, az emissziós hullámhossz 630 nm volt.

Helyettesítő mátrix (surrogate matrix) megközelítés: Az endogén jelenlét okozta nehézségek áthidalására fotodegradációnak alávetett patkányplazmát használtunk vak mátrixként a kalibráló és minőség-ellenőrző mintákhoz az ICH M10 irányelv alapján. A módszer megfelelőségét párhuzamossági vizsgálattal (parallelism) igazoltuk.

In vivo alkalmazás: A módszert 5-aminolevulinsavval (5-ALA) egyszer (100 mg/kg) *per os* kezelt hím patkányok plazmamintáin teszteltük, ahol az 5-ALA által indukált PPIX kinetikáját követtük nyomon.

3.3. Modell-gyógyszerhatóanyagok bioanalízise

Célzott módszerfejlesztés: Hat különböző hatóanyag (gentamicin, amoxicillin, klavulánsav, paracetamol, doxorubicin és izoprenalin) mérésére fejlesztettünk gyorsított validálással LC-MS/MS módszereket. A paracetamol esetében szemikvantitatív módszer is készült a metabolitok nyomon követésére.

Mátrixok: A kísérletek során patkány májsejtkultúrát, patkány plazmát és patkány vizeletet vizsgáltunk.

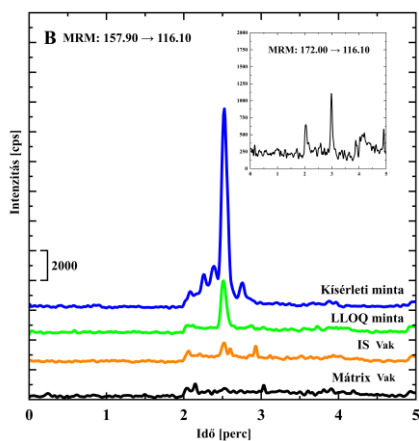
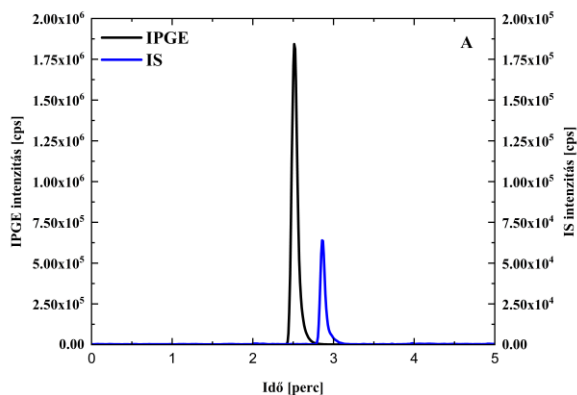
Mérési platform: Elektroporlasztásos ionizációt (ESI) és hármaskvadrupol analizátort alkalmaztunk, szükség esetén fehérjekicsapásos minta-előkészítés után.

4. Eredmények

4.1 Az izopropil-glicidil-éter (IPGE) bioanalitikai és toxikokinetikai vizsgálata

Az IPGE kimutatására kidolgozott LC-APCI-MS/MS módszer az ionforrásban történő származékképzésnek (Meerwein reakció) köszönhetően rendkívül alacsony, 0,01 µg/mL-nek megfelelő mennyiségi meghatározási alsó határt (LLOQ) tett lehetővé, 0,01 - 10 µg/mL lineáris tartomány mellett. A kiindulási módszerhez képest 500-szoros érzékenység növekedést jelentett. A validálás során az ICH M10 előírásainak megfelelően igazoltuk a módszer pontosságát, precizitását és a minta stabilitását különböző körülmények között.

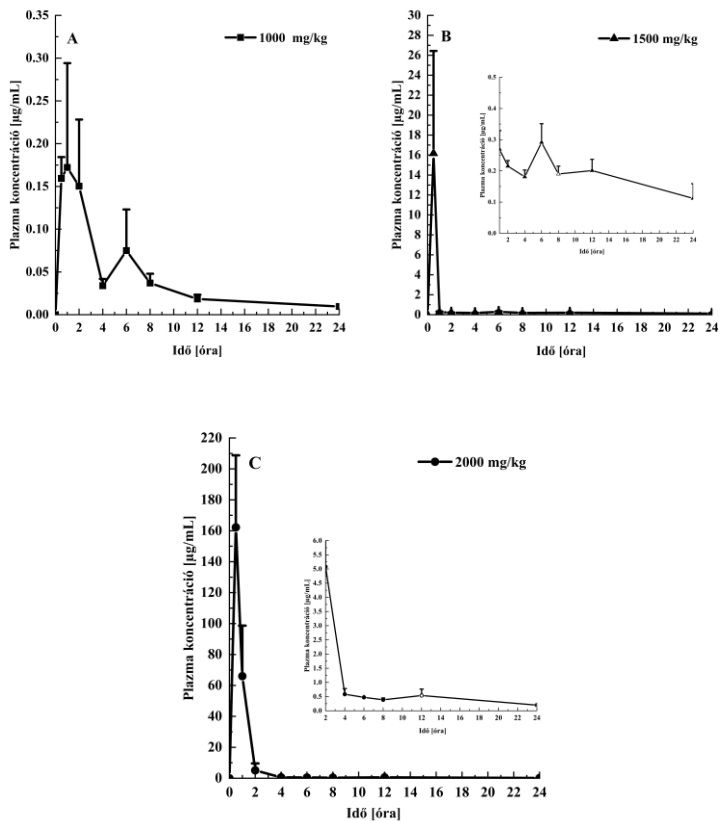
Az *in vivo* vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az IPGE gyorsan felszívódik ($T_{\max} = 0,5 \text{ h} - 1 \text{ h}$), és a plazmából lassan ürül ki. Megfigyeltük, hogy a dózis emelésével ($1000 \rightarrow 1500 \rightarrow 2000 \text{ mg/kg}$) a szisztémás expozíció nem-lineárisan növekszik, ami a metabolikus útvonalak telítődésére utal. A kvalitatív profilalkotás során 7 különböző lehetséges metabolitot detektáltunk (3-izopropoxi-2-hidroxi-1-propanol [M1], IPGE szulfát- [M3] és glükuronid-konjugátuma [M4], 3-izopropoxi-2-hidroxipropionsav [M5], *O*-izopropil-*N*-acetilszerin [M6], *O*-[hidroxi-izopropil]-*N*-acetilszerin [M7], IPGE glutationkonjugátuma [M11]), ezzel információt szerezve a vegyület eliminációs útvonalairól.



1. ábra (T 1):

A) Az IPGE [157,90 → 116,10 m/z] és az IS [172,00 → 116,10 m/z] reprezentatív MRM kromatogramjai ULOQ mintában: IPGE (fekete), IS (kék).

B) Az IPGE [157,90 → 116,10 m/z] reprezentatív MRM kromatogramjai: mátrix blank (fekete), IS blank (narancssárga), LLOQ minta (zöld) és egy valós vizsgálati minta (kék), a beillesztés: az IS [172,00 → 116,10 m/z] MRM kromatogramja a mátrix vak mintában az IS szelektivitásának igazolására (fekete)

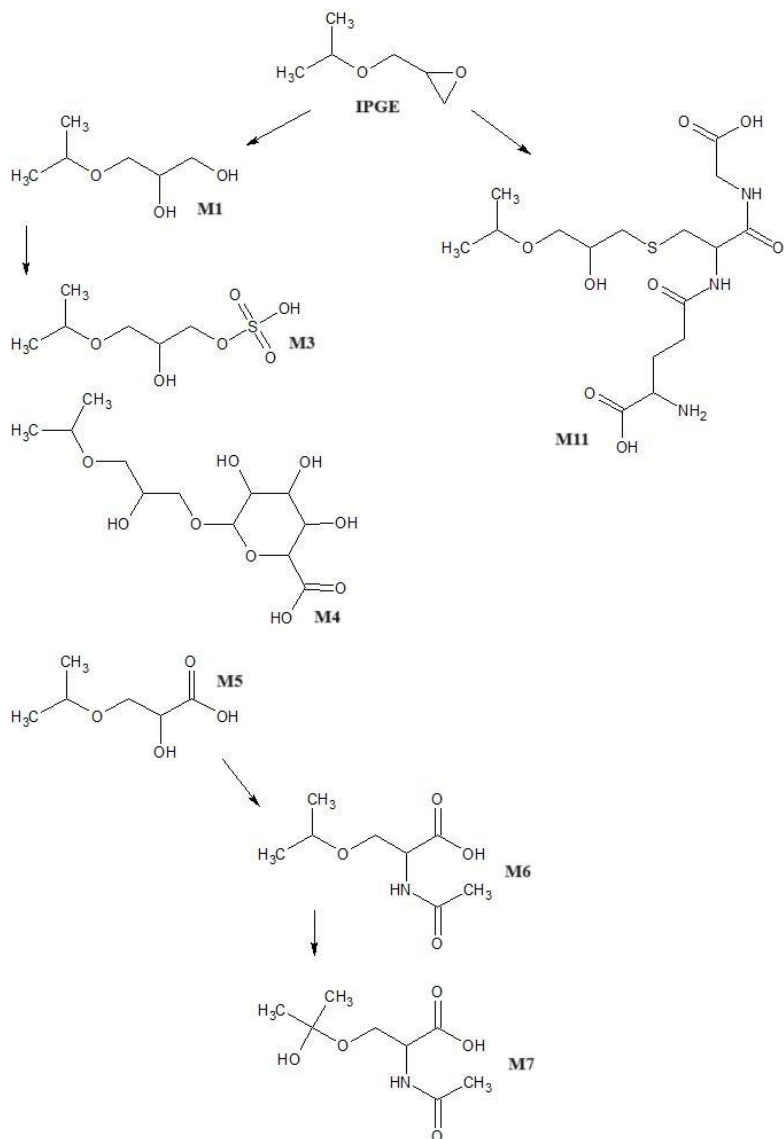


2. ábra (T 1):

Kinetikai görbék patkányokon végzett kísérlet során IPGE egyszeri *per os* adagolása után három dózisszinten

(A: 1000 mg/kg; B: 1500 mg/kg; C: 2000 mg/kg)

A pontok 3-6 állat átlagos plazmakoncentrációit jelölik, míg a „bajuszvonalak” a SEM értékeket jelölik. A beillesztett ábrák a terminális eliminációs fázist nagyítva mutatják, az üres szimbólum az adott pont terminális eliminációs fázisra történő lineáris illesztéséből való kizárását jelöli.



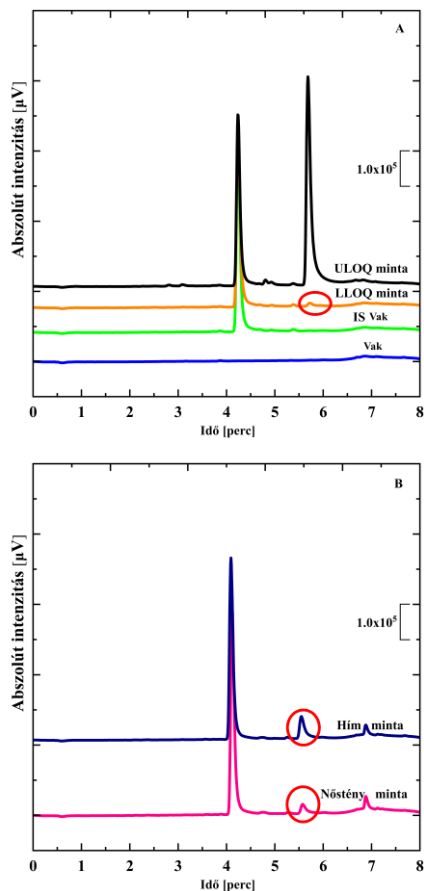
3. ábra (T 1):

Az IPGE feltételezett metabolikus útvonala patkányban

4.2 A protoporfirin IX (PPIX) mérése helyettesítő mátrix módszerrel

A fotodegradációval kezelt, és így előállt helyettesítő mátrix alkalmazásával sikeresen kiküszöböltük az endogén háttér okozta nehézségeket. A patkány plazmát minimum 4 órán keresztül világítottuk be asztali lámpa (IKEA-SOLHETTA LED light bulb, 2700 K, 470 lm) fényénél, mert ellenőrző méréseink alapján a 4 óránál rövidebb időtartam nem távolította el megfelelően a PPIX-et. A HPLC-FLD módszer validálása során a párhuzamossági vizsgálat (parallelism) igazolta, hogy a helyettesítő mátrixban készült kalibráció torzítatlan eredményt adott a vizsgálati minták analit koncentrációjára.

A módszer alkalmazhatóságát 5-ALA-val kezelt patkányokon tesztelve vizsgáltuk, követve a képződött PPIX kinetikáját. Az eredmények igazolták, hogy a kifejlesztett eljárás alkalmas lehet a hemoglobin-bioszintézis zavarainak vagy a fotodinámiás terápiás modelleknek a nyomon követésére.

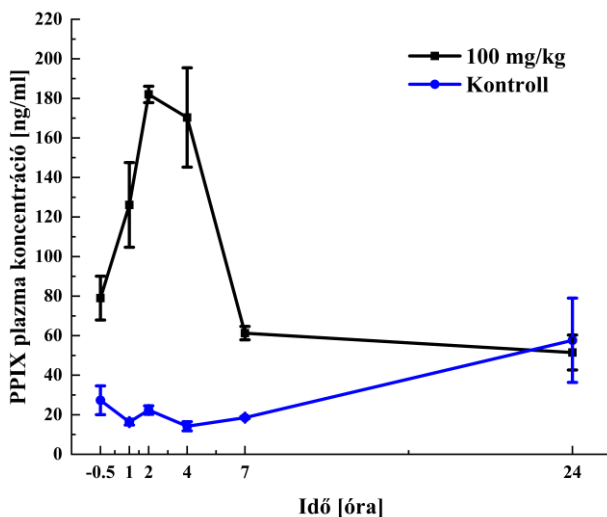


4. ábra (T 2):

A protoporfirin IX reprezentatív, 630 nm-en rögzített HPLC-FLD kromatogramjai helyettesítő és autentikus mátrixokban.

A) Vak minta helyettesítő mátrixban (kék), IS vak minta helyettesítő mátrixban (zöld), LLOQ minta (10 ng/ml) helyettesítő mátrixban, piros körrel az analitsúcs (narancssárga), ULOQ minta (700 ng/ml) helyettesítő mátrixban (fekete)

B) Egy nőstény patkánytól származó plazmaminta autentikus mátrixban (rózsaszín), egy him patkánytól származó plazmaminta autentikus mátrixban (sötétkék), mindkettő piros körrel az analitsúcs.



5. ábra (T 2):

Protoporfirin IX kinetikai görbék kontroll és 5-aminolevulinsavval kezelt patkányokban

A protoporfirin IX plazmakoncentráció – idő görbéi hím patkányokban egyszeri *per os* 5-aminolevulinsav kezelés után (átlagértékek SEM-mel). Fekete vonal négyzetekkel: kezelt csoport (100 mg/kg 5-aminolevulinsavat kapott); kék vonal körökkel: kontrollcsoport (csak vivőanyagot kapott).

4.3. Modell-gyógyszerhatóanyagok célzott bioanalízise

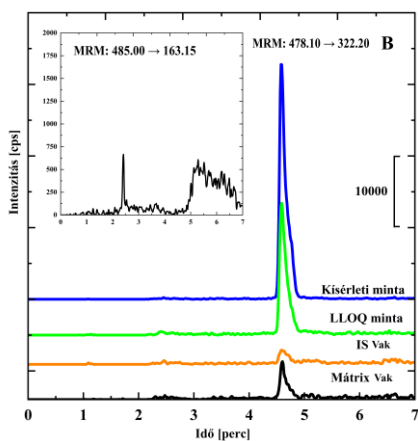
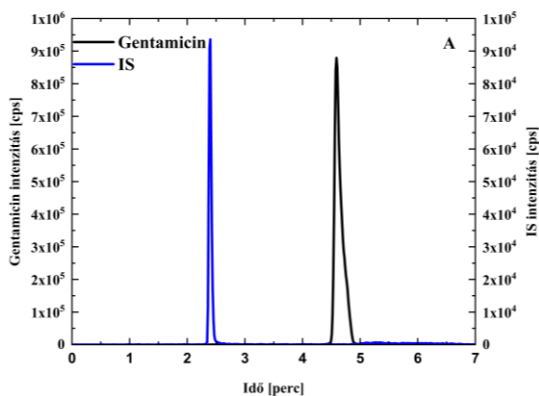
Sikeresen validáltuk a bioanalitikai módszereket mind a hat vizsgált gyógyszerhatóanyagra (gentamicin, amoxicillin, klavulánsav, paracetamol, doxorubicin, izoprenalin). A módszerek robusztusnak bizonyultak komplex biológiai mátrixokban (sejtkultúra, vér, vizelet) is.

Az eredmények támogatták az extracelluláris vezikulákhoz (EV) köthető toxicitási biomarkerek kutatását, igazolva, hogy a kísérleti modellekben alkalmazott dózisok valóban elérték-e a célszerveken a kiváltandó hatást.

1. Táblázat:

Gyógyszerhatóanyagokkal végzett módszerek mérési tartományainak megadása a vizsgált biológiai mátrixokban

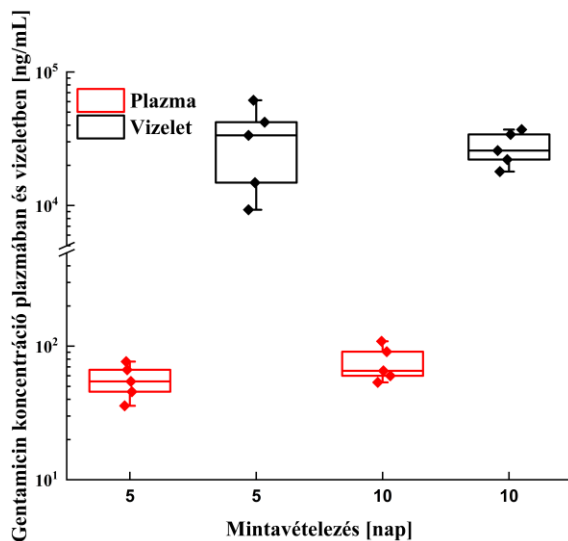
Kísérleti anyag neve	Mérési tartomány	Biológiai mátrix
Gentamicin	20 - 2000 ng/mL	plazma
Amoxicillin	0,5 -500 µg/mL	májsejtkultúra
Klavulánsav	0,5 -500 µg/mL	májsejtkultúra
Paracetamol	0,1 - 100 µg/mL	májsejtkultúra és plazma
Doxorubicin	1 - 1000 ng/mL	plazma
Izoprenalin	5 - 1000 ng/mL	plazma és vizelet



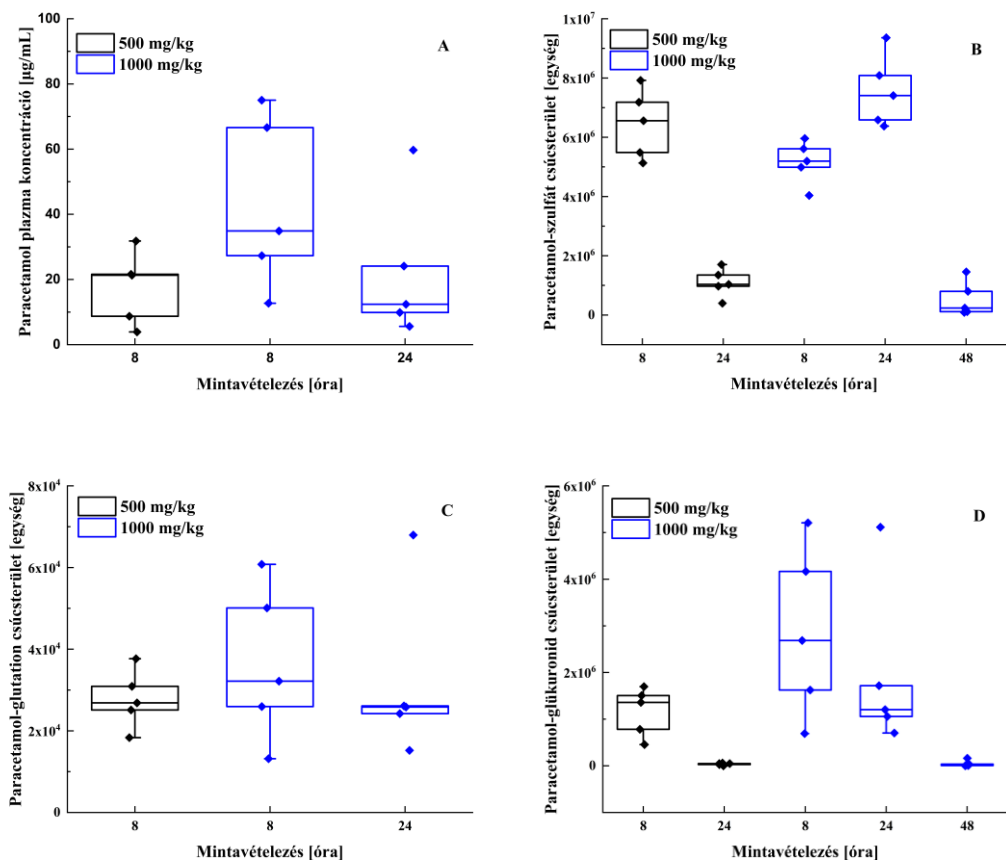
6. ábra:

A) A gentamicin [478,10 → 322,20 m/z] és az IS [485,00 → 163,15 m/z] reprezentatív MRM kromatogramjai ULOQ plazma mintában: analit (fekete), IS (kék).

B) A gentamicin analit [478,10 → 322,20 m/z] reprezentatív MRM kromatogramjai: mátrix vak (fekete), IS vak (narancssárga), LLOQ minta (zöld) és egy valós vizsgálati minta (kék), beillesztés: az IS [485,00 → 163,15 m/z] MRM kromatogramja a mátrix vak mintában az IS szelektivitásának igazolására (fekete), mind plazma mintában.

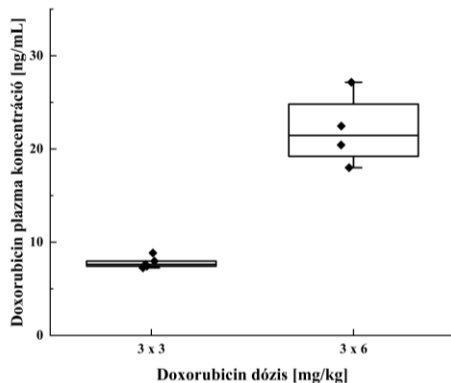


7. ábra: A gentamicin koncentrációja patkány plazmában és vizeletben, a nefrotoxicitási vizsgálat során a 120 mg/testtömeg-kg napi dózis intravénás beadás utáni 5. és 10. napon vett mintákban (N=5). A dobozdiagramok a minimum, az első kvartilis (Q1), a medián, a harmadik kvartilis (Q3) és a maximum értékeket jelölik. Az egyes adatpontokat rombuszok jelölik.



8. ábra:

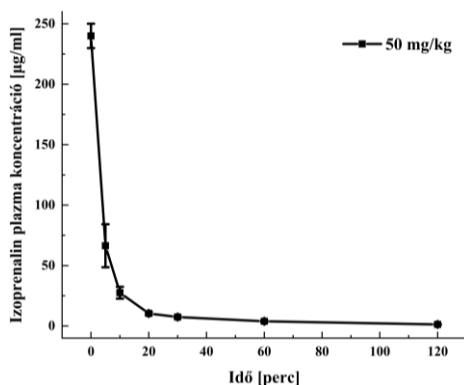
A paracetamol (A) és metabolitjainak (B: paracetamol-szulfát, C: paracetamol-glutation, D: paracetamol-glükuronid) koncentrációi patkány plazmájában 500 és 1000 mg/kg paracetamol *per os* adagolása után (N=5 dóziscsoportonként). A dobozdiagramok a minimum, az első kvartilis (Q1), a medián, a harmadik kvartilis (Q3) és a maximum értékeket jelölik. Az egyes adatpontokat rombuszok jelölik.



9. ábra:

Doxorubicin koncentrációk patkány plazmában kardiotoxicitási vizsgálat során

Doxorubicin plazmakoncentrációk patkányokban ismételt adagolású 3 és 6 mg/kg-os dózisok után (kumulatív dózisok 9 és 18 mg/kg). A plazma mintákat a 12. napon (az utolsó kezelés után 4 nappal) gyűjtöttük. A dobozdiagramok a minimum, az első kvartilis (Q1), a medián, a harmadik kvartilis (Q3) és a maximum értékeket jelölik. Az egyes adatpontokat rombuszok jelölik.



10. ábra:

Izoprenalin kinetikai görbe hím patkányokban

Az izoprenalin kinetikai görbét hím patkányokban határoztuk meg egyetlen 50 mg/kg-os intravénás dózis beadását követően (átlagértékek SEM-mel).

5. Következtetések

Kidolgoztunk és validáltunk egy érzékeny LC-APCI-MS/MS módszert az izopropil-glicidil-éter (IPGE) patkányplazmából történő mennyiségi meghatározására. A mérendő molekula gyenge ionizációs hatékonyságát egy új, ionforrásban lejátszódó származékképzéses stratégiával (gázfázisú Meerwein-reakció) küzdöttük le, ami 500-szoros érzékenységnövekedést eredményezett (LLOQ: 0.01 µg/mL).

A validált módszer segítségével elsőként jellemeztük az IPGE toxikokinetikai profilját *in vivo* patkánymodellben. Eredményeink rávilágítottak a vegyület nem-lineáris toxikokinetikai viselkedésére és a metabolikus útvonalak telítődésére magasabb dózisoknál. Továbbá kvalitatív profilalkotással hét lehetséges metabolitot detektáltunk, szerkezetükből arra következtethettünk, hogy az IPGE eliminációját elsősorban az epoxidgyűrű hidrolízise és a glutation-konjugáció hajtja.

Kifejlesztettünk és az ICH M10 irányelveknek megfelelően validáltunk egy szelektív HPLC-FLD módszert az endogén protoporfirin IX kvantitatív meghatározására. Az analitmentes biológiai mátrix hiányának problémáját az eredeti plazma mátrixból fotodegradációs kezeléssel előállított helyettesítő plazma mátrix (surrogate matrix) alkalmazásával oldottuk meg, és igazoltuk a párhuzamosságot (parallelism) az eredeti és a helyettesítő mátrix között.

A protoporfirin IX meghatározására szolgáló módszert sikeresen alkalmaztuk egy *in vivo* kísérletben, nyomon követve az 5-aminolevulinsav által indukált protoporfirin IX kinetikáját patkányokban.

Robusztus, "fit-for-purpose" bioanalitikai módszereket dolgoztunk ki és validáltunk hat modell-gyógyszerhatóanyag (gentamicin, amoxicillin, klavulánsav, paracetamol, doxorubicin és izoprenalin) *in vitro* és *in vivo* szerszpecifikus toxicitási modelljeinek támogatására. Ezzel a további információt biztosító munkával sikeresen igazoltuk a kísérleti rendszerekben elért toxikus expozíciót jellemző koncentrációszinteket, hozzájárulva az extracelluláris vezikula-asszociált toxicitási biomarkerek kutatásához.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

(T 1)

Szerzők: Széles Aliz, Schöll Károly, Hirka Gábor, Monostory Katalin, Renkecz Tibor

Cím: Toxicokinetic Characterization of Isopropyl Glycidyl Ether in Rat by a Validated LC-APCI-MS/MS Method Using In-Source Derivatization

Folyóirat: Chemical Research in Toxicology

Dátum: Online elérhető 2025. március 5-én (38. kötet / 3. szám, 380-391, 2025. március 17.)

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.4c00376>

IF: 4.1

(T 2)

Szerzők: Széles Aliz, Schöll Károly, Hirka Gábor, Monostory Katalin, Renkecz Tibor

Cím: Validation and sample bioanalysis of protoporphyrin IX in rat plasma by the surrogate matrix approach

Folyóirat: Journal of Chromatography B

Dátum: Online elérhető 2025. szeptember 22-én (1267. kötet, 2025. december 15.)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2025.124799>

IF: 2.5

A disszertációhoz nem kapcsolódó, egyéb publikáció:

(N 1)

Szerzők: Kirchkeszner Csaba, Petrovics Noémi, Széles Aliz, Koshman Jelena, Szabó Bálint Sámuel, Nyíri Zoltán, Novák Márton, Rikker Tamás, Eke Zsuzsanna

Cím: Comprehensive study of retention influencing gas chromatographic parameters affecting linear retention indices

Folyóirat: Journal of Chromatography A

Dátum: online elérhető 2024. június 5. (1729. évfolyam, 2024. augusztus 16.)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465052>

IF: 4.0

ΣIF: 10.6

A disszertációhoz kapcsolódó szabadalmi bejelentés:

(P 1)

Cím: Identification of glycidyl ethers in biological and enviromental samples using LC-APCI_MS/MS

Feltalálók: Széles Aliz, Monostory Katalin, Renkecz Tibor, Schöll Károly, Hirka Gábor

Magyar szabadalmi bejelentés, ügyszám: P2500018, iktatási szám: 311174000-20250115-0800-000953.

PCT szabadalmi bejelentés, közbenső bejelentési szám: PCT/HU2026/050002.

7. Finanszírozás

Ez a projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával valósult meg, a 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00021 pályázati program finanszírozásával.

A kulturális és innovációs minisztérium 2024-2.1.2-EKÖP-KDP-2024-00002 kódszámú egyetemi kutatói ösztöndíj programjának a nemzeti kutatási, fejlesztési és innovációs alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

További finanszírozást a Semmelweis 250+ Kiválósági Ösztöndíj biztosított.