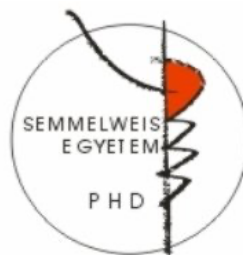


Biológiailag aktív vegyületek vizsgálata elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolt tömegspektrometriás technikákkal

Doktori tézisek

Virág Dávid

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Konzulens: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kéki Sándor, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Örfi László, Ph.D., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben számottevően megnőtt az igény új, főként molekuláris biomarkerek azonosítására. Ennek egyik fontos oka, hogy egyre jelentősebb szerephez jutnak az új gyógyszerek klinikai kipróbálása során, különböző egészségügyi beavatkozások eredményességének monitorozásában, illetve betegségek szűrésében, diagnosztikájában, valamint a progresszió vizsgálatában. A biomarkerek iránt megnőtt érdeklődés másik fontos tényezője, hogy a műszeres analitika számottevő fejlődésen ment keresztül az elmúlt időszakban. Ez különösen igaz a folyadékromatográfiával kapcsol tömegspektrometriára (LC-MS), amely minden eddiginél nagyobb érzékenységgel és specificitással biztosít lehetőséget a potenciális biomarkerek azonosítására, kvantitatív meghatározására és szerkezetfelfedezésére nagy áteresztőképesség mellett, és amely az ilyen irányú kutatások elsődleges technikájává vált.

A migrén egy elsődleges fejfájási rendellenesség, melynek globális prevalenciája 15-18%. Embereken és állatokon végzett kutatások alátámasztják, hogy az agy és a vérplazma alacsony interiktális (a rohamok közötti időszakban mérhető) szerotonin szintje összefüggésbe hozható a trigeminovaszkuláris rendszer fokozott érzékenységgel, mely hozzájárulhat az ismételt migrénes rohamok kialakulásához. Az agy szerotoninkoncentrációját azonban befolyásolja előanyaga, a triptofán, illetve a nagy neutrális aminosavak (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin) vérplazma koncentrációja, melyek versengenek a vér-agy gát L-típusú aminosav transzporterének elfoglalásáért, bár a folyamat pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert, felfedezéséhez további - az említett komponensek plazmaszintjének meghatározására irányuló - klinikai kutatások szükségesek. Az Európai Gyógyszerügynökség (*European Medicines Agency*, EMA), valamint az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (*Food and Drug Administration*, FDA) vonatkozó irányelvei részletesen szabályozzák a kismolekulás gyógyszerek, illetve azok metabolitjainak bioanalitikai módszervalidálását, azonban kevés támpontot szolgáltatnak endogén

anyagok meghatározására, melyek esetén nem áll rendelkezésre analitmentes, ún. blank biológiai mátrix a kalibrációs és minőségellenőrző (*quality control*, QC) minták készítéséhez. Tekintettel a biomarkerkutatók tényérésére, egyre nagyobb igény jelentkezik az ún. „*fit for purpose*” kvantitálási/validálási megközelítésekre, melyek lehetővé teszik az endogén molekulák validált módon történő meghatározását. A szakirodalom négy stratégiát különböztet meg: a standard addíció, a háttérkivonás, a helyettesítő analit és a helyettesítő mátrix módszerét, melyek kiválasztását nagyban befolyásolja az adott analitikai kihívás.

A *melanoma malignum* a bőr pigmenttermelő sejtjeiből kiinduló daganatos megbetegedés, melynek incidenciája világszerte meredeken emelkedik az elmúlt öt évtizedben. A betegség felel a bőrrákból adódó halálozások több, mint 50%-áért, mely összefügg a melanoma rendkívüli metasztatikus potenciáljával, kiemelve a korai felismerés fontosságát. A betegség szűrése dermatoszkópos, diagnózisa kórszövettani vizsgálatokkal történik. Nem egyértelmű diagnózis esetén segítségül hívhatnak immunhisztokémiai markereket is (HMB45 antigén, Melan-A fehérje, mikroftalmia-asszociált transzkripciófaktor), melyek nem jelentenek kevésbé invazív alternatívát a kórszövettani vizsgálatokhoz képest, továbbá alacsony specifikusságuk. A betegségben két szérumbiomarker érhető el, a laktát dehidrogenáz, illetve az S100B kalciumköti fehérje. Utóbbi jobban korrelál a klinikai stádiummal, de alacsony érzékenysége miatt nem alkalmas szűrési vagy diagnosztikus célokra, ezért jelentős igény mutatkozik új, releváns diagnosztikus értékkel bíró szérumbiomarkerek azonosítására. Az α 1-savanyú glikoprotein (AGP) egy 41-43 kDa közötti molekulatömegű akutfázisfehérje. A molekula 183 aminosavból álló peptidláncának 15-ös, 38-as, 54-es, 75-ös és 85-ös pozíciójában található aszparagin aminosavakhoz komplex szerkezetű oligoszacharid oldalláncok kapcsolódnak, nagyfokú mikroheterogenitást kölcsönözve a glikoproteineknek. Az AGP-vel kapcsolatban általános megfigyelés, hogy rákos betegségekben megemelkedik szérumbiomarként, illetve megváltozik a molekulára jellemző glikozilációs mintázat, ezért a glikoziláció alapú biomarkerkutatók gyakori modellvegyülete.

Célkitűzések

Jelen doktori értekezés két, egymástól független, a molekuláris biomarker-felfedezés koncepciója mentén mégis egységet képező kutatási projektet mutat be. Munkám első része a migrén patomechanizmusában potenciálisan szerepet játszó, 8 kismolekulás marker vizsgálatára irányul, melybe neurotranszmitterek (szerotonin), aminosavak (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin, triptofán), illetve egy triptofán anyagcsertermék (kinurenin) tartozik. Egy átfogó klinikai kutatás keretében doktori munkám célkitűzése, hogy kifejlesszek egy LC-MS/MS alapú validált bioanalitikai módszert az említett anyagok egymás melletti gyors meghatározására, relatíve kis mennyiségű vérplazmából (~1,5 ml). Az analitok endogén jellegéből adódóan egy olyan *fit for purpose* kvantitálási/validálási stratégia adaptálása szükséges, mely lehetővé teszi a vonatkozó EMA és FDA irányelvekben foglalt kritériumok kielégítését. További célkitűzés volt, hogy a módszert sikerrel alkalmazzam 800 klinikai minta koncentrációinak meghatározására.

Doktori munkám második része az AGP biomarker jellegének vizsgálatára irányul malignus melanomában, mely betegségnek jelenleg nincs szűrési és diagnosztikus célú szérumbiomarkere. Ennek keretében célom egy hidrofil kölcsönhatású kromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszer (HILIC-MS/MS) fejlesztése az AGP enzimatis úton felszabadított, és antranilsavval derivatizált oligoszacharid oldalláncainak vizsgálatára. A módszerrel szemben elvárás, hogy az adott monoszacharid-összetétellel jellemezhető glikánok vizsgálata mellett nagy hangsúlyt fektessen az izomerek kromatográfiás elválasztására is, lehetővé téve az eddigi módszereknél nagyobb számú AGP glikánizomer azonosítását. A módszer alkalmazásával *high-risk* melanomás betegek és egészséges önkéntesek mintáit vizsgálom annak érdekében, hogy azonosítsam azokat a szerkezeti változásokat, melyek a szérumbiomarkere glikozilációs mintázatában mennek végbe a betegség hatására, és az eredményeket értékeljem biomarkerként való alkalmazhatóság szempontjából. További cél, hogy az eredményeket kifejezzem biomarkerek értékelésére szolgáló

teljesítményjelzőkkel (érzékenység, specifikusság, pozitív prediktív érték, negatív prediktív érték) és a vizsgált populációban összehasonlítom az S100B teljesítményével, mely a melanoma legelterjedtebb, rutin szerológiai markere. Az AGP glikozilációs profiljára irányuló vizsgálatok végső célkitűzése annak a döntésnek a támogatása, hogy a vizsgálati eredmények alapján érdemes-e további kutatásokat végezni, melyek a biomarker validálására és széleskörű alkalmazására irányulnak.

Módszerek

Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából

A nyolc analithoz két stabil izotóp jelzett belső standardot (BST) alkalmaztam az extrakciós hatásfokból és mátrixhatásból adódó potenciális mérési hibák kiküszöbölésére. Az alifás aminosavakhoz (valin, leucin, izoleucin) leucin-5,5,5-d₃-at (Leu-d₃), az aromás komponensekhez (fenilalanin, tirozin, triptofán, szerotonin, kinurenin) pedig tirozin-(fenil-3,5-d₂)-t (Tir-d₂) használtam. A blank vérplazma helyettesítésére 4% humán szérum albumin (HSA) tartalmú foszfát pufferes sóoldatot (PBS) állítottam elő. A mintaelőkészítés fehérjekicsapással történt. A kalibrációs és QC minták készítéséhez 900 µl helyettesítő mátrixhoz 100 µl standard oldatot, és 20 µl BST keveréket adtam. A vizsgálati minták esetén 900 µl plazmához 100 µl ultratiszta (MQ) vizet és 20 µl BST mixet pipettáztam. Ezt követően a mintákhoz 200 µl trifluoecetsavat (TFA) adtam fehérjekicsapás céljából, 10 másodpercig rázattam vortex készülékkel, majd centrifugáltam (10 perc, 4 °C, 4000 rpm). A keletkező felülúszóból 150 µl-t mintatartóba pipettáztam, és 5 µl-t injektáltam az LC-MS/MS rendszerbe. A kromatográfiai elválasztások egy Agilent 1260 Infinity típusú UHPLC rendszerrel történtek (Agilent Technologies, CA, USA) egy Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 előtétoszloppal ellátott (4.6 mm × 12.5 mm, 5 µm) Supelco Ascentis® Express C18 kolonnán (3.0 mm × 150 mm, 2.7 µm, 100 Å). A kolonnatermosztátot 25, a mintaadagoló tálcáját pedig 4 °C-ra állítottam. A mérendő komponensek elválasztása izokratikus körülmények között, víz (0,2% TFA) – acetonitril (ACN) 85:15 arányú eluensösszetétel mellett 6,5 perc alatt valósult meg 0,4

ml/perc-es áramlási sebességet alkalmazva. Az eluálódó komponensek tömegspektrometriás vizsgálata egy elektrospray ionforrással ellátott Agilent 6460 Triple-Quadropole készülékkel történt (Agilent Technologies, CA, USA) *multiple reaction monitoring* (MRM) módban, a következő beállítások mellett: kapilláris feszültség, +3,5 kV; szórófej feszültség, +400 V; nitrogén porlasztógáz áramlási sebesség, 45 psi; vivőgáz áramlási sebesség, 10 l/perc (350 °C); köpenygáz áramlási sebesség, 11 l/perc (350 °C).

A mérendő komponensek közös törzsadatából két párhuzamos, 8 pontos kalibráló sorozatot hígítottam, spikeoltam velük a mesterséges plazmát, és a mintaelőkészítési procedúra elvégzése után, minden mérési sorozat elején és végén lefuttattam ezeket. A kalibráló sor koncentrációtartományát minden analit esetén úgy állítottam be, hogy a legalacsonyabb pontja a kvantitálás alsó határával (lower limit of quantitation, LLOQ), legmagasabb pontja pedig a felső határral (upper limit of quantitation, ULOQ) essen egybe. A kalibráló egyeneseket 1/x szerint súlyoztam.

A QC mintákat az EMA bioanalitikai módszervalidálásra vonatkozó irányelvei alapján készítettem el. Az aminosavak esetén négy QC koncentrációsintet: LLOQ, alacsony QC (*low QC*, LQC), közepes QC (*medium QC*, MQC), magas QC (*high QC*, HQC), míg a szerotonin és kinurenin esetén hármat (LLOQ, LQC, HQC) vizsgáltam. Tekintettel arra, hogy a QC minták helyettesítő mátrixban készültek, a kvantitatív analízist potenciálisan befolyásoló különböző mátrixhatások monitorozására egy további minőségellenőrző mintát is készítettem poolozott plazmából, melyben a komponensek endogén koncentrációját standard addícióval határoztam meg. A napon belüli torzítatlanság (*accuracy*) és pontosság (*precision*) nyomon követése öt párhuzamosan előkészített minta mérésével történt, minden QC szinten. A napok közötti torzítatlanság és pontosság meghatározása a napon belüli procedúra, öt egymást követő napon való ismétlésével történt.

Az extrakciós hatásfokot a mintaelőkészítés előtt (*prespiked*) és után (*postspiked*) hozzáadott standard oldat válaszjeleinek összehasonlításával vizsgáltam, hat párhuzamos mintán. A pre-spiked minták előkészítése a QC mintákkal azonos

módon történt, tehát 900 µl mintához 100 µl standardot és 20 µl BST-t adtam, majd elvégeztem a fehérjekicsapást 200 µl TFA-val, és centrifugáltam a mintát. Post-spiked minták esetén 1 ml helyettesítő mátrixot (blank minta) 200 µl TFA-val kezeltem, és a centrifugált minta felülúszójának 90 µl-éhez 10 µl standardot és 2 µl BST-t adtam.

Bioanalitikában a parallelizmus kifejezést általában annak az értékelésére használják, hogy a kalibrációs és minőségellenőrző mintákban mért analitikai válaszjel milyen mértékben képes leképezni a biológiai mátrixban kapott eredményeket, mennyire mutat párhuzamosságot azzal. Helyettesítő mátrix alkalmazása esetén ezek a vizsgálatok kritikus jelentőséggel bírnak, tekintve, hogy nagyfokú parallelizmus esetén a biológiai közeg és a helyettesítő mátrix között nincs számottevő különbség extrakciós hatások és mátrixhatás tekintetében, megfeleltethetők egymásnak. A parallelizmus meghatározását a Houghton és munkatársai által kidolgozott eljárás alapján végeztem. Ennek során hat egyéni plazmamintát két-két részletre osztottam. Az egyik részletéből meghatároztam a komponensek endogén koncentrációit standard addícióval. A plazma másik részletét MQC oldattal spikeoltam, majd a minta részleteit 2-szeresére, 5-szörösére, illetve 10-szeresére hígítottam a helyettesítő mátrixszal. Ezt követően a hígított minták koncentrációját meghatároztam a helyettesítő mátrixban előkészített kalibrálókat alkalmazva. A teljes folyamatot három alkalommal ismételt meg. Tekintve, hogy a parallelizmus vizsgálat során a minta hígítása történik, a kísérlet hígítási integritás vizsgálatként is értelmezhető.

A törzsoldatok és munkaoldatok stabilitását vizsgáltam szobahőmérsékleten (20 °C) 24 óráig és 10 °C-on 10 napig. A nyolc analit standard munkaadatainak vizsgálata *bracketing* megközelítéssel történt: csak a legalacsonyabb és a legmagasabb koncentrációt vizsgáltam, utóbbi a törzsoldatot is jelentette. Az analitok mátrixstabilitását LQC és HQC, valamint poolozott plazmamintákban is vizsgáltam, 3 párhuzamos előkészítést végezve, különböző körülmények között: szobahőmérsékleten 24 óráig, -20 °C-on 2 hónapig, illetve 3 fagyasztás-olvasztás

cikluson keresztül. Az előkészített minták stabilitását szobahőmérsékleten 12 óráig, és a mintaadagoló tálcahőmérsékletén (4 °C), 24 óráig vizsgáltam.

Az egymást követő kromatográfiás futásoknál fellépő áthordás (*carry-over*) tesztelésére poolozott plazmamintát spikeoltam a legmagasabb koncentrációjú kalibráló oldattal. A mintát feldolgoztam a fent említett mintaelőkészítési módszerrel, és a minta mérése után közvetlenül blank mintát injektáltam a rendszerbe, majd értékeltem az analitok és BST-k válaszjelét.

Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanomában

Az AGP szérumból történő kinyerésére a MQ vízzel 1:1 arányban hígított szérumot tizenötszörös térfogatú kloroform-metanol (2:1) eleggyel extraháltam körkörös síkrázó készüléken (120/perc, 0-4 °C). 45 perc extrakciót követően a szérum 2,5-szeres térfogatának megfelelő mennyiségű MQ vizet adtam a mintákhoz, majd 15 percig folytattam a rázatást. Az extrakciót követően a lombikok tartalmát centrifugáltam (20 perc, 4°C, 4000 rpm), majd a felső (vizes-metanos) fázis fehérjetartalmát háromszoros térfogatú abszolút alkohollal csaptam ki, és centrifugálást követően (5 perc, 4°C, 4000 rpm) az ismét feloldott csapadékot preparatív ioncsere kromatográfiával tisztítottam a szennyező fehérjéktől. A tisztítási lépésre egy Pharmacia középnyomású kromatográfot használtam, az elválasztás pedig egy erős anioncserélővel, Fractogel EMD TMAE-650-nel töltött Pharmacia oszlopon (5 × 0,5 cm) történt. A detektálást 280 nm-es hullámhosszon UV detektorral végeztem. A gradiens elúciós módszer „A” eluense 25 mM bisz-trisz-propánt tartalmazott (pH=7,5), a „B” eluens pedig 25 mM bisz-trisz-propánt és 350 mM NaCl-ot (pH=9,5). 1,5 ml/perc áramlási sebesség mellett a gradiens elúció a következőképp alakult: 0-1,7 perc, 0% B; 1,8- 10,0 perc 50% B; 10,1-18,0 perc, 60% B; 18,1-21,0 perc, 100% B; 21,1-25,0 perc, 100% B; 25,1-26,0 perc, 0% B; 26,1-30,0 perc, 0% B. A 11 és 17 perc között eluálódó AGP frakciót főzőpohárba gyűjtöttem, az ugyanazon mintából származó frakciókat egyesítettem, majd fagyasztva szárítottam. A liofilizátumot feloldottam 5 ml MQ vízben, majd gélkromatográfiás módszerrel egy

Sephadex G-25 kolonnán ($15 \times 2,5$ cm) tisztítottam meg a pufferkomponensektől és a sótól, 2 ml/perc áramlási sebességű MQ vizes elúcióval. A detektálás ebben az esetben is UV detektorral, 280 nm-en történt. Az AGP 12 és 22 perc között eluálódott, melyet főzőpohárba gyűjtöttem, liofilizáltam, majd 2-8 °C között tároltam további felhasználásig. Az AGP oligoszacharid oldalláncainak enzimatis emésztését a következőképp végeztem. 2 mg fehérjét 600 μ l 50 mM K_2HPO_4 és 2 mM etiléndiamin-tetraecetsav tartalmú pufferben oldottam (pH=7,4). 12 μ l 5%-os nátriumdodecil-szulfát (SDS) és 16 μ l 10%-os β -merkaptóetanolt (frissen hígított) hozzáadását követően az AGP-t 10 percig denaturáltam 100 °C-os blokk termosztátban, majd a mintát 10 percen át -20 °C-on hűtöttem. A hűtés során kicsapódó SDS-t centrifugálással távolítottam el a rendszerből (5 perc, 20 °C, 14800 rpm). A felülúszóhoz hozzáadtam 6 nemzetközi egység PNGáz F enzimet, és 26 órán keresztül inkubáltam 37 °C-on. Az enzimreakciót követően az oldat fehérjetartalmát 6 ml abszolút etanol hozzáadásával csaptam ki, a csapadékot centrifugáltam (5 perc, 4 °C, 4000 rpm), a felülúszót pedig nitrogénáram alatt szárítottam (30 perc, 40 °C). A mintát 2-8 °C között tároltam további felhasználásig. Ezt követően az AGP szénhidrát tartalmából antranilsavas származékot képeztem. Az antranilező reagens alapadata 4% nátrium-acetát-trihidrátot és 2% ortobórsavat tartalmaz. Közvetlenül az antranilezési reakció előtt ml-enként 20 mg nátrium-cianoborohidridet és 30 mg antranilsavat oldottam fel az alapoldatban. Az így elkészített reagensből 2 ml-t adtam a mintákhoz, és az elegyet lezárt centrifugacsőben 60 percen keresztül, 80 °C-on inkubáltam. A reakció végeztével a mintát szobahőmérsékletre hűtöttem, majd háromszorosára hígítottam MQ vízzel. Az oldatot a fent említett gélkromatográfiai módszerrel tisztítottam meg a reagens feleslegétől, a minták víztartalmát pedig fagyasztva szárítással csökkentettem, és az analízis napjáig -20 °C-on tároltam. A származékolt szénhidrátok analitikai vizsgálataira hidrofil kölcsönhatású kromatográfiaival kapcsolt tandem tömegspektrometriás (HILIC-MS/MS) módszert fejlesztettem. A kromatográfiai elválasztásokat egy Dionex UltiMate 3000 UHPLC készüléken végeztem (Thermo Scientific, Bremen, Németország), egy Phenomenex

Luna® NH₂ aminopropil-szilika állófázison (250 mm × 3 mm, 5 μm, 100 Å). A mintaadagoló tálcahűtését 4 °C-ra, a kolonnatermosztátot pedig 50 °C-ra állítottam. Az elválasztás „A” eluenseként 200 mM ammónium-formiátot (pH=3,5), „B” eluenseként ACN-t alkalmaztam. 0,4 ml/perc áramlási sebesség mellett az eluensösszetétel a következőképpen változott a kromatográfiás futás során: 0-3 perc, 70% B; 3-95 perc, 70-5% B; 95-110 perc, 5% B; 110-111 perc, 5-70 B%; 111-130 perc, 70 B%. Az analízishez a liofilizált mintákat 200 μl kiindulási eluensben oldottam (70% B), és 100 μl-t injektáltam az LC-MS rendszerbe. Az eluálódó glikánok MS vizsgálatai egy Q Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométerrel történtek (Thermo Scientific, Bremen, Németország). A készülék elektropray ionforrással felszerelt, melyet negatív módban működtettem. Az optimált MS paraméterek a következők voltak: kapilláris feszültség, 2,8 kV; porlasztógáz áramlási sebessége, 32 psi; segédgáz áramlási sebessége, 7 psi; függőnygáz áramlási sebessége, 0 psi; automatikus erősítésvezérlő (*automatic gain control*) célérték, 3000000; maximális befecskendezési idő, 200 ms. A detektálás 17500-as felbontás mellett, 1000 és 2500 közötti *m/z* tartományban történt. Ezt követően a tandem MS felvételeket adatfüggő módon, a pontos tömeg alapján azonosított prekursor ionokról vettem fel. A fragmentáció ütközés indukált disszociációval, 35%-os relatív ütközési energia alkalmazásával történt. A spektrumokat 17500-as felbontás mellett, 1000-2500 közötti *m/z* tartományban regisztrálta a készülék.

Eredmények

Migrén-biomarkerek meghatározása vérplazmából

A 8 analit analízisére fejlesztett 6,5 perces, izokratikus LC-MS/MS módszer lehetővé tette a komponensek szelektív és érzékeny meghatározását. Ezt egyrészt MRM módban történő detektálás, másrészt pedig az izomer aminosavak, a leucin és az izoleucin kromatográfiás szeparációja tette lehetővé. A kalibrációs egyenesek regressziós koeficiensei (r^2) minden analitra legalább 0,998-nak adódtak, biztosítva a kalibrációs tartomány megfelelő linearitását. A validálás során, a napon belüli és

napok közötti torzítatlanság értékei 87,4-114,3%, valamint 87,7-113,3% között alakultak, a napon belüli és napok közötti pontosság pedig 11,8 és 14,3%-on belül volt. Az extrakciós hatásfok értékei 85,2 és 101,4% között alakultak, tehát a mintaelőkészítési procedúra nem befolyásolta számottevően a mérendő komponensek koncentrációját a mintákban, a BST normalizált extrakciós hatásfok 93,6 és 111,8% közötti értékei alapján pedig a belső standardok jól reprezentálják az analitokat. A parallelizmus vizsgálatok során felhasznált 6 egyéni plazmaminta koncentrációi standard addícióval és helyettesítő mátrixban felvett kalibráló egyenes alapján is elfogadási határon belül volt (10%-on belüli eltérés). A hígítási integritás vizsgálatok esetén az analitkoncentráció minden koncentrációsinten az elfogadási határon belül volt, következésképpen a mesterséges plazma hasonló extrakciós hatásfokot és mátrixhatást biztosít, mint a humán vérplazma. A standardok törzsadatai és munkaadatai stabilnak bizonyultak 20 °C-on 24 óráig és 10 °C-on 10 napig. A humán és mesterséges plazmaminták háromszori lefagyasztása és felolvasztása nem befolyásolta az analitkoncentrációt, ahogy 24 óráig szobahőmérsékleten (20 °C), illetve 2 hónapig -20 °C-on történő tárolásuk sem. A feldolgozott minták koncentrációiban szintén nem történt számottevő változás 24 óra alatt a mintaadagoló hőmérsékletén (4 °C), valamint 12 óra alatt szobahőmérsékleten. Az áthordás nem haladta meg az LLOQ mennyiségének 17,2, BST-k esetén pedig az 1,0%-át, így megfelelt az EMA irányelveiben foglalt 20, illetve 5%-os határnak. A validált bioanalitikai módszert mintegy 800 szérumminta meghatározására alkalmaztam, melyet potenciális migrén biomarkerek azonosítása céljából gyűjtöttek 98 migrénes betegtől, illetve egészséges önkéntestől. A mintákat tíz mérési sorozat keretében mértem le, minden sorozat elején és végén kalibráló, illetve QC mintákat is futtatva. Utóbbiak esetén a pontosság és torzítatlanság nem romlott a módszervalidálás eredményeihez viszonyítva. Az EMA irányelveinek megfelelően vizsgáltam a mérések reprodukálhatóságát, a minták 10%-ának (n=80) ismételt mérésével. Tekintve hogy az ismétlések során mért hiba egyik minta esetén sem haladta meg a 18,2%-ot, az eredmények messzemenőkéig kielégítik az irányelvben foglalt kritériumokat,

miszerint az eredményeknek 20%-os hibahatáron belül kell lennie, legalább az esetek 66,7%-ában. A minták kevesebb, mint 1%-ában a valin, izoleucin vagy tirozin koncentráció meghaladta az ULOQ-t. Ezekben az esetekben a plazmamintákat kétszeresére hígítottam mesterséges plazmával, és a mintaelőkészítést követően ismét lemértem őket.

Az AGP biomarker jellegének vizsgálata melanómában

Az AGP antranilált oligoszacharid oldalláncainak vizsgálatára fejlesztett HILIC-MS/MS módszer alkalmazása során a származékok három, egymástól jól elkülöníthető csúcseggyüttesben jelentek meg szíálsav tartalmuk alapján: 43,49–47,15 perc között az egyszeresen, 61,36–75,31 perc között a kétszeresen, 83,46–112,60 perc között a háromszorosan, illetve négyszeresen szializált szerkezetek eluálódtak. A továbbiakban az oligoszacharidokat cukorösszetételük alapján fogom jelölni, ahol a betűk a láncot felépítő monoszacharid egységeket jelölik: H (hexóz, amely lehet mannóz vagy galaktóz), G (galaktóz), M (mannóz), N (N-acetil-glükózamin), S (szíálsav), F (fukóz), a betűk utáni szám pedig azt jelöli, hogy az adott monoszacharidból hány található a láncban. Tekintve, hogy az AGP-ben kizárólag komplex szerkezetű oldalláncok találhatóak, amelyek core része konzervatív szerkezetű (két N-acetil-glükózaminból és három mannózból épül fel), belátható, hogy a N4H5 jelölés bi-, az N5H6 tri-, az N6H7 tetraantennáris, az N7H8 pedig láncelongált szerkezetre utal. A nagyfelbontású kromatográfiás módszerrel mintegy 102 glikánizomert sikerült azonosítani. Ennek fő oka, hogy a módszer lehetővé tette az olyan glikánizomerek elválasztását is, amelyek egymástól csak a szíálsav kötéstípusában (α -2,3 vagy α -2,6), illetve a fukóz pozíciójában (*core* vagy *antenna*) különböztek egymástól, és amelyeket diagnosztikus fragmencionokkal lehetett igazolni. Tekintve, hogy az AGP egy szialoglikoprotein, az azonosított izomerek mindegyike tartalmazott legalább egy szíálsav egységet, továbbá megtalálhatóak voltak egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan fukozilált, illetve elongált láncú szerkezetek is. A tandem tömegspektrumok kiértékelése lehetővé tette a

legintenzívebb 39 izomer szerkezeti jellemzését. Az optimált körülmények között az MS/MS spektrumok főként „Y”, „Z” és „B” típusú fragmensionokat tartalmaztak, de szintén megfigyelhetők voltak gyűrűhasadással keletkező „A” ionok is. Mind az α -2,3 (B_2 -CO₂, 408,15 *m/z*), mind a α -2,6 (^{0,4}A₂-CO₂, 306,12 *m/z*) szializációra jellemző diagnosztikus fragmension megfigyelhető volt az MS/MS spektrumokban, így meg lehetett állapítani, hogy az egyes izomerek melyiket tartalmazzák. Egy biantennás glikán, N4H5S2 vizsgálatával lehetőség nyílt annak demonstrálására, hogy az izomerek elúciós sorrendje nem kizárólag a szialsavegységek számával, de a cukorlánchoz való kapcsolódásuk módjával is szorosan összefügg, ugyanis az α -2,6 szialsav nagyobb retenciót eredményez a HILIC elválasztások során, mint az α -2,3. Annak ellenére, hogy a szakirodalom az AGP-re tisztán antenna fukozilált glikoproteinként hivatkozik, két oligoszacharid (N4H5SF, N4H5S2F) esetén is sikerült igazolni a *core* fukoziláció meglétét.

A daganatos és kontroll minták összehasonlító elemzése céljából meghatároztam minden glikánizomer csúcs alatti területét az egyéni mintákban, majd kifejeztem az adott mintában található összes oligoszacharidhoz viszonyított relatív mennyiségüket. Ezt követően az értékeket átlagoltam beteg és a kontrollcsoportban is, majd a betegcsoport értékeit normalizáltam a kontrollcsoportra. Ez alapján egyértelműen látható a fukozilált oligoszacharidok túlexpressziója a melanomás csoportban, különösen a jobban elágazó szerkezetek esetén. Néhány triantennás (N5H6S3F, N5H6S3F2, N5H6S3F3) és tetraantennás (N6H7S4F, N6H7S4F2) glikánizomer példáján pedig az is belátható, hogy a növekedés mértéke hozzávetőlegesen arányban van a szénhidrát lánchoz kapcsolódó fukozegységek számával, jól demonstrálva a fukoziláció kitüntetett szerepét a kórfolyamatban. Valószínűleg az előző folyamat eredményeként, néhány nem fukozilált glikán (N5H6S2, N5H6S3, N6H7S3) relatív mennyiségi csökkenése is megfigyelhető a betegcsoportban. Egy adott oligoszacharid különböző izomereit összehasonlítva arányeltolódás figyelhető meg a később eluálódó komponens javára. A jelenség leginkább a triantennás N5H6S2 és N5H6S3F, továbbá a tetraantennás N6H7S2 és

N6H7S2F esetén jelentkezett. Összhangban a szializált izomerek elúciós sorrendjéről levont következtetésekkel, az N5H6S3F és N6H7S2 esetén MS/MS kísérletekkel igazolható volt, hogy a jelenség az α -2,6 szializáció fokozott mértékével függ össze.

Az LC-MS mérések eredményeit lineáris diszkriminancia analízissel (LDA) értékeltem ki, amely folytonos független változók lineáris kombinációját alkalmazva képes megkülönböztetni kettő vagy több kategóriát, mint függő változót. A legnagyobb diszkrimináló képességgel rendelkező változók kiválasztása az értékek csoportokon belüli átlagából és szórásnégyzetéből került kiszámításra. Ez alapján a legerősebb változók a következők. A legjelentősebb diszkrimináló képességgel rendelkező változók a következők:

- N5H6S2 csökkent relatív mennyisége a daganatos csoportban
- N5H6S2 4. izomerének csökkent relatív mennyisége a daganatos csoportban
- N5H6S2 5. izomerének csökkent relatív mennyisége a daganatos csoportban
- N5H6S2 4. és 5. izomerének egymáshoz viszonyított aránya csökken a daganatos csoportban
- N5H6S3F 1. és 2. izomerének egymáshoz viszonyított aránya csökken a daganatos csoportban
- N6H7S2 3. és 5. izomerének egymáshoz viszonyított aránya csökken a daganatos csoportban
- N6H7S2 4. és 5. izomerének egymáshoz viszonyított aránya csökken a daganatos csoportban
- N6H7S2F növekedett relatív mennyisége a daganatos csoportban
- N6H7S2F 3. izomerének növekedett relatív mennyisége a daganatos csoportban
- N6H7S2F 2. és 3. izomerének egymáshoz viszonyított aránya csökken a daganatos csoportban.

A melanomás és kontroll csoport megkülönböztetésére alkalmas 10 változó tehát összesen 4 oligoszacharidhoz kötődik. A független változók segítségével képzett LDA modell teljesítőképességét az ún. „egyharmad–kihagyásos” kereszt-validálási

módszerrel értékeltem. Ennek során a 37 vizsgálati minta véletlenszerűen kiválasztott kétharmadából (25 minta) megalkottam a modellt, a visszamaradó egyharmadra (12 minta) pedig ismeretlenként tekintettem, és kategorizáltam őket a modell alapján. A ciklust tíz alkalommal ismételt meg, összesen 120 véletlenszerűen kiválasztott minta besorolását elvégezve. A módszer 55 melanomás mintából 52-t, és 65 kontrollmintából 64-et helyesen ismert fel, mely kimagasló, 96,7%-os klasszifikációs hatékonyságot jelent. A biomarkerek értékelésére szolgáló teljesítményjelzőkkel kifejezve az AGP érzékenysége 94,6%, specifikussága 98,5%, pozitív prediktív értéke 98,1%, negatív prediktív értéke pedig 95,5%. Ugyanebben a populációban az S100B fehérje 33,3%-os érzékenységgel, 94,7%-os specifikussággal, 85,7%-os pozitív prediktív értékkel, 60,0%-os negatív prediktív értékkel rendelkezik.

Következtetések

Doktori munkám során elsőként fejlesztettem bioanalitikai módszert a valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin, triptofán, szerotonin és kinurenin egymás melletti kvantitatív meghatározására. Izokratikus körülmények között végzett fordított fázisú kromatográfiás módszerrel 6,5 perc alatt megvalósult a komponensek elúciója, és az izomer aminosavak (leucin, izoleucin) elválasztása. Az analitok endogén természetéből adódóan a bioanalitikai módszervalidálásra vonatkozó hatósági irányelvek csak korlátozottan alkalmazhatók, melyek előírják, hogy a validálási mintákat a vizsgálati mintákkal azonos mátrixban kell elkészíteni. A nagyszámú analit és meghatározni kívánt vérplazma minta miatt, a helyettesítő mátrix megközelítést alkalmaztam a probléma megoldására. Ennek során 4% HSA tartalmú PBS oldatot alkalmaztam a kalibráló és minőségellenőrző minták elkészítésére. A vérplazma és a mesterséges mátrix közötti paralelizmust vizsgáltam standard addíciós módszerrel, és hígítási integritás vizsgálatral. Az eredmények azt mutatták, hogy a mátrixok közötti párhuzamosság fennáll minden analit esetén. Következésképp, a kiválasztott összetétel megfelelően reprezentálja a vérplazmát a mérendő komponensek esetében, mind extrakciós hatások, mind mátrixhatás tekintetében. A módszer továbbá lehetővé tette

az analitok releváns endogén koncentráció-tartományának lefedését kalibráló és quality control mintákkal, továbbá az extrakciós hatások értékének számszerűsítését. Végsősoron pedig lehetőség nyílt a kifejlesztett módszer és a mérések validálására az EMA és FDA által meghatározott összes paraméterre. A validált módszert sikerrel alkalmaztam a nyolc analit meghatározására 800 humán vérplazma mintában, egy migrén biomarkerekre irányuló kutatás támogatása céljából.

Doktori kutatásom második felében egy HILIC-MS/MS módszert dolgoztam ki az AGP szénhidrátartalmának antranilsavas származékképzést követő vizsgálatára, mely a nagyfelbontású kromatográfiás módszernek köszönhetően lehetővé tette az eddigi kutatásoknál nagyobb számú, mintegy 102 glikánizomer azonosítását. A módszerrel elsőként vizsgáltam a malignus melanoma glikozilációra gyakorolt hatását, 18 high-risk melanomás beteg, és 19 egészséges önkéntes bevonásával. Ennek során azt tapasztaltam, hogy a beteg és kontroll minták megkülönböztetésére két triantennás (N5H6S2, N5H6S3F) és két tetraantennás (N6H7S2, N6H7S2F) oligoszacharid, illetve hozzájuk köthető 10 változás bizonyult leginkább alkalmasnak. Annak ismeretében, hogy a 10 legnagyobb diszkrimináló erővel rendelkező változó közül 8 izomer szintű megfigyelésen alapul, a biomarker jelleg eredményes igazolásához nélkülözhetetlennek bizonyult a nagy felbontóképességű elválasztástechnikai módszer (esetünkben a HILIC módszer), mellyel megvalósítható az izomerek elválasztása. Másik fontos tapasztalat, hogy az egyes változók önmagukban mérsékelt, kombinálva viszont kiemelkedő klasszifikációs hatékonyságot eredményeztek. Fontos tanulság tehát, hogy a glikozilációra irányuló biomarker-vizsgálatoknak célravezető nem egyedi szerkezeteket monitoroznia, hanem a teljes mintázatot figyelembe vennie. Ez alapján az ilyen irányú kutatások szerves részét kell képeznie a mintázatfelismerésre alkalmas biostatistikai módszereknek, mellyel tapasztalataim alapján leküzdhető a nagy egyéni különbségek zavaró hatása, illetve a változások olyan egyedi kombinációja található meg, mely nagy specifikusságot mutat a vizsgált kórképre. Ezzel a megközelítéssel sikerült igazolnom az AGP glikozilációs mintázatának biomarker jellegét *high-risk* melanomás betegekben, mely mind érzékenységekben,

mind negatív prediktív értékben jelentősen fölülmúlja a jelenleg alkalmazott S100B fehérjét. A vizsgálatok során kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a kidolgozott és alkalmazott analitikai és kemometriai módszerek összessége alapját képezheti egy jövőbeni, hatékony melanoma malignum diagnosztikai eljárásnak.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Virág D, Dalmadi-Kiss B, Vékey K, Drahos L, Klebovich I, Antal I, Ludányi K. (2020) Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. *Chromatographia*, 83: 1-10.

IF: 2,044

2. Virág D, Király M, Drahos L, Édes AE, Gecse K, Bagdy G, Juhász G, Antal I, Klebovich I, Dalmadi Kiss B, Ludányi K. (2020) Development, validation and application of LC–MS/MS method for quantification of amino acids, kynurenine and serotonin in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 180: 113018.

IF: 3,935

3. Virág D, Kremmer T, Lőrincz K, Kiss N, Jobbágy A, Bozsányi S, Gulyás L, Wikonkál N, Schlosser G, Borbély A, Huba Z, Dalmadi Kiss B, Antal I, Ludányi K. (2021) Altered Glycosylation of Human Alpha-1-acid Glycoprotein as a Biomarker for Malignant Melanoma. *Molecules*, 26: 6003.

IF: 4,411

Egyéb közlemények

1. Virág D, Dalmadiné Kiss B, Vékey K, Drahos L, Antal I, Klebovich I, Ludányi K. (2016) Biológiai gyógyszerek analitikai vonatkozásai és tömegspektrometriás vizsgálata. *Acta Pharm. Hungarica*, 86: 141-150.
2. Klebovich I, Virág D. (2018) Tracking the Effect of Drug Interactions with *In Vitro* Dissolution Studies. *Pharma Times*, 50: 16-20.
3. Dalmadiné Kiss B, Király M, Virág D, Antal I, Ludányi K. (2021) mRNS alapú vakcinák a COVID-19 járvány elleni küzdelemben. *Gyógyszerészet*, 65: 138-144.