
TEZĂ DE ABILITARE

Studii de toxicologie analitică și
experimentală în evaluarea
abuzului de substanțe, a stresului
oxidativ și a perturbării
endocrine

Conf. Dr. **Béla Kiss**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

REZUMAT

Teza de abilitare " Studii de toxicologie analitică și experimentală în evaluarea abuzului de substanțe, a stresului oxidativ și a perturbării endocrine", reprezintă o descriere sintetică a activității științifice, profesionale și academice a D-lui Conf. Béla Kiss, desfășurată după susținerea tezei de doctorat în 2007.

O parte importantă a cercetărilor s-a desfășurat în domeniul analitic și a constat în elaborarea unor metode cromatografice, aplicabile printre altele la: a) confirmarea cazurilor de consum abuziv al unor substanțe ilicite sau medicamentoase; b) studiul unor interacțiuni toxicocinetice și/sau toxicodinamice între xenobiotice; c) analiza unor markeri ai stresului oxidativ; d) caracterizarea fitochimică a unor specii de plante, urmărind în special conținutul în compuși din grupul antioxidanților și/sau a fitoestrogenilor; e) monitorizarea terapeutică a anumitor substanțe medicamentoase sau studiul bioechivalenței unor produse generice.

În acest sens s-a recurs la elaborarea, optimizarea și validarea unor metode bazate pe cromatografie de lichide care să permită dozarea compușilor endogeni sau exogeni din diverse tipuri de matrici: plasmă sau urină de origine umană, plasmă sau creier de origine animală, lizat celular, preparate microzomiale din ficat de șobolan, extracte vegetale. Procesul de optimizare este esențial pentru ameliorarea performanțelor metodelor analitice (în special în termeni de sensibilitate și selectivitate), fiind vizați parametri cum ar fi compoziția fazei mobile, pH-ul fazei mobile, parametrii detecției (lungimile de undă, sursa de ionizare, energia de fragmentare). O etapă esențială în cadrul unei analize din matrici complexe o reprezintă prelucrarea probelor, apelându-se la metode bazate pe extracție lichid-lichid sau pe fază solidă, dar și la variante mai simple (deproteinizare, filtrare, centrifugare), pentru a garanta analize de tip "high-throughput". Pentru a obține performanțe crescute în termeni de rezoluție, sensibilitate și rapiditate, s-au elaborat o serie de metode UPLC, utilizând coloane cu particule de dimensiuni sub 2 μ m.

Monitorizarea consumului abuziv de droguri și/sau medicamente a reprezentat un prim obiectiv în contextul direcțiilor de cercetare abordate de autor. Consumul de droguri reprezintă o problemă foarte gravă cu care se confruntă societatea la ora actuală. Confirmarea expunerii la substanțe ilicite sau medicamente utilizate abuziv este relevantă atât din punct de vedere clinic, cât și medico-legal. Din acest motiv s-au elaborat o serie de metode cromatografice cu diverse tipuri de detecție în vederea dozării unor compuși utilizați abuziv și/sau metabolizi ai acestora din matrici biologice. Compușii selectați au fost din grupul benzodiazepinelor, opiaceelor/opioidelor, respectiv amfetaminelor. Metodele elaborate au prezentat o

serie de avantaje (sensibilitate, simplitate, rapiditate, accesibilitate, metode multianalit) față de metodele existente în literatura de specialitate.

Studiul stresului oxidativ a reprezentat un alt obiectiv major, autorul elaborând o serie de metode aplicate ulterior la dozarea unor biomarkeri uzuali. Stresul oxidativ reprezintă un dezechilibru între speciile reactive de oxigen (dar și de azot și sulf), respectiv factorii enzimatici/non-enzimatici protectori din organism. Numeroase studii recente au sugerat un posibil rol al stresului oxidativ în etiologia a numeroase patologii, respectiv implicarea lui în acțiunea toxică a diverse xenobiotice (inclusiv substanțe medicamentoase). Prin urmare, este esențială elaborarea unor metode adecvate de dozare a unor biomarkeri care să permită aprecierea statusului redox al organismelor vii, confirmarea implicării stresului oxidativ în anumite patologii sau în acțiunea toxică a unor compuși, respectiv identificarea unor produse vegetale cu rol protector antioxidant. În cadrul cercetărilor desfășurate, DI Béla Kiss a elaborat o serie de metode HPLC, respectiv UPLC de dozare a MDA libere și/sau totale (ca marker al peroxidării lipidice), respectiv a glutationului redus, oxidat și/sau total (ca factor protector) din diverse matrici biologice (plasmă de șobolan, om sau iepure, preparate microzomiale hepatice, lizat celular).

Corelat cu investigarea rolului antioxidant al unor produse de origine vegetală autorul a elaborat o serie de metode LC aplicabile la caracterizarea fitochimică a unor specii de plante, urmărind nivelul compușilor cu potențial rol protector antioxidant. Metodele elaborate pot fi utile în vederea identificării speciilor de plante bogate în antioxidanți și care pot reprezenta astfel o sursă importantă de produse protectoare pentru organism. În plus, eficiența acestor produse depinde de calitatea lor, care poate fi evaluată prin aplicarea metodelor elaborate. Acestea au permis de ex. analiza unor derivați polifenolici, a ruscogeninei, neoruscogeninei, resveratrolului.

O altă direcție de cercetare a D-lui Béla Kiss a reprezentat-o studiul pertrubatorilor endocrini (PE), categorie care include și fitoestrogeni. Ca urmare, s-au elaborat metode de dozare a fitoestrogenilor din extracte vegetale, cu scopul de a identifica potențiale surse bogate în astfel de compuși, cu posibilitatea utilizării lor în terapia de substituție hormonală. Compușii analizați au constatat în fitoestrogeni din clasa izoflavonelor și coumestanilor, sub formă de agliconi și/sau glicozide.

În cadrul studiilor analitice, un alt obiectiv a constat în elaborarea de metode de dozare a unor substanțe medicamentoase în vederea aplicării ulterioare în monitorizarea terapiei, studiul biodisponibilității sau bioechivalenței unor produse generice. Aceste studii sunt utile în vederea asigurării eficienței terapeutice, în condițiile unui risc minim de reacții adverse. Astfel, s-au elaborat metode cromatografice de dozare a pentoxifilinei și metabolizilor, respectiv a levosimendanului din plasmă umană.

Pe lângă studiile analitice, autorul a desfășurat activitate de cercetare și în domeniul toxicologiei experimentale, fiind abordată în acest context problematica

perturbatorilor endocrini. S-a evaluat potențialul PE al unor compuși diferiți din punct de vedere al utilității, respectiv a potențialelor surse de expunere, și anume, compuși: a) utilizați ca și conservanți antimicrobieni în produse cosmetice și de îngrijire personală (butil paraben) sau ca antioxidanți în alimente, cosmetice sau ambalaje pentru alimente (butilhidroxianisol, butilhidroxitoluen, galat de propil); b) de origine vegetală (coumestrol, epigalocatechin-3-galat); c) substanțe medicamentoase de sinteză (antidepresive din grupul inhibitorilor selectivi ai recaptării serotoninei). Studiile s-au concentrat pe evaluarea efectelor de tip (anti)estrogenic (E/AE) și/sau (anti)androgenic (A/AA) ale compușilor selectați, recurgând în acest sens la teste *in vitro* (teste cu genă raportoare – testul luciferazei, testul proliferării celulare), respectiv *in vivo* (testul uterotrofic). Datele obținute au confirmat capacitatea compușilor selectați de a interfera cu semnalizarea estrogenică și/sau androgenică, prezentând potențial de tip PE. În cazul unora dintre compuși, studiile efectuate au fost primele de acest gen din literatură de specialitate. Având în vedere că, populația este expusă în realitate la amestecuri de potențiali PE, respectiv că nu este fezabilă evaluarea practică a tuturor combinațiilor posibile, s-a evaluat capacitatea unor modele matematice de a estima efectul AE, respectiv AA al amestecurilor. S-a demonstrat capacitatea modelului aditivității dozelor de a estima efectul AE, respectiv AA al amestecurilor pe liniile celulare utilizate. Datele obținute evidențiază riscul asociat cu expunerea la amestecuri de substanțe cu potențial PE, inclusiv în caz de concentrații/doze lipsite de efect la evaluare individuală a compușilor.

Activitatea științifică a autorului s-a concretizat prin publicarea după susținerea tezei de doctorat a 25 articole în extenso în reviste cotate ISI (15 în calitate de autor principal), 5 articole în extenso în reviste BDI (în calitate de co-autor), 13 rezumate în reviste cotate ISI, 1 capitol de carte la o editură de prestigiu din străinătate (în calitate de prim-autor), 1 carte de specialitate la o editură națională (unic autor), respectiv 4 capitole de carte, la Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu". Indicele Hirsch este 7, atât conform platformei ISI Thomson, cât și Scopus. După 2007, autorul a fost director al unui grant național obținut prin competiție, respectiv membru în alte 7 proiecte naționale de cercetare și mentor în cadrul a 3 proiecte de cercetare (din care unul național). În vederea pregătirii profesionale autorul a participat la o serie de cursuri și stagii de perfecționare în străinătate. În perioada post-doctorală a participat la numeroase manifestări științifice naționale și internaționale.

În ceea ce privește activitatea didactică după susținerea tezei de doctorat, aceasta s-a desfășurat în cadrul Disciplinei de Toxicologie și a inclus cursuri, respectiv lucrări practice de toxicologie cu studenții de anul IV, secția română de la Facultatea de Farmacie și studenții de anul II de la Facultatea de Științe pentru Sănătate, cursuri și lucrări practice în cadrul a 3 programe de masterat, 1 curs opțional în limba română, engleză și franceză cu studenții de anul I de la Facultatea de Medicină Dentară și 1 curs în cadrul Școlii doctorale. Ca parte a activității didactice a coordonat 39 lucrări de

licență, respectiv 11 lucrări de disertație și a elaborat materiale didactice pentru cursurile și lucrările desfășurate.

Pe plan științific autorul își propune dezvoltarea direcțiilor de cercetare abordate de la susținerea tezei de doctorat până la ora actuală, atât în domeniul toxicologiei analitice, cât și experimentale. Pe parte analitică se va urmări elaborarea, optimizarea și validarea unor metode analitice simple, rapide și sensibile care să vizeze determinarea unor substanțe ilicite, substanțe medicamentoase, compuși endogeni (cu rol de biomarker) din probe de origine umană sau animală sau principii active de origine vegetală. Dacă va fi posibil, se va opta pentru elaborarea de metode multi-analit, o tendință frecvent întâlnită la ora actuală. În cazul studiilor pe substanțe utilizate abuziv, autorul își propune extinderea activității colectivului de cercetare pe compuși noi psihoactivi care au intrat pe piața drogurilor în ultimii ani. În ceea ce privește studiul stresului oxidativ va încerca o abordare mai complexă prin urmărirea unor biomarkeri suplimentari (ex. produși de oxidare a proteinelor sau a bazelor azotate). În cadrul toxicologiei experimentale, studiile de stres oxidativ vor fi completate cu evaluări ale disfuncției mitocondriale (afectarea lanțului transportor de electroni, respectiv a sintezei de ATP), încercând corelarea acestor mecanisme ca posibile explicații ale toxicității unor xenobiotice, respectiv ca posibile mecanisme aflate la baza unor patologii. Se vor continua și studiile de identificare și evaluare a potențialilor perturbatori endocrini, obiectivul fiind în special de testare a amestecurilor, respectiv de a utiliza și teste suplimentare *in vitro* și/sau *in vivo*, care să permită urmărirea mai multor mecanisme de acțiune care ar putea explica efectul de tip PE. Un rol important în succesul activității de cercetare îl are și îl va avea consolidarea echipei de cercetare de la disciplină, menținerea colaborărilor existente cu alte laboratoare la nivel național sau internațional, respectiv inițierea de noi colaborări, toate acestea reprezentând priorități ale autorului. În plus, formarea continuă a personalului și investiția în infrastructură sunt la fel, prioritare, motiv pentru care se vor depune proiecte de cercetare care ar putea garanta suportul financiar necesar. Creșterea vizibilității echipei se va asigura prin diseminarea rezultatelor prin prezentări la manifestări de prestigiu, respectiv prin publicarea de articole în reviste cotate ISI (de dorit Q1, Q2).

În ceea ce privește activitatea didactică, obiectivele constau în actualizarea în permanență a materialelor de la curs (nivel de licență, masterat, școală doctorală), respectiv de la lucrări practice, corelarea aplicațiilor practice cu informațiile teoretice prezentate și redactarea de materiale didactice, note de curs, capitole de cărți sau cărți de specialitate în domeniul toxicologiei. Dl. Béla Kiss își propune să mențină studentul, beneficiarul activității didactice, în centrul atenției, astfel încât conținutul cursurilor și lucrărilor practice să fie corelat cu ceea ce pretinde profesia de farmacist, respectiv piața farmaceutică, domeniul științelor farmaceutice de la un specialist în domeniu la ora actuală.

ABSTRACT

The habilitation thesis entitled "Analytical and experimental toxicology studies in the evaluation of substance abuse, oxidative stress and endocrine disruption", represents a synthetic overview of the scientific, professional and academic activity of Associate Prof. Béla Kiss, conducted after PhD defense in 2007.

A major part of the research activity was performed in the field of analytical toxicology and consisted in the elaboration of chromatographic methods applied: a) to confirm cases of substance abuse (illicit drugs or therapeutic drugs); b) to study toxicokinetic and/or toxicodynamic interactions between xenobiotics; c) to quantify biomarkers of oxidative stress; d) in the phytochemical characterisation of various plant species, with antioxidants and/or phytoestrogens as the main targeted active components; e) in therapeutic drug monitoring or in bioequivalence studies.

Therefore, several assays based on liquid chromatography were elaborated, optimized and validated, allowing the quantification of the selected endogenous or exogenous compounds from various matrices: human plasma or urine, rat plasma or brain, cell lysate, microsomal preparations from rat liver, plant extracts.

The optimisation process is a critical step in order to achieve the desired performances of the analytical methods (especially in terms of sensitivity and selectivity), the main parameters modified during this process being the mobile phase composition and pH, the parameters of detection (wavelengths, type of ionisation source, ionisation energy, collision energy). An essential step in the analysis of complex matrices consists in the sample preparation, the used methods being liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, but also simpler alternatives (protein precipitation, filtration, centrifugation), aiming for "high-throughput" analysis. In order to increase resolution, sensitivity and to decrease run time, UPLC methods were elaborated, with separation performed on columns with <math><2\mu\text{m}</math> particle size.

One of the objectives of the author consisted in monitoring drug abuse (illicit drugs and therapeutic drug misuse). Drug abuse represents a serious issue that the current society is confronted with. Confirming the cases of drug abuse could have clinical and forensic relevance. Therefore, multiple chromatographic methods coupled with different detection methods were elaborated in order to allow the quantification of abused compounds and/or their metabolites in biological samples. The targeted compounds belonged to the classes of benzodiazepines, opiates/opioids and amphetamines, respectively. The elaborated methods presented several advantages (more sensitive, simple, accessible, faster and/or allowing simultaneous analysis of multiple compounds) compared to already published methods.

A second objective consisted in the study of oxidative stress, therefore the author elaborated several methods to quantify appropriate biomarkers. Oxidative stress represents an imbalance between the reactive oxygen species (and also reactive nitrogen and sulfur species) and the enzymatic/non-enzymatic defence mechanisms of the body. Recent studies suggested a potential role of oxidative stress in the ethiology of different pathologies and the involvement of oxidative stress in the toxic effects of different xenobiotics (including therapeutic drugs). This justified the need to elaborate analytical methods for the quantification of biomarkers that could allow estimating the redox state of a living system, confirming the involvement of oxidative stress in certain diseases or in the toxic effects of certain compounds or to evaluate the protective antioxidant effect of some plant extracts. The research conducted by the author in this field included the elaboration of HPLC and UPLC methods for the quantification of free and/or total MDA (as a marker of lipid peroxidation) and of reduced, oxidized and total glutathione (as a protective agent against oxidative species) in various biological matrices (rat, human or rabbit plasma, microsomal preparations from rat liver, cell lysate).

In the context of evaluating the antioxidant potential of certain plant materials, LC methods were elaborated for the phytochemical characterisation of different plant species, aiming to determine their content in antioxidant compounds. These methods allow selecting the species with the highest antioxidant content, representing a valuable raw material for protective antioxidant products. Moreover, the efficiency of these products is dependent on their quality, which can be evaluated by applying the elaborated methods. The assays elaborated by the author were applied for example to quantify polyphenolic compounds, ruscogenin, neoruscogenin and resveratrol.

Another research area consisted in the study of endocrine disruptors, a group that includes phytoestrogens also. Therefore, the elaboration of LC methods for analysis of plant materials targetted these active compounds also, in order to identify potential sources with high phytoestrogen content, representing a potential alternative in hormone replacement therapy. The elaborated methods were used to quantify phytoestrogens belonging to the groups of isoflavones and coumestans, as aglycones and/or as glycosides.

Another objective of the analytical studies was represented by the elaboration of assays for therapeutic drugs, which were applied in therapeutic drug monitoring, or in the bioavailability or bioequivalence studies of some generic drugs. These studies are essential in order to guarantee therapy effectiveness, while minimizing the risk of adverse effects. LC methods were elaborated for the quantification of pentoxifylline and metabolites and of levosimendan in human plasma.

Besides analytical toxicology the author conducted significant research activity in the field of experimental toxicology, the performed studies focussing on endocrine disruptive compounds (EDCs). Different compounds, in terms of utility and potential

exposure sources, were selected for testing: a) compounds used as antibacterial preservatives in cosmetics or personal care products (butyl paraben) or as antioxidants in food, cosmetics or food packaging materials (butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluene, propyl gallate); active compounds from plants (coumestrol, epigallocatechin gallate); synthetic antidepressants from the group of selective serotonin re-uptake inhibitors. The (anti)estrogenic and/or (anti)androgenic potential of the selected compounds was evaluated by using *in vitro* (reporter gene assays, cell proliferation assay) and *in vivo* (uterotrophic assay) tests. The experimental data suggested that the selected compounds are able to interfere with estrogenic and/or androgenic signalling, presenting endocrine disruptive potential. For some of the compounds, these were the first studies in the literature confirming these effects. Given that in real life the human population is exposed to mixtures of potential EDCs and that the experimental testing of all possible combinations of EDCs is not feasible, the potential of certain mathematical models to predict the AE or AA effects of binary mixtures (of compounds for which the IC₅₀ parameter could be determined in the individual testing) was evaluated. The results confirmed that the dose addition model is capable of predicting the AE and AA effect of the binary mixtures in the selected cell lines. The results of these studies highlight the risk associated with human exposure to mixtures of potential EDCs even at concentrations/doses with no effect in case of individual testing of the components.

After defending the PhD thesis, the scientific activity of the author materialised in the publication of 25 full text research papers in ISI-quoted journals (15 as main author), 5 full text papers in BDI journals (as co-author), 13 abstracts in ISI-quoted journals, 1 book chapter at a prestigious international publisher (as first author) and 4 book chapters at Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu". The author's Hirsch index is 7, according to both ISI Thomson and Scopus platforms. After 2007, the author was the director of a national research grant, member of the research team in other 7 national research projects and mentor in 3 projects (from which one was a national competitive project). For professional training the author attended a series of courses and internships abroad. During the post-doctoral period he attended numerous national and international scientific events.

The teaching activity at the Toxicology Department after defending the PhD thesis consisted in toxicology courses and lab work with 4th year students of the Faculty of Pharmacy and the second year students of the Faculty of Health Sciences, courses and lab work in two Master's programs at the Faculty of Pharmacy and in one Master's program at the Faculty of Medicine, 1 optional course (in romanian, english and french) for the first year students of the Faculty of Dental Medicine and 1 course in the doctoral program. As part of the teaching activity, the author was the coordinator of 39 Diploma Thesis and 11 Dissertation Thesis and elaborated the necessary support material for the courses and lab activities in which he was involved in.

Concerning the scientific activity, in the future, the author aims to develop the research directions that he approached after the PhD defense, both in the field of analytical and experimental toxicology. Therefore one objective is to elaborate, optimize and validate simple, fast and sensitive methods for the analysis of illicit drugs, therapeutic agents, or endogenous compounds (as potential biomarkers) from samples of human or animal origin and active compounds from plant material. Whenever possible a multi-analyte method will be used, an approach frequently encountered in recent research papers.

In the case of oxidative stress a more complex approach is intended, by monitoring several additional biomarkers (e.g. protein or nucleic acid oxidation products). In the field of experimental toxicology, besides studies on oxidative stress, additional studies evaluating mitochondrial dysfunction will be performed (influence of xenobiotics on the mitochondrial electron transport chain complexes and ATP synthesis as well as mitochondrial transient permeability pore opening) as a potential explanation for the toxicity of certain xenobiotics or as a possible mechanism involved in different pathologies.

The studies aiming to identify and evaluate potential EDCs will be continued and developed also, focusing mainly on the evaluation of mixtures and applying additional *in vitro* and/or *in vivo* tests in order to investigate several mechanisms that could explain the endocrine disruptive effect of the evaluated compounds.

A major role in achieving the proposed objectives can be attributed to the consolidation of the research team from the department, the continuous staff training, the investment in the infrastructure and the maintenance of the existing collaborations with other laboratories (national and abroad), and initiating new collaborations. Therefore research projects will be submitted in order to obtain the necessary financial support. Increasing the visibility of the team will be guaranteed by disseminating the results through presentations at prestigious scientific events, and by publishing articles in ISI-rated journals (Q1, Q2).

As far as the teaching activity is concerned, the future plans include continuous updating the course's material (level of license, masters degree, doctoral school) and lab works, the correlation of the practical applications with the presented theoretical information and the editing of didactic materials, book chapters or books in the field of toxicology. A student-centered teaching approach will be used, so that the content of the courses and practical works correlates with what the pharmacist profession and the field of pharmaceutical sciences demand.