

# **Farmakokinetikai paramétereket befolyásoló tényezők**

**PhD értekezés**

**Dr. Bojcsev Sztojan**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Programvezető: Prof. Dr. Fischer Emil, egyetemi tanár,  
MTA doktora**

**Témavezető: Prof. Dr. Fischer Emil, egyetemi tanár,  
MTA doktora**

**Gyógyszertudományi Doktori Iskola**

**Doktori Iskola Vezető: Prof. Dr. Barthó Loránd, egyetemi tanár,  
MTA doktora**

**Prof. Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár,  
MTA doktora**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**2015**

# Tartalom

	oldal
<b>1.Bevezetés – Célkitűzés</b>	<b>5</b>
1.1. A farmakokinetika jelentősége a gyógyszerek hatásában	5
1.2. Farmakokinetikai paraméterek szerepe per os történő gyógyszerbevitel esetén: első passzázs effektus, biológiai hasznosulás	6
1.3. Fenolos karakterű vegyületek sorsa a gyomor – béltraktusban, a p-nitrofenol (PNP), mint modellvegyület	9
1.4. A farmakokinetikai paramétereket befolyásoló vizsgált tényezők:	14
1.4.1. A gyógyszer adagja (dózis)	14
1.4.2. Patológias változások (hiperglikémia)	16
1.4.3. Eltérések a vékonybél különböző szegmentumainak az eliminációs tevékenységében	16
<b>2. Vizsgálati módszerek</b>	<b>18</b>
2.1. Kémiai anyagok, a mérésekhez használt vegyszerek és reagensek	18
2.2. Állatkísérletek: a vizsgált bélszakaszok perfúziója, a hiperglikémia létrehozása, az epefolyás vizsgálata	18
2.3. Műszerek, analitikai eljárások, meghatározások: a p-nitrofenol és a metabolitjainak a szeparálása és mérése, vércukorszint mérés	19
<b>3. Számítások, statisztikai analízis</b>	<b>21</b>
<b>4. Eredmények</b>	<b>22</b>
4.1. A vékonybél biotranszformációs tevékenysége: glukuronid (PNP-G) és szulfát (PNP-S) képzés a p-nitrofenol (PNP) intesztinális perfúziója során	22
4.1.1. Metabolitok megjelenése a vékonybélben különböző PNP-koncentrációjú oldat intesztinális perfúziója esetén: a dóziszfüggés vizsgálata	23
4.1.2. A hiperglikémia hatása a PNP metabolizmusára a vékonybélben	30

4.1.3. Eltérések a különböző bélszakaszok biotranszformációs aktivitásában	37
<b>5. Megbeszélés</b>	44
<b>6. Saját közlemények és kongresszusi prezentációk</b>	54
6.1. Közlemények	54
6.2. Kongresszusi prezentációk	56
<b>7. Irodalom</b>	61
<b>8. Köszönetnyilvánítás</b>	76

## Rövidítések

ADP: adenzin 5'-difoszfát

APS: adenzin 5'-foszfoszulfát

ATP: adenzin-trifoszfát

AUC: Area under the curve (plazmakoncentráció görbe alatti terület)

CYP: citokrórn P- 450 enzimrendszer

MDR 1: Multidrug resistance protein 1

n: kísérletek száma

PAP: 3'-foszfoadenozin-5'-foszfát (adenozin 3'5'-bifoszfát)

PAPS: 3'-foszfoadenozin 5'-foszfoszulfát

PEP: p-etilfenol

PNP: p-nitrofenol

PNP-G: p-nitrofenol glukuronid

PNP-S: p-nitrofenol szulfát

PPI: pirofoszfát

S.E.: Standard error

STZ: streptozotocin

T<sub>m</sub>: transzport maximum

UDP: uridinidfoszfát

UDPGA: uridinfoszfoglukuronsav

UGT: uridin glukuroniltranszferáz

## 1. Bevezetés – Célkitűzés

### 1.1. A farmakokinetika jelentősége a gyógyszerek hatásában

Farmakokinetikán difiníciószerűen a gyógyszereknek a szervezeten belüli sorsát értjük, melynek során az alkalmazott vegyületek mozgásuk folyamán különböző biológiai membránokon áthatolva transzportálódnak (felszívódás, eloszlás, kiválasztás), illetve egyes szervekben, szövetekben kémiaiilag átalakulnak (metabolizmus, biotranszformáció). Kiválasztással természetesen mind az anyavegyületek, mind a metabolitjaik is távozhatnak a szervezetből. A felszívódást és az eloszlást együttesen invázióknak, a metabolizmust és az exkréciót pedig eliminációknak is szoktuk nevezni. Mindezen folyamatok összessége határozza meg tehát a szájon keresztül (per os) beadott gyógyszer aktuális koncentrációját a vérben (plazmában), illetve a különböző szervekben és szövetekben, valamint a hatás helyén, a receptoroknál vagy azok környezetében (49., 50., 51., 52.). Másként fogalmazva, a gyógyszerekkel a szervezetünkben sok minden történhet, azaz a biológiai rendszerek is hatással vannak a gyógyszermolekulákra (farmakokinetika), nemcsak a gyógyszerek fejtenek ki tehát hatást az egyes receptorok és szervek működésére (farmakodinámia). Per os adás esetén alapvetően a farmakokinetikai tényezők határozzák meg a gyógyszerek bejutását (34., 35., 97.) és azok további sorsát a szervezetünkben, valamint azok eliminációját. Ezen folyamatok, illetve lépések nélkül a gyógyszermolekulák nem jutnának el a hatás helyére, pl. az egyes szervekhez vagy receptorokhoz, azaz a farmakokinetikai tényezők alapvető fontosságúak a gyógyszerek hatásában (37., 39., 40., 43., 44., 45.). Felszívódás hiányában vagy rossz felszívódás esetén például a per os adott gyógyszerek nem érik el a terápiás vérszintet, illetve ehhez magasabb dózisokat kell alkalmaznunk.

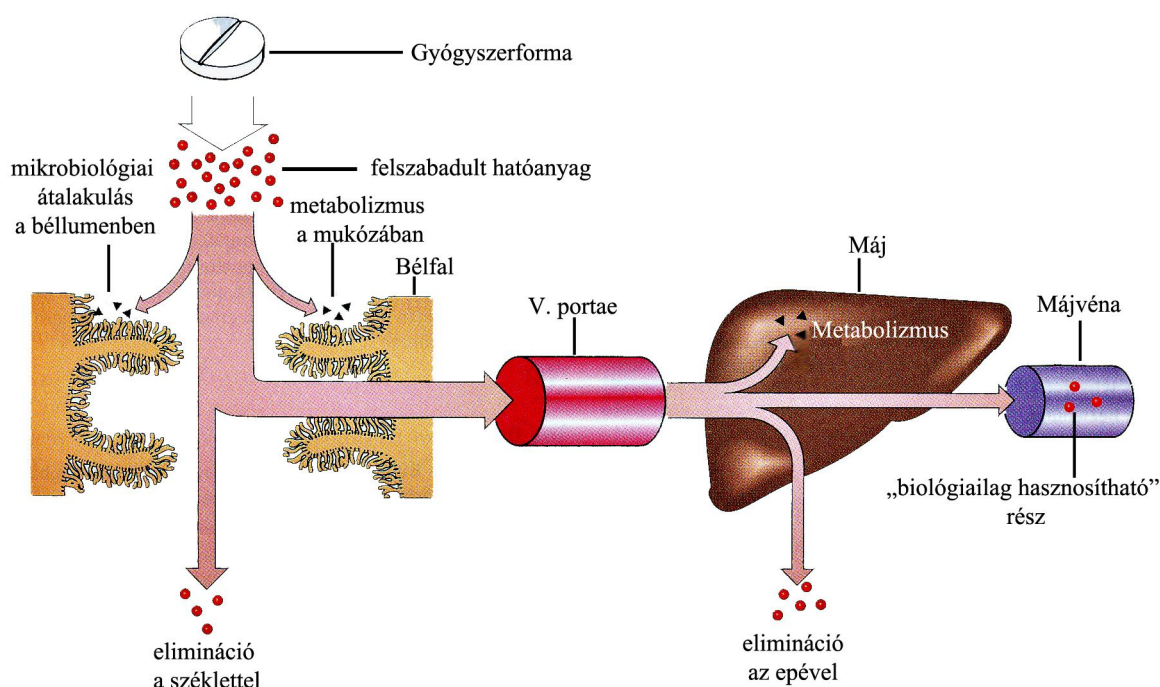
A farmakokinetikának az exkrécióval és a biotranszformációval kapcsolatos lépései (46., 47., 89., 103.) pedig döntő jelentőségűek az elimináció szempontjából, ezek tulajdonképpen a gyógyszerek hatékony koncentrációjának a csökkenését jelentik, tágabb értelemben pedig mindazon folyamatokat, amelyek révén a szervezetünk egy idő után megszabadul a testidegen anyagoktól (xenobiotikumok), beleértve a gyógyszereket is. Az eliminációs folyamatok hiányában a farmakonok elvileg a végtelenségig a szervezetünkben maradnának, de az eliminációban fontos szervek károsodása vagy betegsége (pl. májcirrhosis, nefrotoxicitás stb.) is jelentősen megnyújthatja az

eliminációs féleletidőt, amelynek mind farmakológiai-terápiás, mind toxikológiai szempontból komoly következményei lehetnek.

## **1.2. Farmakokinetikai paraméterek szerepe per os történő gyógyszerbevitel esetén: első passzázs effektus, biológiai hasznosulás**

A gyógyszerek adagolása során a leggyakoribb beviteli forma a szájon keresztül történő (orális, per os) adás, a gyógyszerek legnagyobb mennyiségben ilyen módon kerülnek a szervezetünkbe. Már a felszívódással és az eloszlással egyidejűleg, illetve azt követően megindulnak azonban az eliminációs folyamatok is (7., 10., 11., 12.), amelyek a rossz felszívódással és az esetleges tárolással és felhalmozódással (pl. hepatikus akkumuláció) együtt csökkentik a beadott gyógyszernek (dózis) azt a részét, amely eljut a szisztémás keringésbe és a hatás helyére, azaz biológiai és farmakológiai hatást fejt ki (biológiai hasznosulás, hasznosíthatóság – bioavailability). A per os adott farmakonoknak először tehát át kell jutnia a béltraktuson és a májon (első passzázs) ahhoz, hogy a véráramba kerülhessenek (5., 71., 83., 84., 101.) . A béltraktus felszívódási és eliminációs viszonyaitól, a máj raktározási és biotranszformációs valamint exkréciós tevékenységétől és kapacitásától függően a per os beadott gyógyszer mennyiségének csak egy része, egy bizonyos hányada éri el a véráramot, azaz az első passzázs effektustól függően kisebb vagy nagyobb mértékű farmakológiai hatás, illetve biológiai hasznosulás várható (75., 79., 98., 109.). Ezeknek a tényezőknek a jelentőségét és egymáshoz való kapcsolatát demonstrálja a következő ábra.

1. ábra. Biológiai hasznosíthatóság és preszisztémás elimináció.

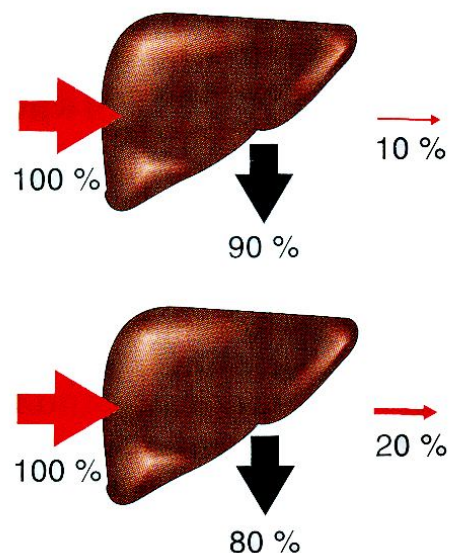


Az ábra jól demonstrálja, hogy a per os adott gyógyszerkészítményből (pl. tabletta) a hatóanyagnak először fel kell szabadulnia, ezt követően pedig különböző folyamatokban vehet részt. Az is egy lehetőség, hogy eltérő okok miatt felszívódás nélkül áthalad a gyógyszer a bélcsatornán és a széklettel eliminálódik. Átalakulhat a hatóanyag a bélben lévő baktériumok működése révén vagy metabolizálódhat az enterocitákban. Az említett folyamatokban részt nem vevő molekulák változatlan formában felszívódnak, majd a vena portae-n keresztül a májba kerülnek. Itt ismét több lehetőség van a farmakonok további sorsát illetően: metabolizálódhatnak a májban, a metabolitok és az anyavegyületek változatlan formában is eliminálódhatnak a béltraktusból a biliáris exkréció következtében. Az epével kiválasztódó farmakonok egyrésze a bélcsatornából felszívódva ismét a májba jut (enterohepatikus cirkuláció) és ugyanazon folyamatokban vehet részt, mint az eredetileg felszívódott molekulák. További lehetőség, hogy a hatóanyag a preszisztémás (a szisztémás keringésbe jutás előtti) eliminációban részt nem vevő hányada a máj vénás rendszerén keresztül a szisztémás keringésbe jut, tulajdonképpen ez a frakciója képezi a per os adott gyógyszernek a biológiailag hasznosítható részét, amely képes farmakológiai hatást kiváltani (biológiai hasznosíthatóság) (2., 65. old.).

A biológiai hasznosulás mértékét számszerűen is kifejezhetjük, ez azt a százalékos arányt jelenti, amely az intravénás és a per os beadott dózist követően a plazma (vér) gyógyszerkoncentrációinak az eltéréséből vagy a plazmakoncentrációk által meghatározott görbék alatti területek különbségéből, illetve azok arányából (hányadosából) adódik. Tökéletes felszívódás és jó biológiai hasznosulás esetén a plazmakoncentrációk által határolt terület per os adás után azonos lehet az intravénás adásnál mérhető területtel (a biológiai hasznosulás 100%) annak ellenére, hogy a plazmakoncentrációk görbéi eltérő lefutást mutatnak. Minden ellenkező esetben a per os adás után mért érték ennél kisebb, ennek az a gyakorlati következménye, hogy az i.v. adás után mért plazmaszint, illetve a várható farmakológiai hatás csak magasabb per os dózissal érhető el.

Az első passzázs effektus és a biológiai hasznosíthatóság közötti összefüggést demonstrálja a 2. ábra.

2. ábra. Egy gyógyszer biológiai hasznosíthatóságának a függése az első passzázs effektus mértékétől.



Egy olyan gyógyszernél, amely a bélből teljes mértékben (100 %-ban) felszívódik, ha a májon keresztül történő első passzázs effektus során 90 % extrahálódik, a biológiai hasznosulás 10 %-ot tesz ki (az ábra felső része). Abban az esetben, ha a hepatikus extrakció 90-ről 80 %-ra csökken, akkor a biológiai hasznosíthatóság 20 %-ra,



azaz a duplájára nő (az ábra alsó része). Ebből a tényből, illetve megfontolásból az is következik, hogy olyan gyógyszereknél, melyeknél az első passzázs effektus nagyon kifejezett (magas), az extrakció akár kismértékű változása is nagyon jelentős eltérést okozhat a biológiai hasznosíthatóságban (2., 67. old.).

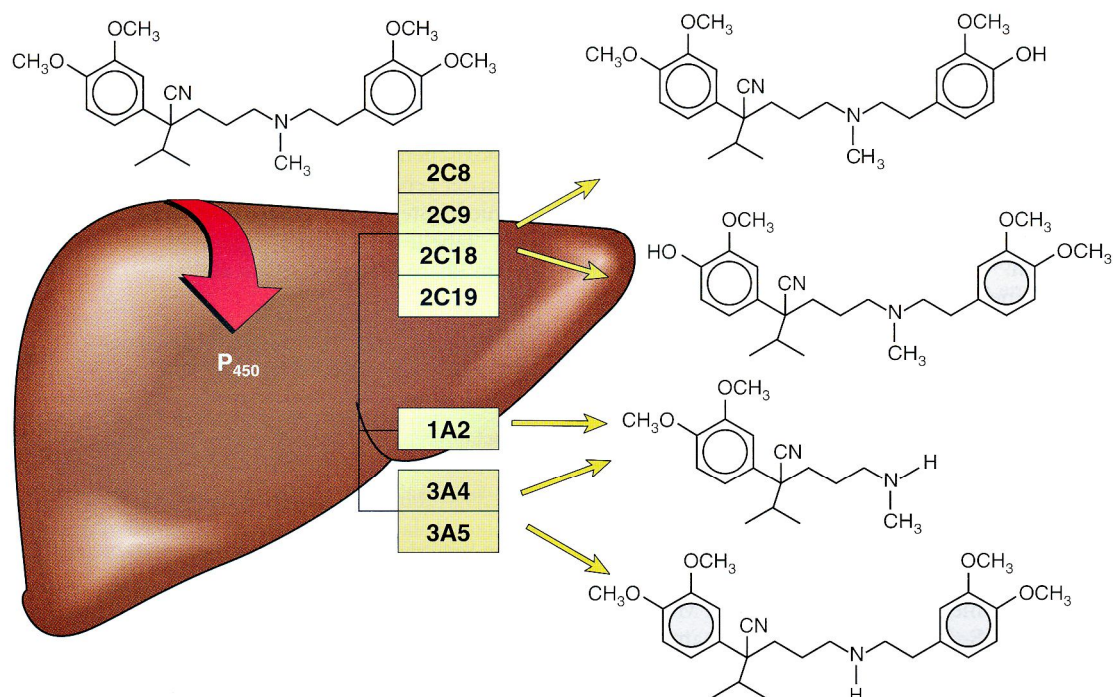
Ezek a körülmények teszik fontossá és praktikus, terápiás szempontból is jelentőssé a vékonybél és a máj transzport folyamatait és biotranszformációs tevékenységét (57., 63., 64., 68., 69., 72.), azaz eliminációs funkciójukat és kapacitásukat, valamint ezek vizsgálatát (33., 106., 107.).

### **1.3. Fenolos karakterű vegyületek sorsa a gyomor-béltraktusban, a p-nitrofenol (PNP), mint modellvegyület**

Az értekezéssel kapcsolatos kísérletek során elsősorban a szájon keresztül történő gyógyszerbevitellel összefüggő kérdéseket vizsgáltuk, ezért olyan kísérleti elrendezést állítottunk össze, illetve alkalmaztunk, amely lényegében ennek a helyzetnek felel meg vagy ehhez nagyon hasonló. Az állatkísérletek részletes leírása a módszertani fejezetben található, itt csak annyit említünk meg röviden, hogy egy in vivo kipreparált bélszakaszt perfundáltunk olyan fiziológias oldattal, amely különböző koncentrációjú PNP-t tartalmazott. A perfúziós médiumból különböző időpontokban mintákat vettünk és azokban meghatároztuk az anyavegyület és a metabolitok koncentrációját, illetve kiszámítottuk azok mennyiségét.

A gyógyszerek metabolizmusa különböző szervekben és eltérő reakciókkal történhet (76., 77., 78., 80., 81., 82., 85., 99.). A gyógyszermetabolizmus tekintetében a legfontosabbnak tartott szerv a máj, de más szervek (bél, vese, tüdő, agy, stb.) is képesek a gyógyszermolekulák kémiai átalakítására (7., 18., 36., 41., 42., 58., 93., 96., 117.). A biotranszformációs reakciók két nagy csoportra oszthatók: első fázisú vagy funkcionalizáló, illetve második fázisú vagy konjugációs reakciókra.

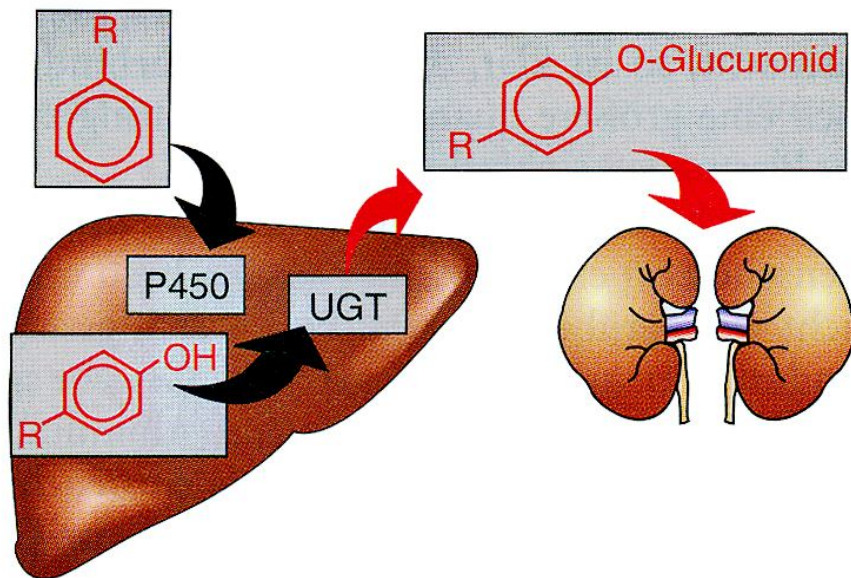
### 3. ábra. A Verapamil első fázisú metabolizmusa.



Az ábra a Verapamil metabolizmusának a példáján mutatja be az első fázisú metabolikus reakciók multiplicitását. A különböző szám és betűjelzések eltérő enzimsaládokat (familia, szubfamilia) és izoformákat jelentenek: pl. a 2C19 a 2-es familia C szubfamiliájához tartozó 19-es izoformát jelöli. Ezek a reakciók a májban a citokróm P - 450 izoenzimek részvételével alakítják át az anyavegyületet. Látható, hogy a biotranszformáció révén ebben az esetben egy vegyületből több, különböző típusú metabolit keletkezik (2., 51. old.).

A következő ábra az első és második fázisú metabolikus reakciókat, azok kapcsolatát és sorrendiségét mutatja be sémásan.

4. ábra. Az első és második fázisú metabolikus reakciók sémás ábrázolása.



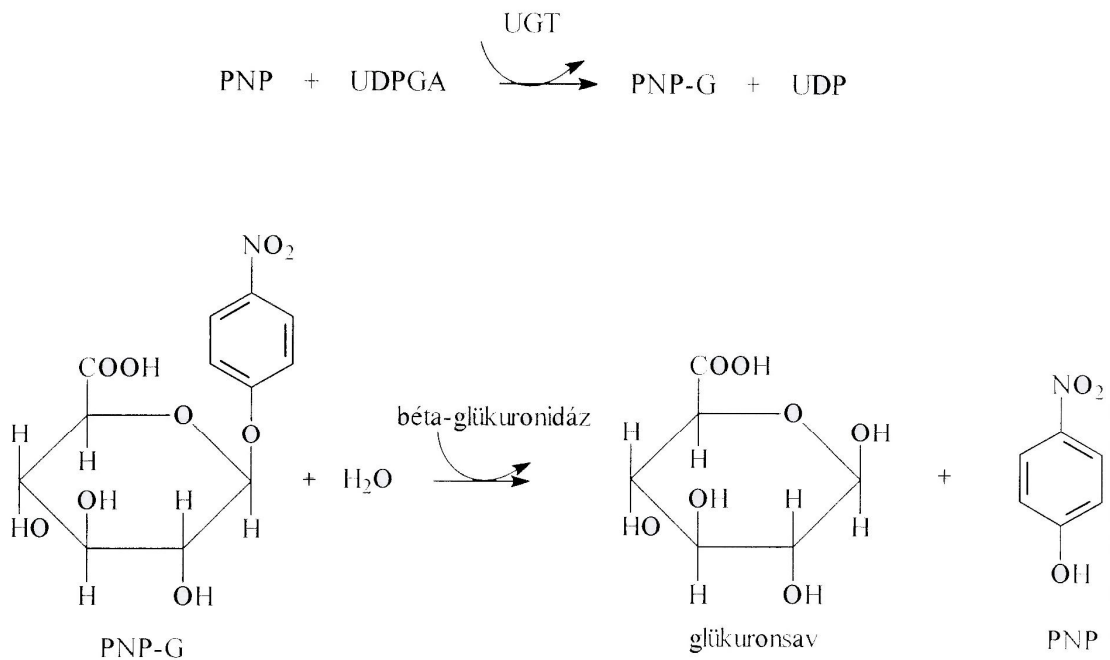
Az ábrán látható, hogy egy lipofil vegyület benzolgyűrűjére a citokróm P – 450 enzimrendszer által katalizált oxidációs reakció során egy hidroxilcsoport kerül. Ez az első fázisú reakció megteremti annak a lehetőségét, hogy a metabolit glukuronsavval tudjon konjugálódni (második fázisú reakció). Minthogy a képződő glukuronidok jóval polárosabbak az előző struktúráknál (kiindulási vegyületeknél), lényegesen gyorsabban és eredményesebben tudnak eliminálódni, például renális exkrécióval (2., 48. old.).

Az értekezésben foglalt kísérletek során elsősorban a vékonybél szerepére koncentráltunk és a konjugációs reakciókat vizsgáltuk. A vékonybél metabolikus aktivitását és eliminációs tevékenységét azért választottuk vizsgálataink tárgyának, mert a szájon keresztül adott gyógyszerek először a béltraktust érik el és az itt metabolizálódó vagy a széklettel eliminálódó gyógyszer-molekulák már nem jutnak tovább, azaz sem a májat, sem a szisztémás keringést nem érik el (62., 66., 93., 99., 100.), tehát hatást sem fejthetnek ki (jelentős az első passzázs effektus, alacsony a biológiai hasznosulás). A témaválasztás másik oka pedig az volt, hogy az utóbbi időben kiderült, hogy a máj kétségtelenül fontos szerepe mellett az extrahepatikus gyógyszermetabolizmus (57., 70.), például az intesztinális biotranszformáció is nagyon jelentős tényező lehet a farmakonok eliminációjában (9., 58., 60., 61., 68., 112.).

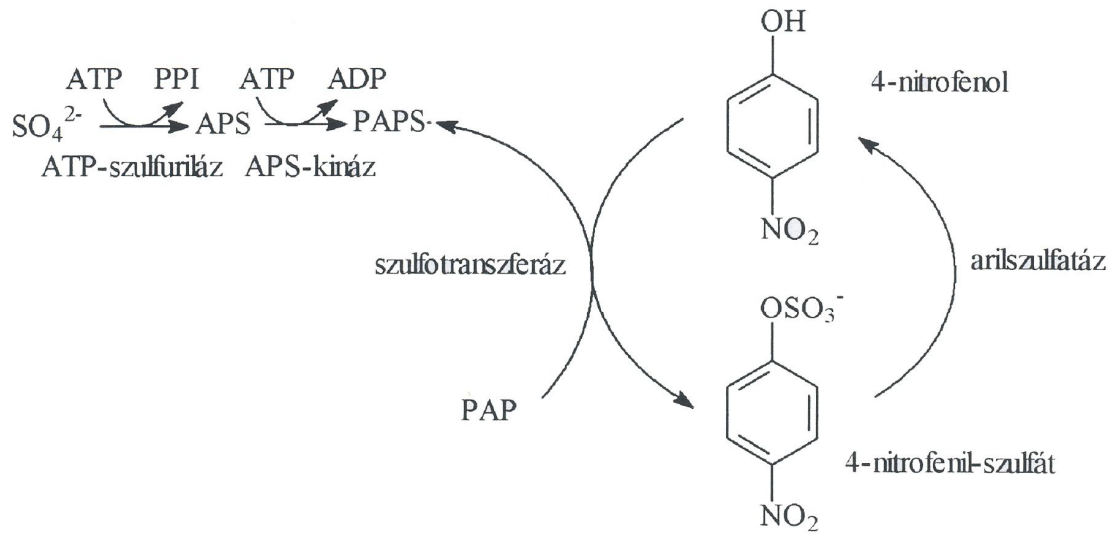
A p-nitrofenolt azért választottuk modellvegyületnek, mert számos farmakon és xenobiotikum tartalmaz fenolos strukturát és hidroxil csoportot, ezért ezek

metabolizmusa a p-nitrofenoléhoz hasonló (119.). Joggal feltételezhető tehát, hogy a PNP vizsgálatával kapott eredmények és következtetések a hasonló struktúrájú más vegyületekre és gyógyszerekre is érvényesek és mértékadóak lehetnek. Továbbá a p-nitrofenolról ismert, hogy szinte kizárólag konjugációs reakciókkal metabolizálódik (8., 23., 54., 56.) és ezek révén két metabolit keletkezik: glükuronsavval történő konjugációval p-nitrofenol glükuronid (PNP-G), szulfáttal történő konjugációval pedig p-nitrofenol szulfát (PNP-S). A két metabolit meghatározására ismert és megbízható módszerek állnak rendelkezésre (8., 23.), ezeket bizonyos tekintetben magunk tovább is fejlesztettük (4., 5., 13.). A glükuronid képződését az UDPA-glükuroniltranszferáz katalizálja, hidrolízisében pedig a béta-glükuronidáz játszik szerepet. A szulfátképzést katalizáló enzim a szulfotranszferáz, a konjugátum hidrolízisében pedig az arilszulfatáz vesz részt. Ezeket a reakciókat mutatja be a következő két ábra.

5. ábra. A p-nitrofenol-glükuronid (PNP-G) képződése és hidrolízise



6. ábra. A p-nitrofenol szulfáttal történő konjugációja és a szulfát konjugátum (PNP-S) hidrolízise



PAP – adenzin 3'5'-biszfoszfát

APS – adenzin 5'-foszfoszulfát

ADP – adenzin 5'-difoszfát

ATP – adenzin-trifoszfát

PAPS – 3'-foszfoadenzin 5'-foszfoszulfát

PPI - pirofoszfát

## **1.4. A farmakokinetikai paramétereket befolyásoló vizsgált tényezők:**

### **1.4.1. A gyógyszer adagja (dózis)**

### **1.4.2. Patológiás változások (hiperglikémia)**

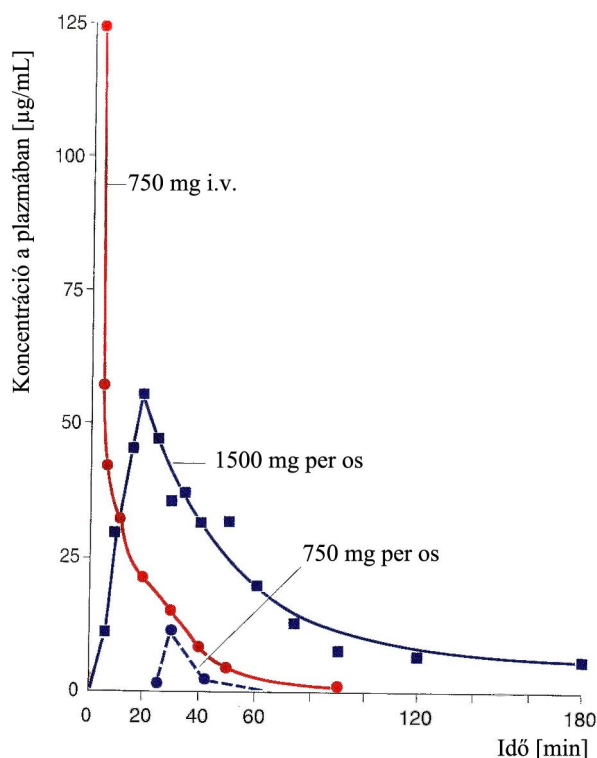
### **1.4.3. Eltérések a vékonybél különböző szakaszaiban**

Ismert, hogy farmakokinetikai paramétereket számos tényező befolyásolja (87., 91., 94., 95., 105., 111., 114., 115., 118., 122.), ezek közül három olyat vizsgáltunk, amelyek mindegyike gyakorlati, farmakoterápiás szempontból is fontos: az alkalmazott gyógyszer mennyisége (dózis), a patológiás állapotok közül a hiperglikémia, amely a diabétesz vezető tünete, valamint a vékonybél különböző szegmenseinek a metabolikus aktivitása.

### **1.4.1. A gyógyszer adagja (dózis)**

A gyógyszerek dózisa a farmakológiában az egyik legfontosabb paraméter, alapvetően befolyásolja és meghatározza a farmakológiai és terápiás hatásokat. A dózis emelésével a farmakológiai hatás növelhető, de a dózis változásával természetesen a farmakokinetikai paraméterek is jelentősen módosulhatnak (86.). Az első passzázs effektusnak a gyógyszer dóziséval való függését illusztrálja a következő ábra.

7. ábra. Az első passzázs effektus dóziszfüggő változása.



Az ábra a fluorouracil beadása után mért plazmakoncentráció értékeket tünteti fel. A fluorouracil nagymértékben metabolizálódik a májban, azaz az első passzázs effektus jelentős. Ez az oka annak, hogy az ugyanabban a dózisban (750 mg) történő intravénás és per os adást követően a fluorouracil plazmakoncentráció értékei nagyon jelentősen eltérnek egymástól, a koncentrációgörbék alatti terület (AUC) per os adás után csak egy töredéke az i.v. adás után meghatározott értéknek. Rendkívül érdekes azonban, hogy ha szájon keresztül az említett dózis dupláját (1500 mg) alkalmazták, akkor többszörösére (13- szorosára) nőtt a plazmakoncentráció alatti terület. Ennek nyilvánvalóan az a magyarázata, hogy ennél a magas dózissal az első passzázs effektusban döntő folyamat, illetve metabolizáló enzim szaturálódott, a biotranszformáció nem nőtt tovább, ezért lényegesen, szinte ugrásszerűen fokozódott a plazmában az anyavegyület koncentrációja (19.).

A karrier-mediált transzportfolyamatok telíthetők, azaz a transzport maximum ( $T_m$ ) elérése után már nincs további növekedés a transzportban a dózis emelésével. Az 7. ábra adatai szerint lényegében ugyanez a helyzet az enzimreakcióknál is, a szaturációt követően nem képződik a dózis növelésével arányosan több metabolit, következményként ugrásszerűen megemelkedik az anyavegyület koncentrációja,

esetleg pregnánsan fokozódó farmakológiai hatással, néha pedig toxikológiai következményekkel is számolnunk kell. Többek között ezért is vizsgáltuk, hogy a PNP dózisának az emelésével a vékonybél metabolikus aktivitása (PNP-G és PNP-S megjelenése) és intesztinális eliminációja hogyan változik, illetve milyen mértékben növelhető.

### **1.4.2. Patológiás változások (hiperglikémia)**

Patológiás állapotok, különböző betegségek is módosíthatják a farmakokinetikai paramétereket és a gyógyszerek eliminációját. Az értekezésben ismertetett kísérletek a diabétessel kapcsolatos egyik fő tünetnek, a hiperglikémia hatásának a vizsgálatára irányultak. A diabétesz krónikus megbetegedés, amely egy komplex anyagcserezavart jelent hormonális, transzport és egyéb változásokkal. Ennek egyik vezető tünete kétségtelenül a magas vércukorszint, a hiperglikémia. A diabétessel kapcsolatban ismert, hogy ennek során a különböző vegyületek, de a gyógyszerek hatása és a farmakokinetikája is változhat (14., 15., 48.). Azt a kérdést kívántuk vizsgálni, hogy az akután, glukóz infúzióval létrehozott hiperglikémia befolyásolja-e a biotranszformációs folyamatokat, konkrétan a PNP metabolizmusát a vékonybélben. Ez a kérdés, illetve ennek a megközelítése és vizsgálata akkor is érdekes, ha szem előtt tartjuk azt a tényt, hogy a hiperglikémia nem azonos minden tekintetben a klinikailag manifesztálódó cukorbetegséggel, de még a streptozotocinnal (STZ) kiváltott experimentális diabétessel sem.

### **1.4.3. Eltérések a vékonybél különböző szakaszaiban**

Bizonyos adatok arra utalnak, hogy a béltraktus különböző szakaszai eltérő módon vesznek részt nemcsak olyan fiziológiai folyamatokban, mint a felszívódás, hanem például differenciák figyelhetők meg a farmakonok intesztinális eliminációjában is (99., 100., 113.). A kérdés gyakorlati jelentőségét még hangsúlyosabbá teszi az a tény, hogy különböző betegségek jellegzetesen vagy döntő mértékben érintik a gasztrointesztinális rendszer egyes szegmentumait, pl.: gyomor- vagy duodenális fekély, enteritis, gyulladás a vastagbélben (colitis ulcerosa, Crohn-betegség) stb. Bizonyos rezekciós műtéti eljárásoknál pedig egyes bélszakaszok kerülnek eltávolításra, így



különböző funkciók eshetnek ki vagy változhatnak meg. A kísérleteink során azt a konkrét kérdést kívántuk vizsgálni, hogy a vékonybél különböző szegmensei (proximális-, disztális jejunum, valamint a terminális ileum) milyen mértékben vesznek részt a gyógyszerek metabolizmusában, van-e kimutatható eltérés a PNP biotranszformációjában, a PNP-G és a PNP-S megjelenésében a béllumenben a különböző szakaszok esetében.

## **2. Vizsgálati módszerek**

### **2.1. Kémiai anyagok, a mérésekhez használt vegyszerek és reagensek**

A p-nitrofenolt, a metabolitjait (p-nitrofenol glukuronid és szulfát), valamint a hiperglikémia létrehozásához szükséges glukózt a Sigma Aldrich cégtől (Budapest) szereztük be. Az összes többi vegyszer és reagens analitikai vagy HPLC tisztaságú, illetve minőségű volt. A bélperfúzióhoz használt izotóniás oldat a következő összetételű volt (mmol/l): NaCl 96,4; KCl 7,0; CaCl<sub>2</sub> 3,0; MgSO<sub>4</sub> 1,0; Nátrium foszfát puffer (pH 7,4) 0,9; TRIS puffer (pH 7,4) 29,5; glukóz 14,0; mannitol 14,0.

### **2.2. Állatkísérletek: a vizsgált bélszakaszok perfúziója, a hiperglikémia létrehozása, az epefolyás vizsgálata**

A vizsgálatokat 220-250 g-os hím patkányokon végeztük. Az állatokat uretánnal (1,2 g/kg i.p.) narkotizáltuk. A hasfalat a középvonalban hosszanti irányú metszéssel felnyitottuk és a duodenum utáni jejunális szegmentumot (proximális jejunum), egyes kísérletekben a disztális jejunumot, illetve a terminális ileumot (valamennyi esetben kb. 10 cm hosszban) kanüláltuk in vivo. A szegmentális különbségek vizsgálatára irányuló kísérletek kivételével valamennyi esetben a duodenum utáni (proximális jejunum) bélszakasz perfúziója történt. A béllument átöblítettük meleg (37°C-os) izotóniás oldattal a bélben lévő táplálék maradványok eltávolítása céljából, majd 4-5 ml levegő átfújásával üressé tettük. A béllument ezt követően 13 ml/min. sebességű izotóniás médiummal perfundáltuk a kipreparált bélszegmentum két végébe helyezett kanül segítségével recirkulációs módszerrel, az oldat különböző koncentrációjú PNP-t tartalmazott. A kanülált szegmentumból kifolyó perfúziós folyadékból 250 µl-es mennyiségű mintákat vettünk különböző időpontokban. A kezdeti perfúziós volumen 15 ml volt, a perfúzió 90 percig tartott. Az állatokat és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37°C-on tartottuk.

A hiperglikémia létrehozására a v.jugularisba kötött kanülon keresztül különböző koncentrációjú glukóz oldatot infundáltunk. A hiperglikémia gyorsabb elérése érdekében egy kezdeti glukóz mennyiséget adtunk az állatoknak intravénásan,

ily módon a kívánt magas vércukorszintet gyorsan el tudtuk érni, illetve a glukóz infúzióval a szükséges időtartamban fenn tudtuk tartani.

Az epefolyás vizsgálatára irányuló kísérletekben az epevezetékét egy vékony műanyagcsővel (PE-10) kanuláltuk, amelyen keresztül az epét folyamatosan (15 perces periódusokban) gyűjtöttük.

A kísérletes diabéteszt streptozotocin (STZ) intravénás beadásával (65 mg/kg) hoztuk létre.

### **2.3. Műszerek, analitikai eljárások, meghatározások: vércukorszint mérés, a PNP és a PNP metabolitok (PNP-G, PNP-S) szeparálása és mérése**

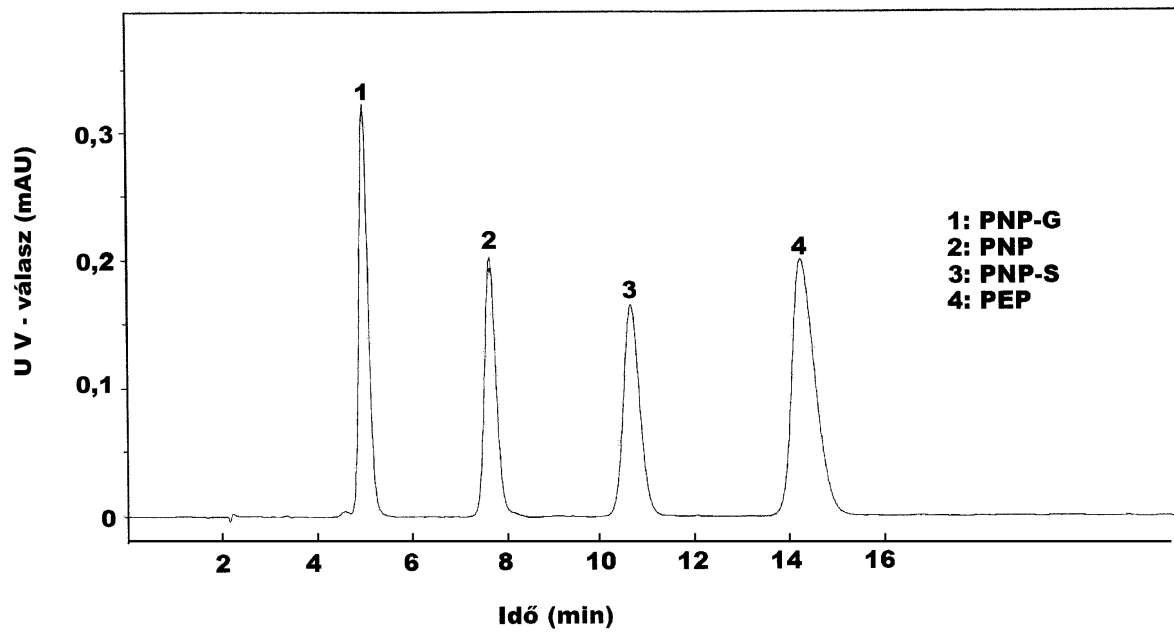
A HPLC-rendszer Varian 2010 pumpából, Rheodyne 7725 i injektorból és UV-Detector 308 detektorból állt. Az adatok gyűjtése és integrálása Power Chrom 280 adat modul és software segítségével történt. Az elválasztásokhoz Nucleosil 100 C 18 fordított fázisú oszlopot (250 mm x 4,6 mm I.D., 10 µm részecske nagyság) használtunk.

A minták analízise és kvantifikációja (mennyiségi meghatározása) a korábbi hasonló kísérleteink során kifejlesztett és alkalmazott módszerekkel történt (4., 5.). Röviden összefoglalva: a mobil fázis metanolt és desztillált vizet tartalmazott (50:50, v/v %) illetve 0,01 M tetrabutil-ammonium bromidot a PNP metabolitok meghatározására a perfuzátumból vett mintákban. A mintákat hűtőszekrényben (-20 °C) tároltuk, az analízis előtt a perfuzátumokat felráztuk és 3000 g-vel centrifugáltuk 10 percig. Az eluens áramlási sebessége 1,2 ml/min. volt. A mintákból 20µl-t használtunk a detektáláshoz, amely 290 nm-nél történt, mert előzetes mérések során ez a hullámhossz bizonyult optimálisnak a PNP, a PNP-G és a PNP-S egyidejű mérése szempontjából. Az analízis előtt a minták hőmérséklete a szobahőmérséklettel azonos volt.

A vércukorszintet Accu-Chek® digitális vércukor mérővel mértük.

A PNP-nek és a metabolitjainak a HPLC kromatogramját mutatja be a 8. ábra. (PNP: p-nitrofenol, PNP-G: p-nitrofenol glukuronid. PNP-S: p-nitrofenol szulfát, PEP: p-etilfenol)

8. ábra. A PNP-nek és metabolitjainak a kromatogramja (HPLC)



### 3. Számítások, statisztikai analízis

A PNP jelenlétét, illetve a PNP metabolitok megjelenését a béllumenben a mért luminális koncentrációjuk és az aktuális perfúziós volumen szorzatával számítottuk ki.

A metabolitok szeparálása és a mennyiségének a meghatározása a perfuzátumból vett mintákból HPLC módszerrel történt a metodikai fejezetben leírtaknak megfelelően. Ezeknek a méréseknek az alapján számítottuk ki a metabolitok koncentrációját a perfúziós oldatban. A perfúziós médium kezdeti volumene 15 ml volt, amely a perfúzió időtartama alatt a mintavételek következtében csökkent, illetve a bél folyadékot exkretáló vagy felszívó tevékenysége révén is módosulhatott. Mindkét tényező figyelembevételével történő korrekció segítségével számítottuk ki az aktuális perfúziós volument egy adott időpontra vonatkozólag. Az ily módon meghatározott volumen és a mért koncentráció szorzatával pontosan ki tudtuk számítani a bármely időpontra vagy időtartamra vonatkozó luminális megjelenését, illetve jelenlétét a metabolitoknak. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik ( $n = 5-10$ ). A kumulatív luminális megjelenés egy adott időtartamra vagy a kísérlet teljes idejére (90 perc) vonatkozó összesített értéket jelenti.

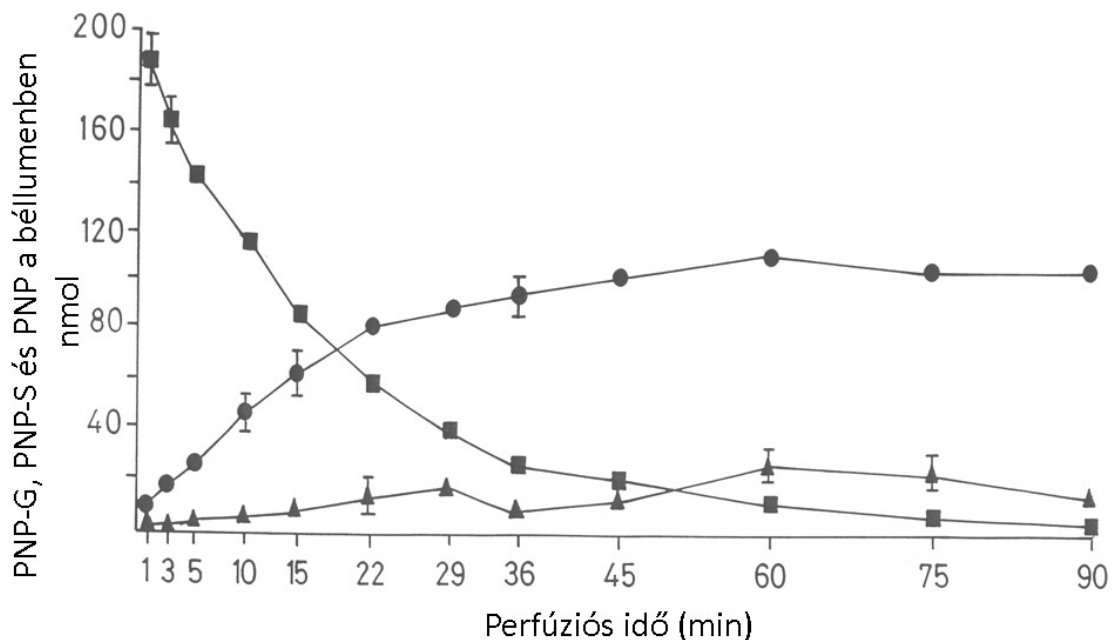
A szignifikanciát az egymintás Student-féle  $t$ -teszttel számítottuk ki.

## 4. Eredmények

### 4.1. A vékonybél biotranszformációs tevékenysége: glukuronid (PNP-G) és szulfát (PNP-S) képzés a p-nitrofenol (PNP) perfúziója során

Korábbi vizsgálatok (26., 30.) kimutatták, hogy tengerimalac vékonybélben a PNP luminális perfúziója során viszonylag gyorsan és nagy mennyiségben megjelennek a metabolitok (PNP-G, PNP-S) a bél biotranszformációs aktivitása következtében (9. ábra).

9. ábra. A PNP-G (▲) és a PNP-S (●) megjelenése és a PNP (■) eltűnése (nmol) a béllumenben 20  $\mu$ M-os PNP-koncentrációjú izotóniás oldat luminális perfúziója során tengerimalacban. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n=5). Az S.E. nincs feltüntetve azokban az esetekben, melyeknél a szórás nem haladta meg a használt szimbólum által reprezentált értéket.



Az ábra adatai egyértelműen demonstrálják, hogy a vékonybél rövid idő alatt hatékonyan metabolizálja a PNP-t. Ezt igazolja az a tény, hogy a PNP mennyisége jelentősen csökkent a vizsgált kísérleti periódus alatt (90 perc), ugyanakkor megjelentek

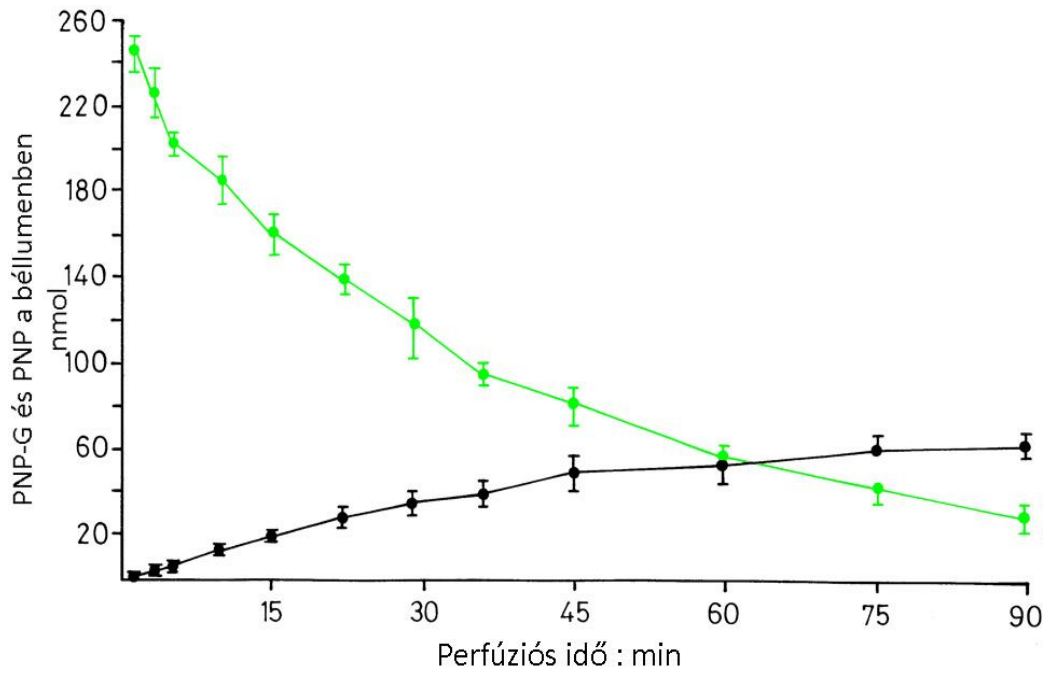
a metabolitok (PNP-G, PNP-S) a béllumenben. Tengerimalac esetén a meghatározó metabolit a szulfát konjugátum volt, melynek a mennyisége 90 perc alatt az alkalmazott PNP-nek mintegy 50 %-át tette ki.

#### **4.1.1. Metabolitok megjelenése a vékonybélben különböző koncentrációjú PNP intesztinális perfúziója esetén: a dózis - függés vizsgálata**

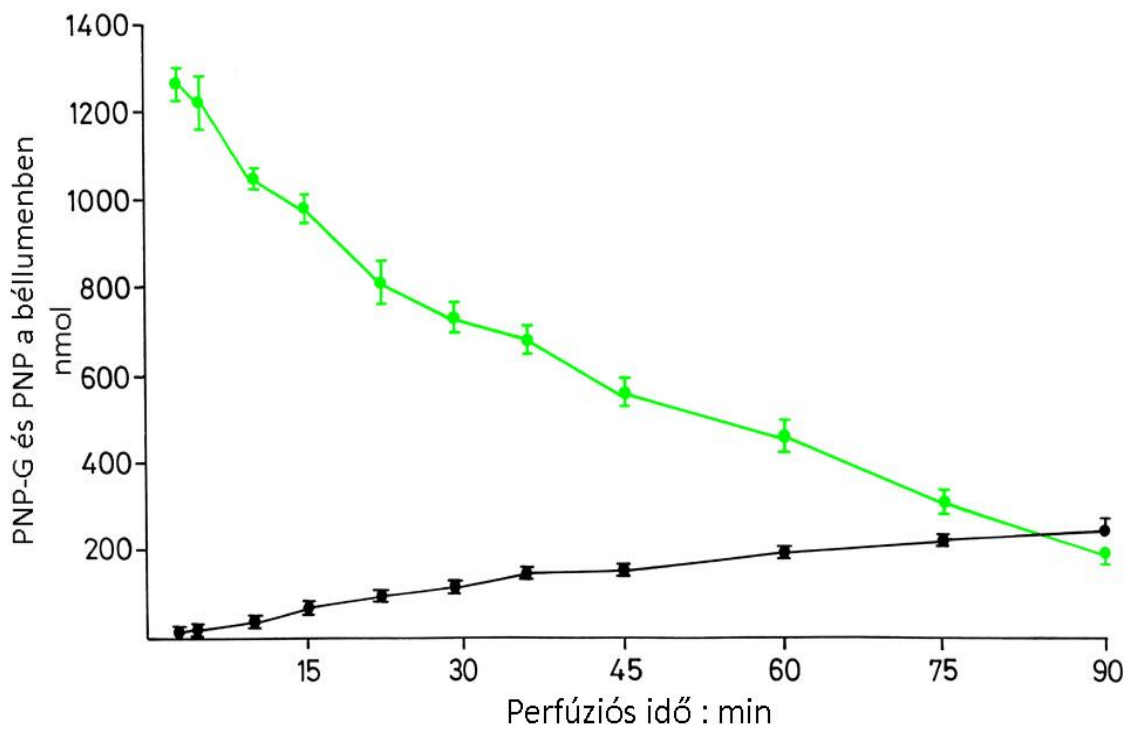
Jelen kísérletsorozatban patkányban vizsgáltuk a PNP intesztinális metabolizmusát különböző koncentrációjú (20-100-500-1000  $\mu\text{M}$ ) PNP luminális perfúziója esetén és azt tapasztaltuk, hogy a PNP-metabolitok ez esetben is megjelentek a béllumenben. Érdekes módon patkányban azonban a tengerimalacnál megfigyelt változásokkal ellentétben a glukuronid konjugátum jelent meg nagyobb mértékben a vékonybél lumenében és csak jóval kisebb arányban tudtuk kimutatni a szulfát konjugátumot. Mások is találtak eltéréseket a metabolikus reakciókban, például az UDP-glukuroniltranszferáz aktivitásban különböző állatfajoknál (96.).

A következő ábrák (10.-11.-12.-13.) bemutatják a patkány vékonybelében döntő mértékben megjelenő PNP-G mennyiségét különböző koncentrációjú PNP (20-100-500-1000  $\mu\text{M}$ ) luminális perfúziója során.

10. ábra. A PNP-G (●) kumulatív luminális megjelenése és a PNP (●) eltűnése (nmol) a jejunális bélkacs izotóniás médiummal történő perfúziója esetén 20  $\mu$ M PNP jelenlétében. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 5).

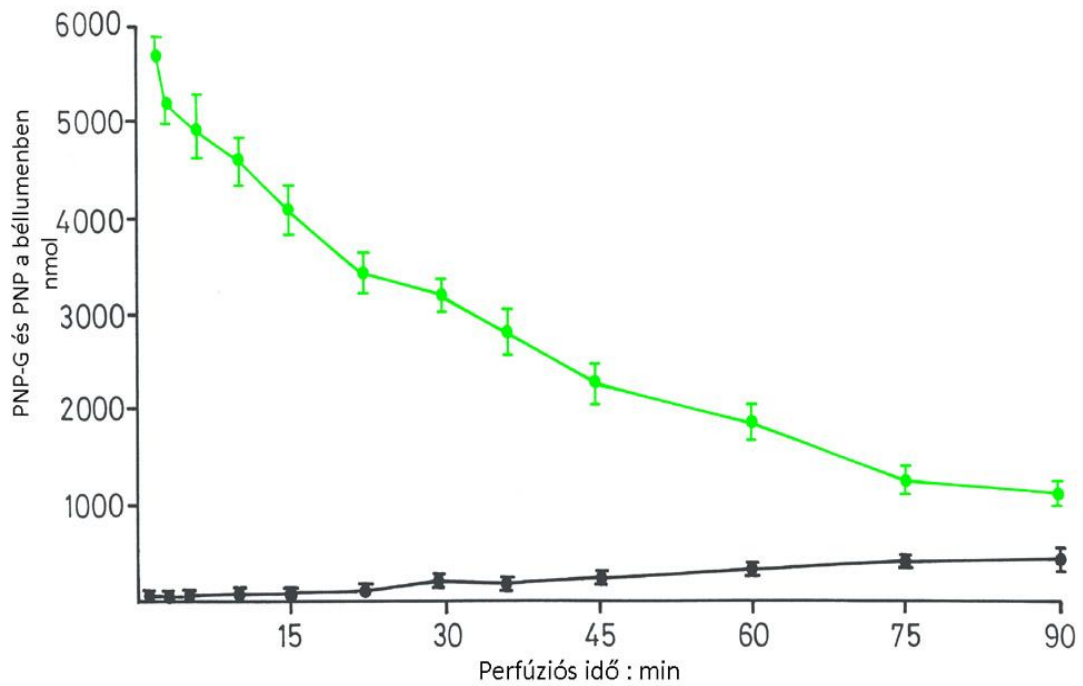


11. ábra. A PNP-G (●) kumulatív luminális megjelenése és a PNP (●) eltűnése (nmol) a jejunális bélkacs izotóniás médiummal történő perfúziója esetén 100  $\mu$ M PNP jelenlétében. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 7).

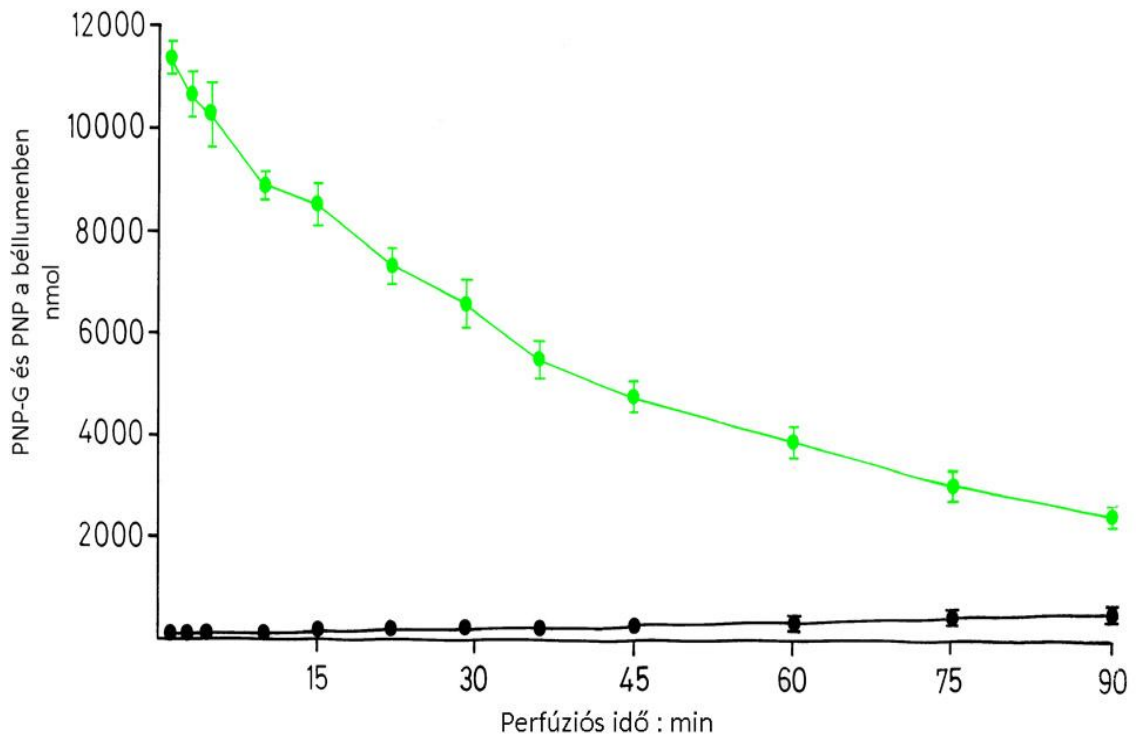




12. ábra. A PNP-G (●) kumulatív luminális megjelenése és a PNP (●) eltűnése (nmol) a jejunális bélkacs izotóniás médiummal történő perfúziója esetén 500  $\mu$ M PNP jelenlétében. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 6).



13. ábra. A PNP-G (●) kumulatív luminális megjelenése és a PNP (●) eltűnése (nmol) a jejunális bélkacs izotóniás médiummal történő perfúziója esetén 1000  $\mu$ M PNP jelenlétében. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 8).



A bemutatott ábrák (10.-11.-12.-13.) adatai egyértelműen mutatják, hogy a PNP mennyisége folyamatosan és gyorsan esett a perfúziós médiumban, a kísérleti periódus végére a PNP kezdeti mennyiségének már csak mintegy 10-15 %-a volt kimutatható a perfúziós folyadékban. Ezzel szemben megjelent a glukuronid metabolit, amely folyamatosan emelkedő tendenciát mutatva a kísérlet végére az induló PNP mennyiség 21,4; 16,1; 5,66 illetve 3,33 %-át tette ki a 20, 100, 500, és az 1000  $\mu\text{M}$ -os PNP koncentrációjú izotóniás oldat perfúziója esetén. Ezek az adatok egyrészt azt mutatják, hogy a PNP koncentrációjának az emelésével a perfúziós oldatban a PNP-G képződés fokozatosan nőtt ugyan, de nem olyan arányban, mint ahogy a dózist növeltük, az induló PNP mennyiség százalékában kifejezett értékek ugyanis egyre kisebbek lettek, ami egyértelműen a szaturációra utal.

A PNP-G megjelenése a béllumenben folyamatosan nőtt, az utolsó két vizsgált periódusban jelentős emelkedést általában már nem észleltünk.

Alacsonyabb koncentrációjú (20-100  $\mu\text{M}$ ) PNP perfúziója során a szulfát konjugátum alig volt kimutatható a vékonybél lumenében, de a magasabb PNP koncentrációk (500-1000  $\mu\text{M}$ ) esetén is csak egy töredéke volt ez az érték a glukuronid konjugátuménak és összességében is kevesebb, mint 1 %-a volt az alkalmazott PNP mennyiségének. A lumenális PNP-S értékeket az egyes koncentrációk esetén időfüggésben egy táblázatban foglaltuk össze (I. táblázat).

### I. táblázat

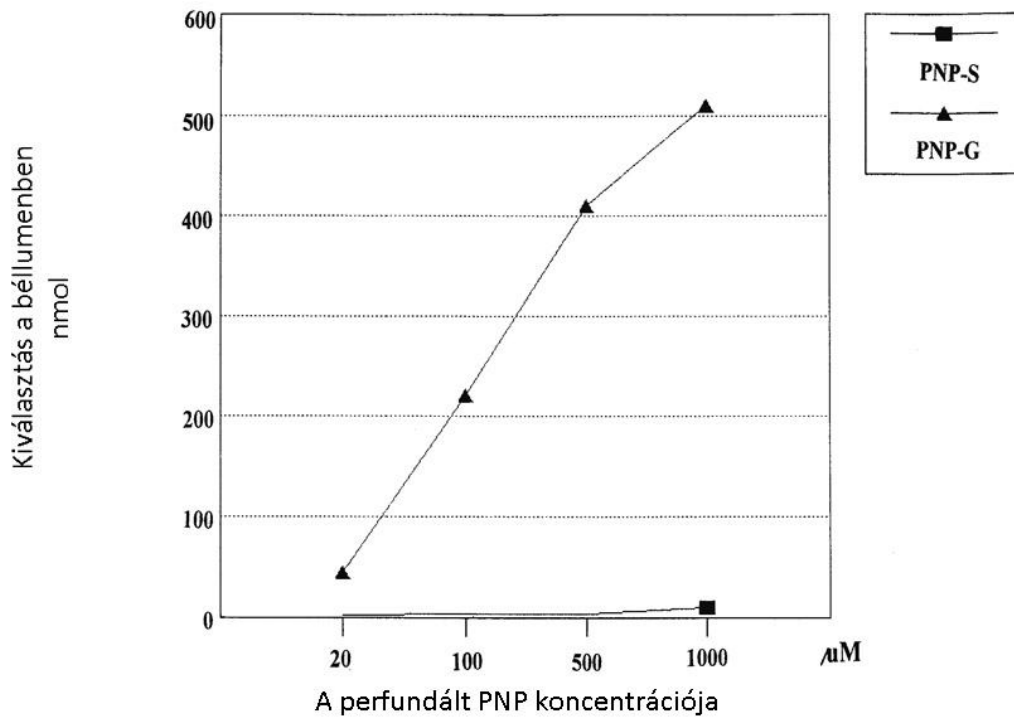
**A PNP-S megjelenése (nmol) a béllumenben 20, 100, 500 és 1000  $\mu$ M PNP luminális perfúziója során különböző időpontokban**

Idő (min)	PNP koncentráció a perfuzátumban ( $\mu$ M)			
	20	100	500	1000
	<b>PNP – S a béllumenben: nmol</b>			
15	0,31 $\pm$ 0,30	0,58 $\pm$ 0,39	0,73 $\pm$ 0,32	1,65 $\pm$ 0,71
30	0,67 $\pm$ 0,33	1,17 $\pm$ 0,52	2,24 $\pm$ 1,55	3,78 $\pm$ 1,55
45	0,95 $\pm$ 0,45	1,95 $\pm$ 0,98	4,01 $\pm$ 2,75	4,82 $\pm$ 2,08
60	1,97 $\pm$ 0,29	2,97 $\pm$ 0,34	5,06 $\pm$ 3,36	5,63 $\pm$ 2,32
75	2,38 $\pm$ 0,25	3,28 $\pm$ 0,22	5,28 $\pm$ 3,58	8,02 $\pm$ 2,54
90	3,09 $\pm$ 1,82	4,51 $\pm$ 2,92	11,1 $\pm$ 4,25	13,0 $\pm$ 1,95

Az adatok az átlagértékeket és az S-E-t jelölik (n = 5-8).

A PNP-S és a PNP-G luminális megjelenésében észlelt nagyon jelentős különbségeket szemléletesen ábrázolja a 14. ábra.

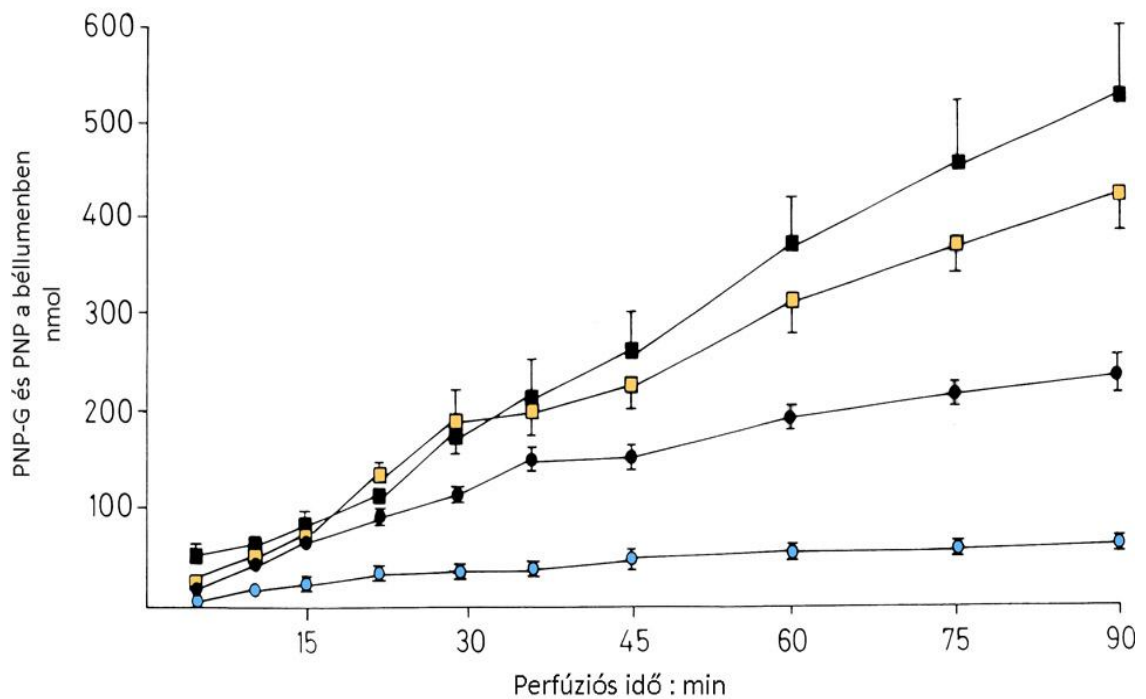
14. ábra. A PNP-S (■) és a PNP-G (▲) megjelenése a béllumenben perfundált PNP koncentrációjának a függvényében. Az adatok az átlagértékeket jelölik (n= 5-8).



Az összehasonlító ábrán látható, hogy a PNP-S a vékonybél lumenében valamennyi vizsgált PNP koncentráció esetén valóban kis mennyiségben jelent meg és hogy a PNP-G luminális megjelenése ezt minden esetben sokszorososan felülmúlta.

A PNP-G luminális megjelenését egy összefoglaló ábra (15. ábra) demonstrálja különböző koncentrációjú PNP perfúziója esetén.

15. ábra. A PNP-G dózis-függő luminális megjelenése (nmol) a PNP különböző koncentrációjú (20 (●-●)-100 (●-●)-500 (■-■)-1000 (■-■)  $\mu\text{M}$ ) luminális perfúziója esetén. Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 5-8)

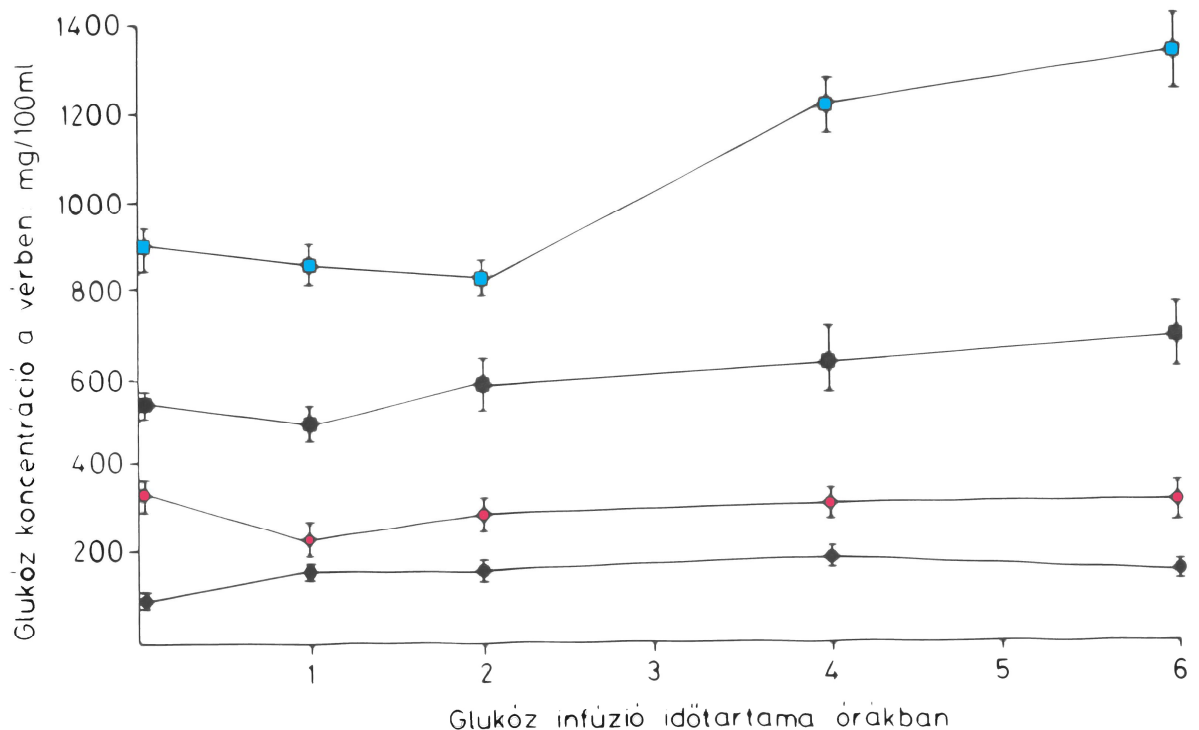


A PNP-G luminális megjelenése növekedett a PNP dózisának az emelésével, azonban a növekedés mértéke egyre kevésbé volt pregnáns, azaz szaturáció irányába tendált: pl.: az 5-ször magasabb PNP koncentráció (100  $\mu\text{M}$ ) 3,8-szeres növekedést produkált a 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál mért 90 perces értékhez viszonyítva, további 5-szörös PNP dózis emelés (100-ról 500 $\mu\text{M}$ -ra) 76%-os fokozódást mutatott, majd a PNP dózisának a duplázása (500-ról 1000  $\mu\text{M}$ -ra) már csak 15 %-al emelte a PNP-G luminális megjelenését. Ezek az adatok egyértelműen jelzik a PNP intesztinális glukuronidációjának és a PNP-G luminális megjelenési folyamatának a telíthetőségét, illetve a tendálást a szaturáció irányába.

### 4.1.2. A hiperglikémia hatása a PNP metabolizmusára a vékonybélben

A hiperglikémiát ezekben a kísérletekben folyamatos glukóz infúzióval hoztuk létre, a különböző koncentrációjú glukóz oldat infúziójával kiváltott eltérő mértékű hiperglikémiás értékeket demonstrálja a 16. ábra.

16. ábra. Vércukorszintek a különböző koncentrációjú (10 %: ●-●; 20 %: ■-■; 30 %: ■-■) glukóz infúziója esetén (kontroll: ●-●). Az adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik (n = 6-8).

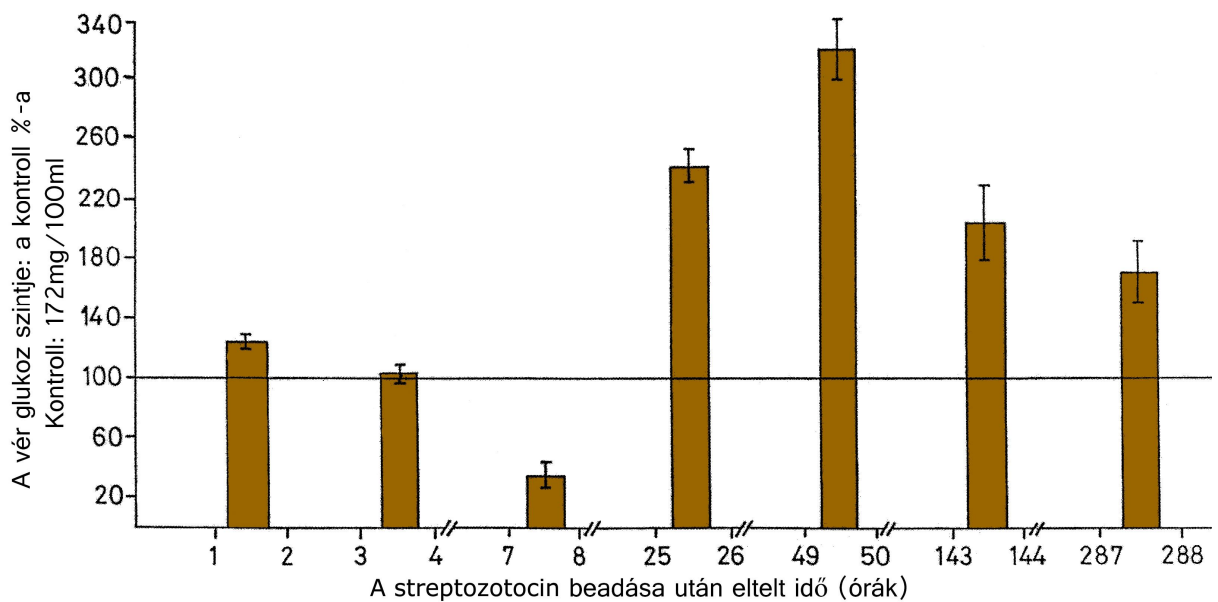


Látható, hogy az intravénás glukóz infúzió egy kezdeti intravénásan adott dózist követően szinte azonnal jelentősen megemeli és magasban tartja a vércukorszintet. A 10 %-os glukóz koncentrációjú infúzió jelentős emelkedést hozott létre a vércukorszintben, amely kb. 2 óra alatt állandósult és mintegy 300 mg/dl értéket ért el, ami 17 mM-nak felel meg. A 20 %-os, illetve a 30 %-os glukóz infúzió természetesen még magasabbra emelte a vércukorszintet nagyjából az infundált mennyiséggel arányosan. A 20 %-os glukóz infúziójával kiváltott vércukorszint nagyságrendileg kb. megfelel a patkánynál

streptozotocinnal (STZ) létrehozott experimentális diabéteszben mért értékeknek: 300-600 mg/dl (17-34 mM).

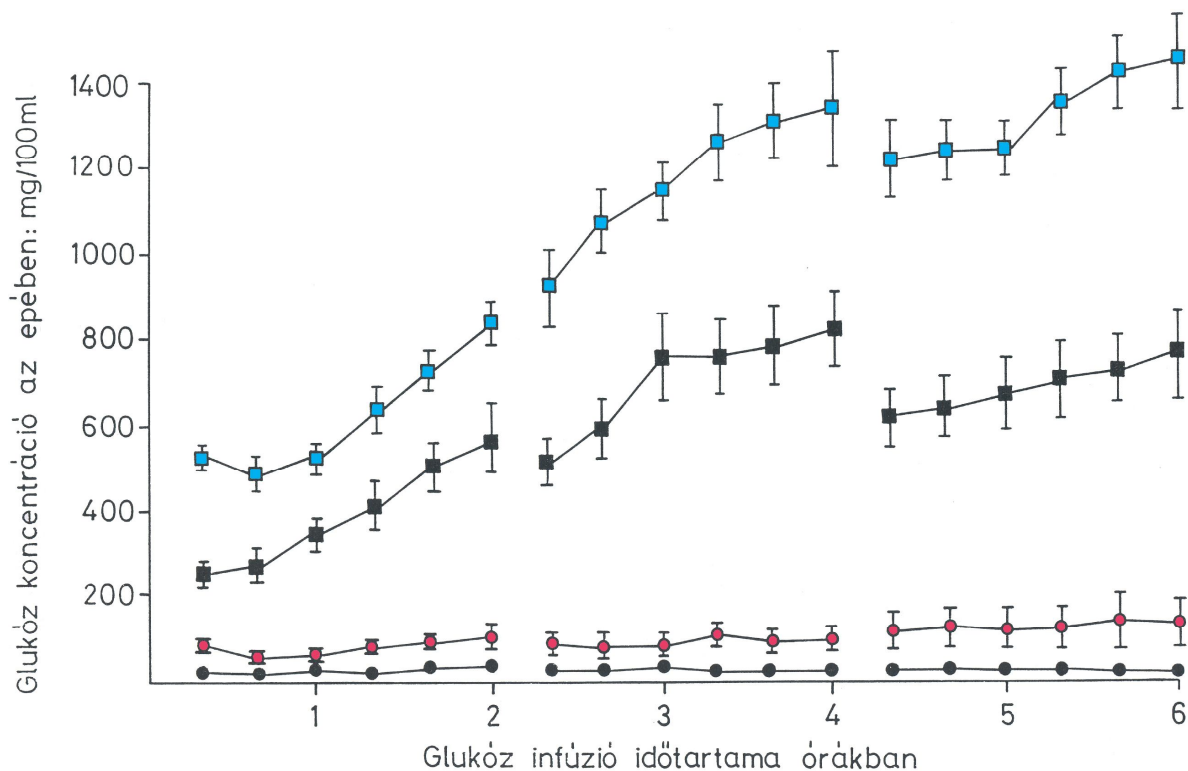
A 17. ábra bemutatja a vércukorszint változásokat a Streptozotocinnal (STZ) kiváltott experimentális diabéteszben.

17. ábra. A STZ hatása a vércukorszintre. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 10).



A vércukorszint jellegzetesen változik kísérletes diabéteszben, ez a STZ hatásmechanizmusával függ össze. A STZ beadását követően néhány óra múlva a vércukorszint csökken, mert a károsított bétasejtekből inzulin szabadul fel. Ezt követően azonban a már funkcióképtelen bétasejtek miatt kialakuló inzulinhiány következtében a vércukorszint jelentősen emelkedik és némi ingadozás után tartósan magas marad (88, 102.).

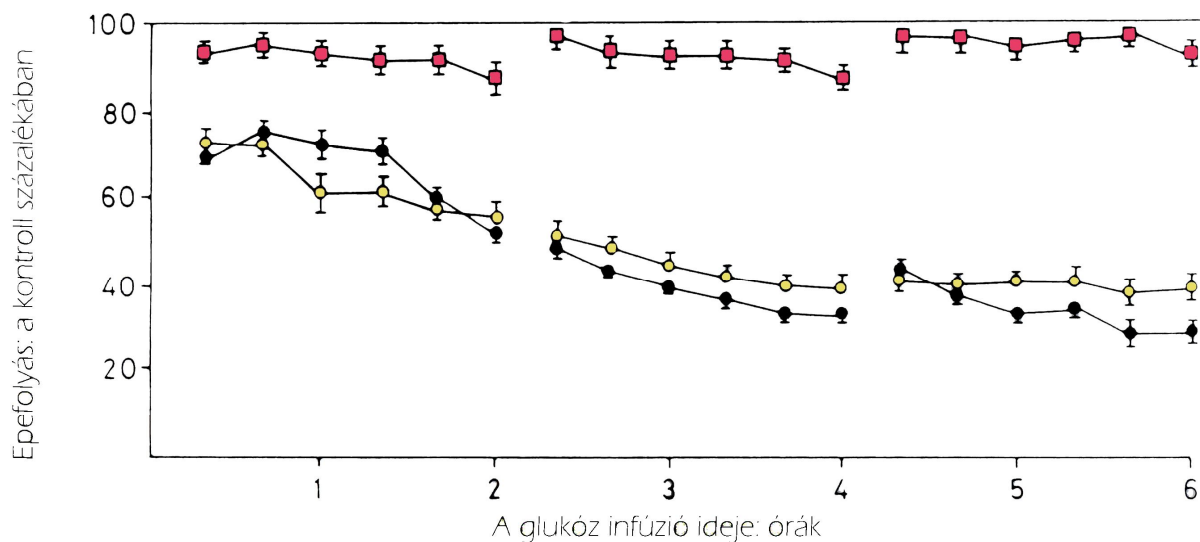
18. ábra. A glukóz infúzióval kiváltott hiperglikémia hatása az epe glukóz koncentrációjára (kontroll: ●-●; 10 %-os glukóz infúzió: ●-●; 20 %-os glukóz infúzió: ■-■; 30 %-os glukóz infúzió: ■-■). A glukóz infúziója folyamatos volt 2, 4 illetve 6 órán át a patkányok különböző csoportjainál. Az epe gyűjtése az infúziós periódus utolsó két órájában történt. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 6-8)



A hiperglikémia mint a diabétesz egyik vezető tünete önmagában is képes létrehozni bizonyos változásokat az egyes szervekben és transzport folyamatokban (32.). Példaként bemutatjuk a hiperglikémia hatását az epe glukóz szintjére és az epefolyásra saját kísérleti adataink alapján. A glukóz infúzióval kiváltott hiperglikémia a vércukorszint emelkedésével nagyjából párhuzamosan növelte az epében a glukóz koncentrációt (18. ábra) és ezzel ellentétes irányban befolyásolta az epefolyást (19. ábra).



19. ábra. A glukóz infúzióval kiváltott hiperglikémia hatása az epefolyásra a kontroll százalékában (■-■: 10 %-os glukóz infúzió, ●-●: 20 %-os glukóz infúzió, ●-● 30 %-os glukóz infúzió). A kontroll epefolyás  $53,7 \pm 1,86 \mu\text{l} / \text{kg} / \text{min} = 100\%$  volt. A glukóz infúziója folyamatosan történt 2, 4 illetve 6 órán át a patkányok különböző csoportjainál. Az epe gyűjtése az infúziós periodus utolsó két órájában történt. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n= 6-8)

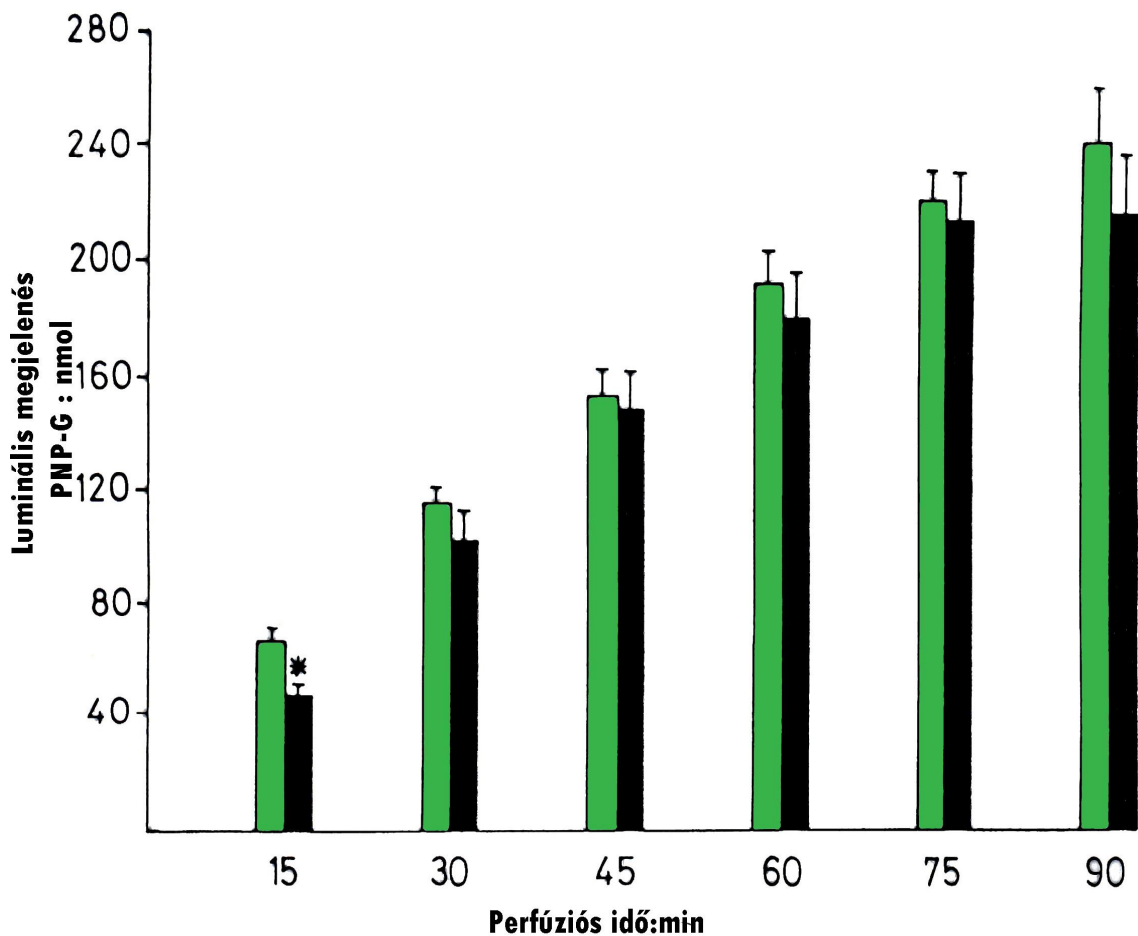


19. ábra adatai egyértelműen mutatják, hogy az epefolyás a hiperglikémiás állatokban csökkent. A változás a vércukorszint emelkedéssel ellentétes irányú és nagyjából arányos a hiperglikémia mértékével, de a 20 és 30 %-os glukóz infúzió során mért értékek már nem mutatnak jelentős eltérést egymástól.

A hiperglikémia hatását mutatja be a 20. ábra a PNP-G megjelenésére a vékonybél lumenében.

20. ábra. A PNP - G luminális megjelenése a vékonybélben (nmol) kontroll (■) és hiperglikémiás (■) patkányokban. A hiperglikémiát egy kezdeti glukóz dózis beadását követő 20 %-os folyamatos glukóz infúziójával hoztuk létre, illetve tartottuk fenn. A vékonybél perfúziója olyan izotóniás médiummal történt, amely 100  $\mu$ M PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 5).

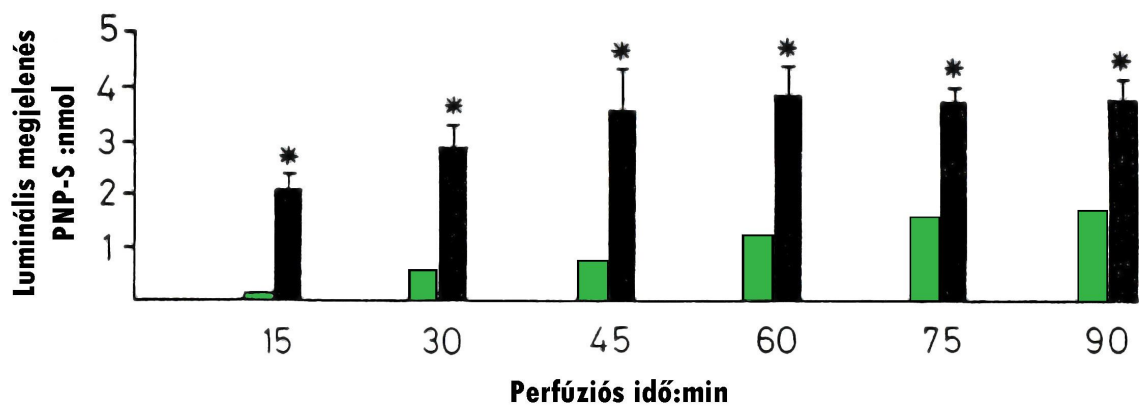
\*:  $p < 0,05$



Az adatokból látható, hogy a PNP-G luminális megjelenésében a 15 perces érték kivételével nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a hiperglikémiás patkányok között, másszóval a hiperglikémia a vékonybél glukuronidációs aktivitását lényegesen nem befolyásolta.

A PNP szulfát metabolitjának a béllumenben történő megjelenését ábrázolja a 21. ábra.

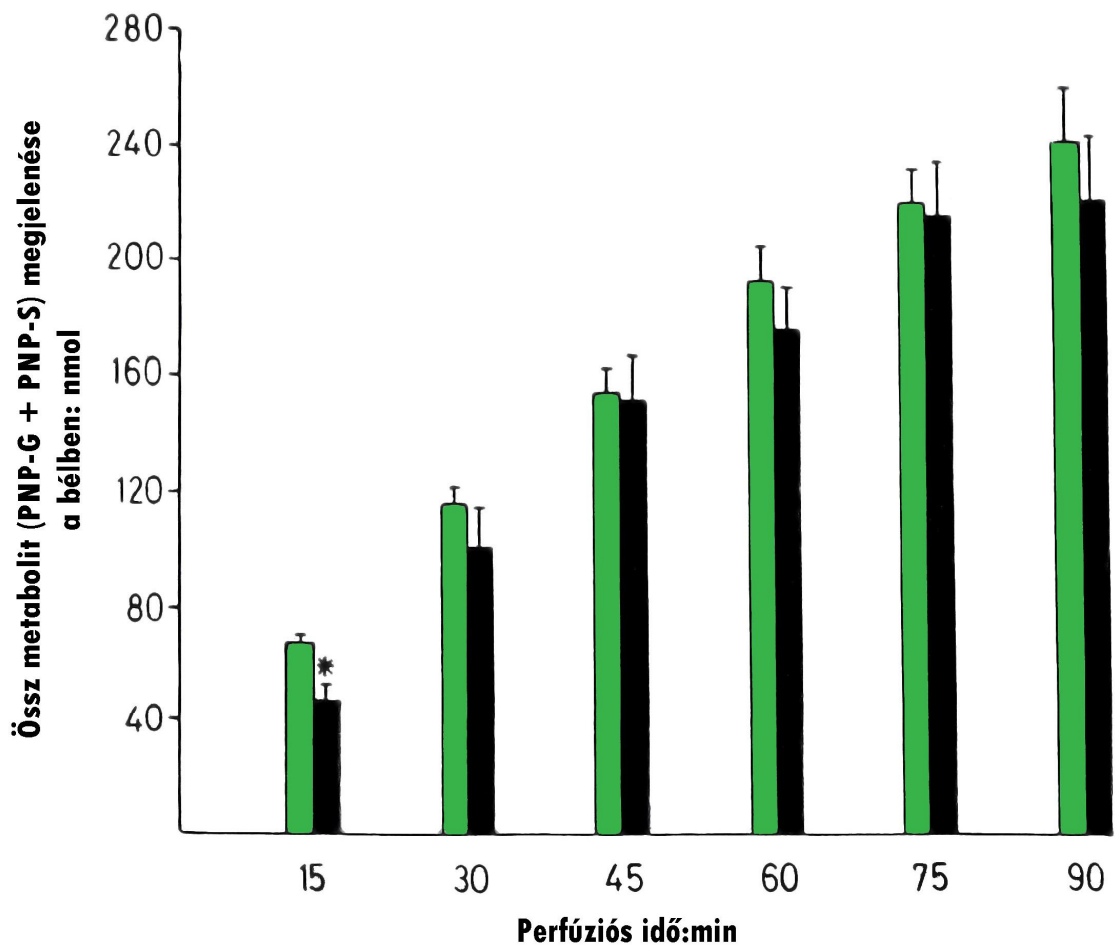
21. ábra. A PNP-S luminális megjelenése a vékonybélben (nmol) kontroll (■) és hiperglikémiás (■) patkányokban. A hiperglikémiát (20 - 40 mM-os vércukorszint) az előző ábrán leírtak szerint hoztuk létre és tartottuk fenn. A vékonybél perfúziója olyan izotóniás médiummal történt, amely 100  $\mu$ M PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 5). \*: p < 0,05.



Az ábra adataiból kitűnik, hogy a PNP-S luminális megjelenése lényegesen alacsonyabb szintű volt, mint a PNP-G-é, azonban a hiperglikémia a szulfát konjugátum megjelenését a vékonybélben szignifikánsan megnövelte valamennyi vizsgált időpont esetén.

Külön ábrán tüntettük fel a glukuronid és a szulfát metabolitok össz-megjelenését, azaz a PNP-G és a PNP-S metabolitok összegét (22. ábra).

22. ábra. A metabolitok összege (PNP-G + PNP-S) a perfundált jejunális bélkacsban kontroll (■) és hiperglikémiás (■) patkányokban. A kísérleti körülmények azonosak voltak az egyes metabolitokat bemutató ábráknál (20. és 21. ábra) leírtakkal. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 5). \*: p < 0,05.



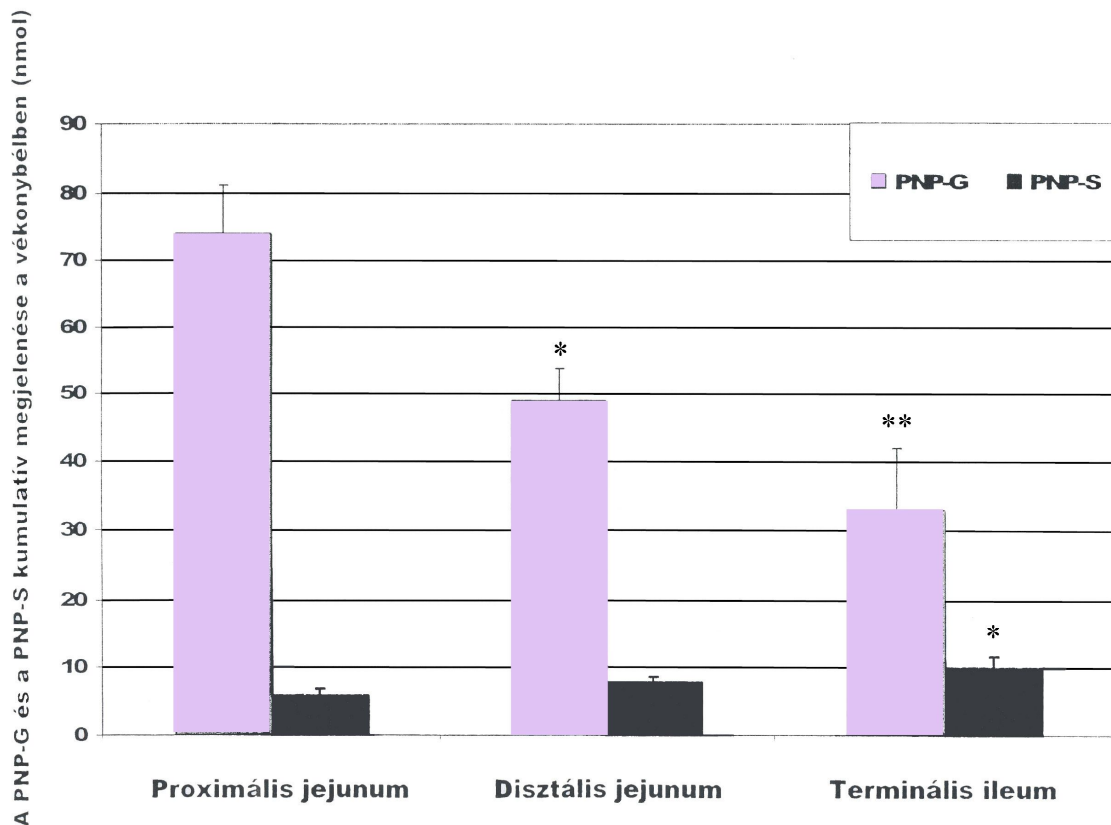
A metabolitok összesített adataiból egyértelműen kiolvasható, hogy a 15 perces érték kivételével nem volt különbség a két csoport adatai között, azaz, hogy a hiperglikémia hatására az össz-metabolitok lumenális megjelenése nem változott. Ez döntően azzal magyarázható, hogy a metabolitok zömét a PNP-G adta, emellett szinte eltörpül a PNP-S értéke, amelynek a változása ezért nem tudta módosítani a lényegesen nagyobb mennyiségben megjelenő PNP-G-nél megfigyelt tendenciát, amely nem mutatott lényeges eltérést hiperglikémia hatására.

### 4.1.3. Eltérések a különböző bélszakaszok biotranszformációs aktivitásában

Ebben a kísérletsorozatban a proximális jejunum, a disztális jejunum és a terminális ileum biotranszformációs aktivitását vizsgáltuk, illetve hasonlítottuk össze abból a célból, hogy van-e különbség PNP metabolizmusában az egyes bélszakaszok között.

A 23. ábra a PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) luminális megjelenését mutatja be a 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú PNP-t tartalmazó izotóniás médium luminális perfúziója esetén.

23. ábra. A PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) luminális megjelenése a különböző bélszegmentumok perfúziója esetén. A perfúziós médium 20  $\mu\text{M}$  koncentrációjú PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

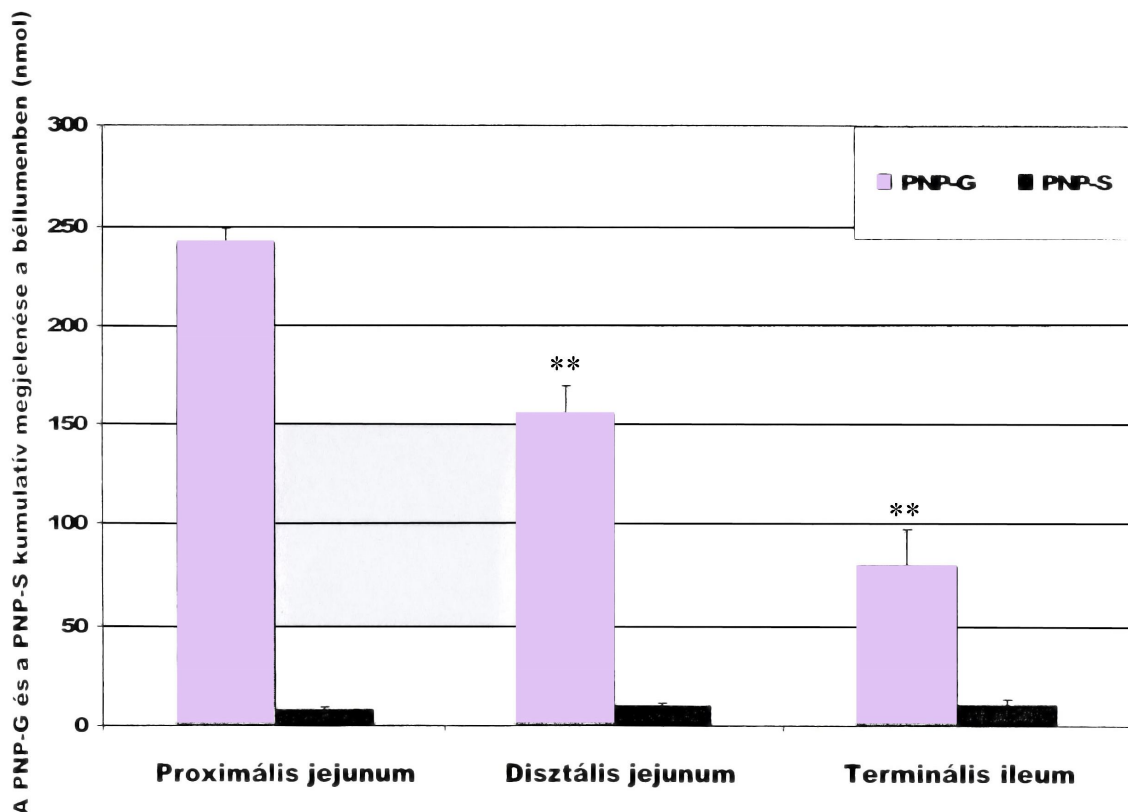


Az oszlopdiagrammok világosan mutatják, hogy a PNP-S valamennyi szegmentumban lényegesen kisebb mértékben volt jelen a béllumenben, mint a PNP-G.

A legmagasabb PNP-G értéket a proximális jejunumnál, a legalacsonyabbat pedig a terminális ileumnál láthatjuk. A PNP-S luminális megjelenése a glukuronid konjugátumnál megfigyelt változással ellentétesen nem csökkenő, hanem inkább egy emelkedő tendenciát mutatott a disztális szegmentumok felé haladva, de relatíve alacsony szinten maradt mind a proximális- és disztális jejunum, mind a terminális ileum esetében.

A PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) luminális megjelenését demonstrálja a 24. ábra 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú PNP-t tartalmazó perfúziós folyadék luminális perfúziója esetén a különböző bélszakaszokban.

24. ábra. A PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) luminális megjelenése a különböző bélszakaszokban perfúziója során. A perfúziós médium 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n=10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva:  $**p < 0,01$ .

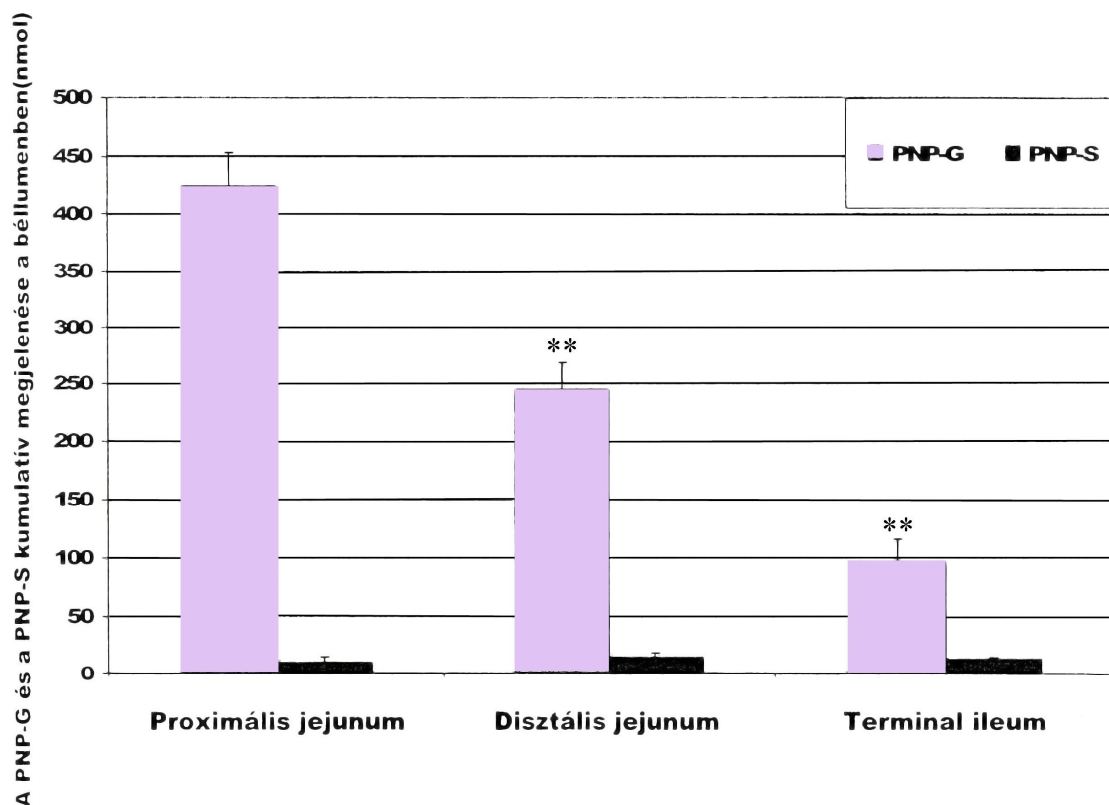


A PNP-metabolitok kumulatív luminális megjelenését foglalja össze a 24. ábra 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú PNP luminális perfúziója esetén. A domináns metabolit ennél a dózissnál is a PNP-G volt, a PNP-S lényegesen kisebb mennyiségben jelent meg a

különböző bélszakaszok lumenében. Egy határozott és egyértelmű csökkenő tendencia figyelhető meg a PNP-G luminális megjelenésében a vékonybél proximális szakaszától a disztális szegumentumok irányába haladva. Érdekes módon a PNP-S esetében inkább egy enyhe emelkedés látható ugyanebben az irányban.

Magasabb koncentrációjú (500  $\mu$ M) PNP luminális perfúziójánál hasonló tendenciát figyelhetünk meg a PNP metabolitok luminális megjelenésében (25. ábra).

25. ábra. A PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) luminális megjelenése a különböző bélszegumentumokban. A perfúziós médium 500  $\mu$ M koncentrációjú PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n=10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva: \*\*p<0,01.

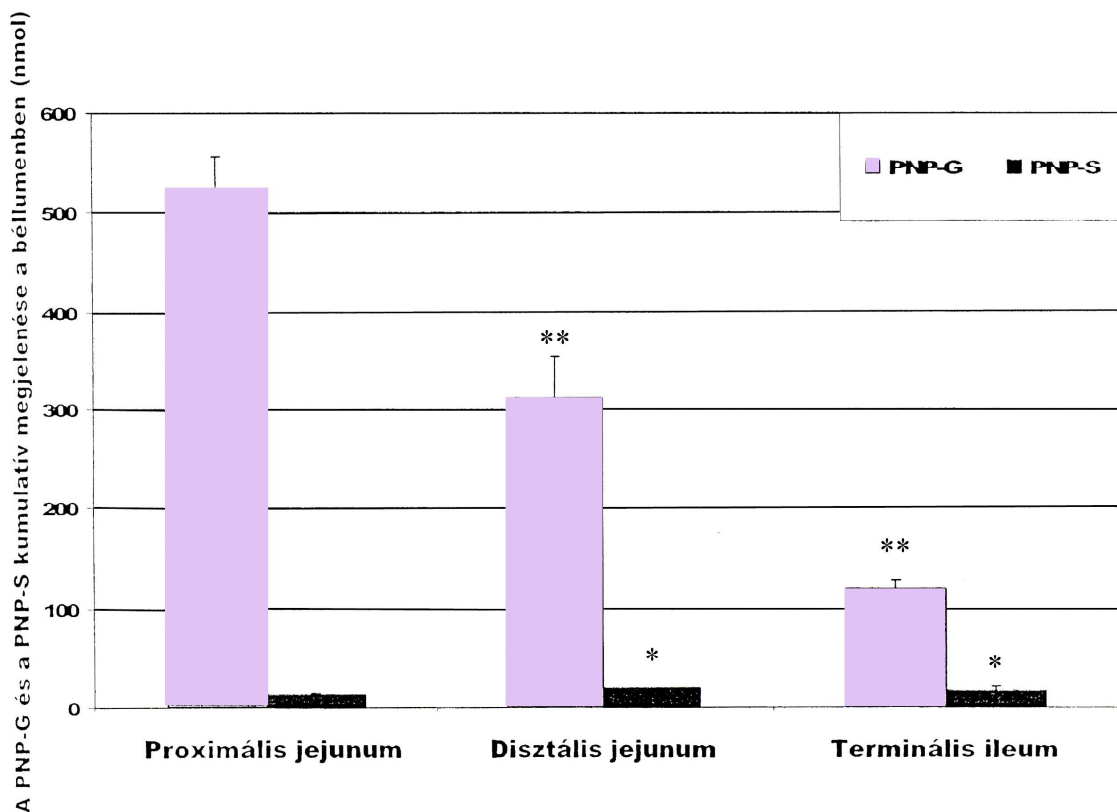


A PNP glukuronsavval történő konjugációs aktivitásának az egyértelmű csökkenését mutatja a 25. ábra a disztális bélszegumentumok felé haladva: például a terminális ileumban a proximális jejunumban mért PNP-G mennyiségének csak mintegy 23 %-a volt kimutatható. Nem volt azonban csökkenés észlelhető a PNP-S esetében a

vékonybél különböző szegmenteiben proximálistól disztális irányba haladva az 500  $\mu\text{M}$ -os PNP perfúziója során.

A 26. ábra demonstrálja azoknak a kísérleteknek az eredményeit, amelyekben a vékonybél különböző szakaszaiban 1000  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú PNP-t tartalmazó oldatot recirkuláltunk.

26. ábra. A PNP-G és a PNP-S kumulatív (90 perces) lumenális megjelenése a különböző bélszegumentumokban. A perfúziós médium 1000  $\mu\text{M}$  koncentrációjú PNP-t tartalmazott. Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n=10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



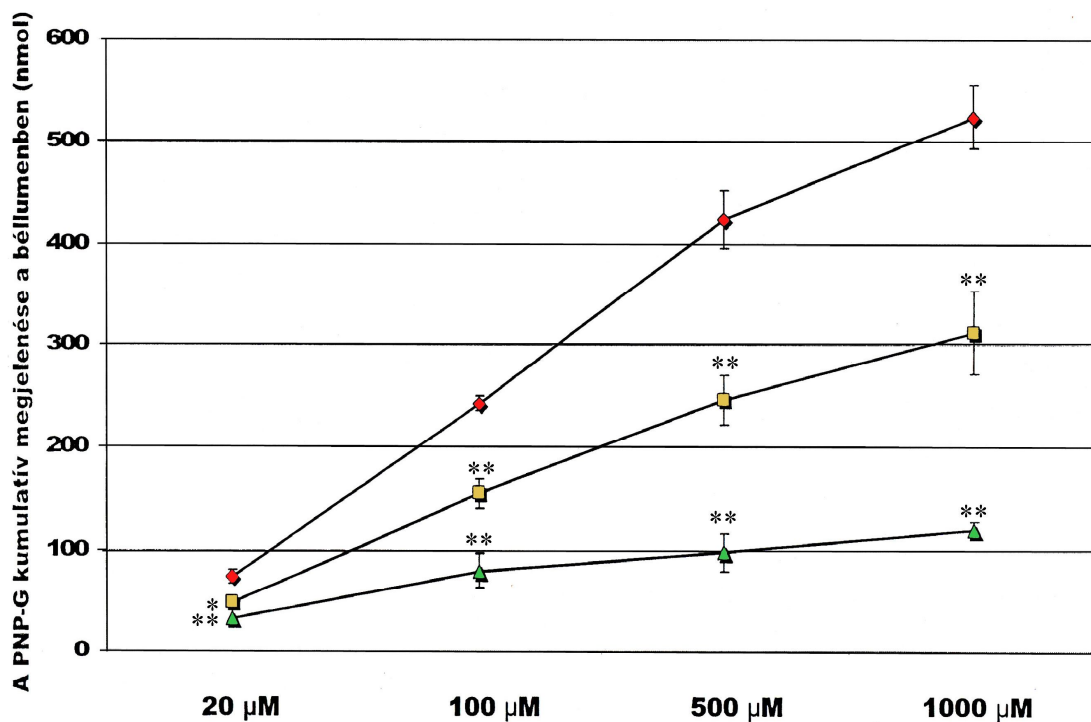
A 26. ábra azokat az eredményeket demonstrálja, amelyeket a különböző bélszegumentumok 1000  $\mu\text{M}$ -os PNP koncentrációt tartalmazó oldattal történő perfúziójával kaptunk. Ezekben a kísérletekben is a proximális jejunumban mértük a legnagyobb PNP-G koncentrációt, ez a metabolit a disztális jejunumban és a terminális ileumban lényegesen kisebb mennyiségben jelent meg. A PNP szulfát metabolitja azonban nem csökkent a disztális irányba haladva, sőt az alacsonyabb PNP-dózisoknál megfigyelhetőhöz hasonlóan inkább egy enyhén emelkedő trendet mutatott. Ha a



proximális jejunumban mért PNP-G mennyiséget (525 nmol) összevetjük a 10-szer alacsonyabb PNP-koncentrációval (100  $\mu$ M) kapott értékkel (242 nmol PNP-G), akkor megállapíthatjuk, hogy a 10 x magasabb dózisu PNP-nél csak mintegy 2,2-szeres növekedést látunk a glukuronid képzésben, ami arra utal, hogy a PNP-G luminális megjelenése szubsztrátkoncentráció függő, de szaturációt mutat. Ez lényegében a többi vizsgált szegmentumnál is megfigyelhető volt.

A PNP-G kumulatív luminális megjelenését összesítve mutatja be a 27. ábra a különböző PNP -koncentrációk és bélszegmentumok esetén.

27. ábra. A PNP-G kumulatív (90 perces) luminális megjelenése a perfundált PNP-koncentrációk (20-100-500-1000  $\mu$ M) alkalmazásánál a különböző vékonybél szegmentumok esetén ( $\blacklozenge$ : proximális jejunum;  $\blacksquare$ : disztális jejunum;  $\blacktriangle$ : terminális ileum). Az adatok az átlagértéket és a S.E.-t jelölik (n = 10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva: \*p<0,05; \*\*p<0,01.

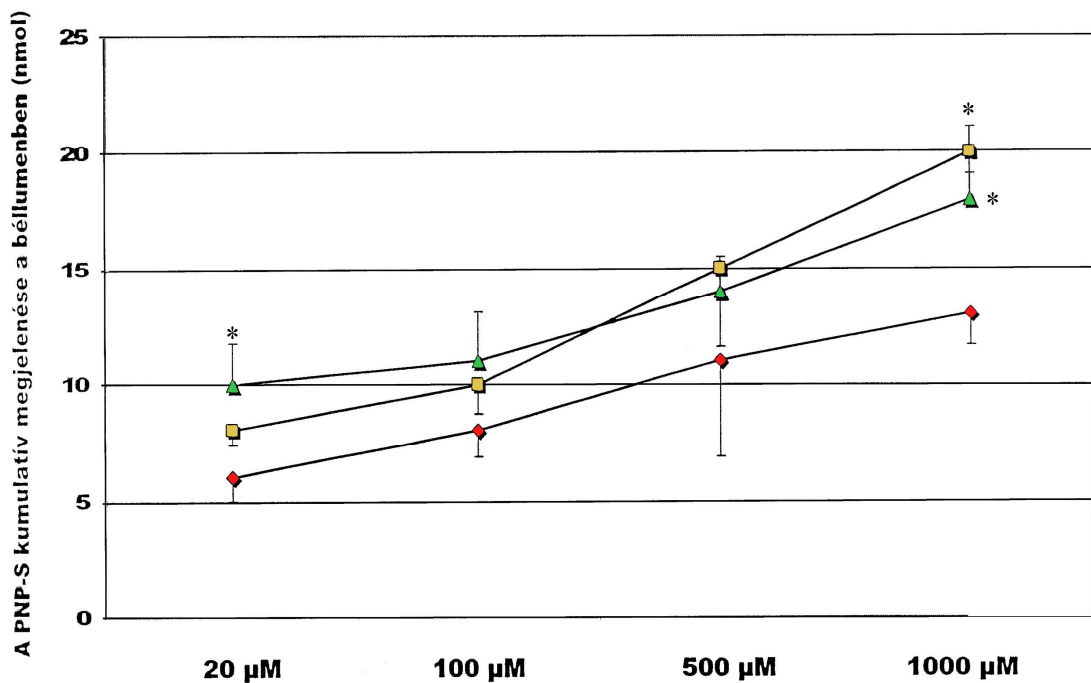


Az adatok dózis-függést mutatnak valamennyi vizsgált bélszegmentum esetén, azonban a PNP-koncentráció emelésével egyértelmű szaturációs tendencia figyelhető meg: például a 2-szer magasabb PNP-koncentráció (500  $\mu$ M-ról 1000 $\mu$ M-ra) csak 24 %, 27 %, illetve 23 % emelkedést produkált a PNP-G luminális megjelenésében a proximális és disztális jejunumban, valamint a terminális ileumban. Az ábra összesített

adatai egyúttal jól demonstrálják a csökkenő glukuronid konjugációs aktivitást a vékonybél proximális szakaszától a disztális szegmentum irányába haladva.

A különböző PNP-koncentrációjú izotóniás médiummal történő perfúzió során a vizsgált szegmentumok lumenében mért PNP-S értékeket mutatja összefoglalóan a 28. ábra.

28. ábra. A PNP-S kumulatív (90 perces) megjelenése összesítve a különböző PNP-koncentrációkkal (20-100-500-1000  $\mu\text{M}$ ) történő perfúzió esetén a vizsgált vékonybél szakaszokban ( $\blacklozenge$ : proximális jejunum;  $\blacksquare$ : disztális jejunum;  $\blacktriangle$ : terminális ileum). Az adatok az átlagértékeket és a S.E.-t jelölik (n = 10). Szignifikáns különbség a proximális jejunumban mért értékhez viszonyítva: \* $p < 0,05$ .



A PNP-S kumulatív megjelenése valamennyi vizsgált szegmentumban lényegesen alacsonyabb volt, mint a PNP-G-é. A PNP-G-nél megfigyelhető szaturációs tendencia lényegében a szulfát konjugátumnál is megfigyelhető volt. A glukuronidációs aktivitás csökkenésével szemben azonban a szulfát képzés nem bizonyult alacsonyabbnak, sőt egy enyhe emelkedés volt inkább detektálható a PNP-S-nek a bélumenben való megjelenését illetően a proximálistól a disztális irányba haladva: a PNP-S lumenális megjelenése a disztális szegmentumokban (disztális jejunum és

terminális ileum) magasabb, egyes esetekben statisztikailag is kumulatív módon nagyobb volt, mint a proximális jejunumban.

## 5. Megbeszélés

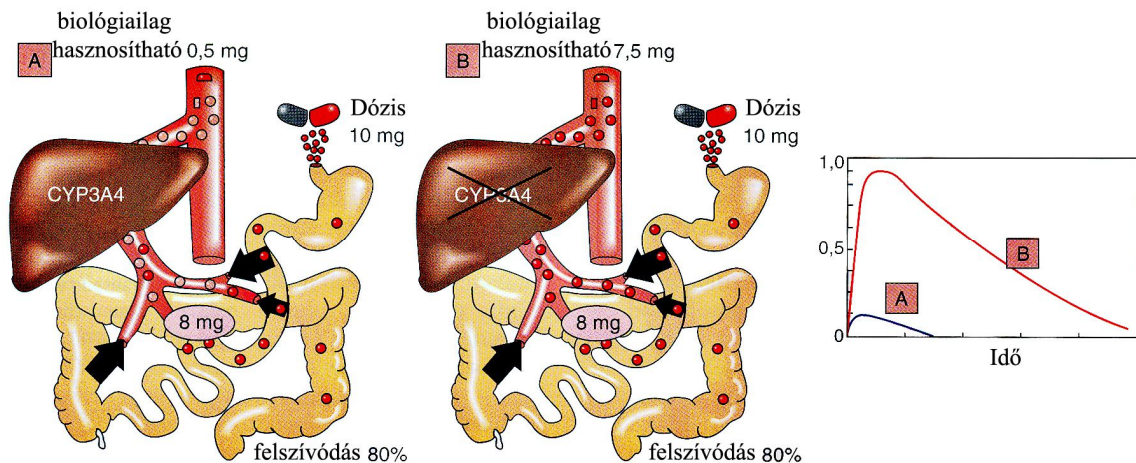
Az értekezésben bemutatott vizsgálatok a farmakokinetika jelentőségével, pontosabban a farmakokinetikai paramétereket befolyásoló néhány tényezővel foglalkoznak. A farmakokinetika területe a gyógyszerelés széles spektrumát öleli fel a gyógyszerek beadását követő felszívódástól azoknak az eliminációjáig. Éppen ezért a hatásmechanizmussal foglalkozó farmakodinámiás aspektusok mellett a szisztémás gyógyszerhatások létrejöttében a legfontosabb tényezők egyikének tekinthető a gyógyszereknek a szervezetünkben történő sorsával foglalkozó farmakokinetika (24., 67., 90.).

Napjainkban a részben anyagi szempontokat is szem előtt tartó megfontolások következtében egyre inkább előtérbe kerül a generikumok alkalmazása. Ez a körülmény aktuálisan még hangsúlyosabbá teszi a farmakokinetikai paraméterek jelentőségét és az azokat befolyásoló tényezők vizsgálatát. A generikumok olyan gyógyszerkészítmények, amelyek az eredeti (originális) és bizonyos ideig szabadalmi védeltséget élvező preparátumokkal azonos hatóanyagot tartalmaznak, de azokat a szabadalom lejártával más gyógyszergyárak esetleg eltérő technológiával is előállíthatják és más néven forgalmazhatják. Ilyenkor abból a feltételezésből indulnak ki, hogy az azonos hatóanyagtartalom miatt a farmakológiai és terápiás hatásban, illetve a hatásmechanizmusban nem lehet különbség az originális és a generikus készítmények között. Ezért a farmakodinámiás aspektusokat a generikus készítményeknél nem is vizsgálják, kérdéses lehet azonban az eltérő gyártási technológiából és a vehikulumok különbözőségéből adódóan a készítmények farmakokinetikai azonossága. A forgalomba hozatal engedélyező hatóságok a fenti megfontolásokat figyelembe véve tudomásul veszik a farmakodinámiás kontroll elhagyását, de előírják és elvárják a generikumok farmakokinetikai vizsgálatát. A generikumok egyre terjedő forgalmazása és használata napjainkban tehát egy aktuális és egyre hangsúlyosabb tényezője a farmakokinetikai aspektusoknak.

A farmakokinetika egyes lépéseit számos tényező befolyásolhatja, például faji, genetikai különbségek, eltérések a kísérleti állatok és az embernél megfigyelt reakciókban (pl. metabolizmus), betegségekből, káros behatásokból adódó differenciák azoknak a szerveknek a működésében, amelyek a gyógyszerek transzport folyamataiban

és a biotranszformációjukban fontosak. Ennek a jelentőségét, illetve a következményeit demonstrálja a 29. ábra.

29. ábra. A CYP - 3A4 – metabolizmus gátlásának a hatása a Simvastatin plazmakoncentrációjára.



A 29. ábra a koleszterinszint csökkentő Simvastatin példáján mutatja be a gyógyszermetabolizmus gátlásának a hatását a biológiai hasznosíthatóságra és a plazmakoncentrációra. Az ábra „A” részében látható, hogy 10 mg Simvastatin per os adása után a vékonybélből történő jó arányú (80%) felszívódást követően a máj pregnáns metabolikus aktivitása (CYP – 3A4) következtében a biológiai hasznosulás alacsony (5%), csak 0,5 mg tud farmakológiai hatást kifejteni, mert ez a mennyiség jut a szisztémás keringésbe. Abban az esetben azonban, ha a biotranszformációt (CYP – 3A4) csaknem teljesen (kb. 95%-ban) meggátoljuk, akkor a biológiai hasznosíthatóság ugyanolyan adagolás és felszívódási viszonyok mellett 5-ről 75 (!) százalékra nő, azaz ugrásszerűen megemelkedik és a korábbi 0,5 mg-al szemben 7,5 mg a biológiai hasznosítható mennyiség (az ábra „B” része). Ezeket a változásokat nagyon jól szemlélteti a plazmakoncentrációkat, illetve a görbe alatti területeket bemutató jobb oldali ábra (inzert) (2., 57. old.).

A farmakokinetikai változásokat tekintve gyakorlati és klinikai szempontból is nagyon jelentősek a patológiás változások vagy a különböző betegségek, (25., 67., 108., 110., 121.) végül, de nem utolsó sorban egyéb xenobiotikumok jelenléte, más gyógyszerek egyidejű adása. A gyógyszereléssel kapcsolatban több szempont is felmerülhet, illetve fontos lehet, pl. a gyógyszerek adagja (dózis), vagy több gyógyszer

együttes adása, gyógyszeres interakciók (például enzimindukció, enzimgátlás) lényegesen módosíthatják a farmakokinetikai paramétereket (63., 64., 65., 72., 91.). Az értekezésben tárgyalt kísérletek a farmakokinetiát befolyásoló tényezők közül három, mind elméleti, mind gyakorlati (klinikai) szempontból is fontos tényezővel foglalkoztak, nevezetesen a dozírozás, a patológiás változások, illetve a vékonybél különböző szegmentumainak a szerepét és jelentőségét vizsgáltuk.

Egy értekezés keretében, illetve az ezzel kapcsolatos kísérletsorozatban a farmakokinetika valamennyi lépése nem elemezhető, ezért elsősorban a béltraktus szerepének, és a biotranszformáció jelentőségének a vizsgálatára irányult a figyelmünk.

A béltraktus ilyen irányú tevékenységére azért esett a választásunk, mert bár általánosan ismert és elfogadott, hogy a testidegen anyagok metabolizmusában és exkréciójában a májnak és a vesének kiemelkedő szerepe van, az utóbbi időben egyre több olyan adat került nyilvánosságra, amelyek a farmakonok eliminációja szempontjából más szervek fontosságára is felhívják a figyelmet (18., 73., 92., 93.). Ezek az adatok utalnak például a bélrendszer szerepére is az extrahepatikus metabolizmust illetően (3., 27., 36., 42., 104.). A bélben képződött metabolitok általában polárosabbak és vízdékonyabbak az anyavegyületeknél, biológiai és farmakológiai aktivitásuk pedig általában alacsonyabb azokénál. A bélhámsejtek az általuk képzett metabolitokat képesek gyorsan és hatékonyan exkretálni, azaz visszajuttatni a béltraktus lumenébe, megteremtve ezzel annak a lehetőségét, hogy a kémiai átalakulásból származó produktumok (metabolitok) a széklettel elhagyják a szervezetet, másszóval eliminálódjanak. A vékonybél eliminációs tevékenységének az ad különleges jelentőséget, hogy a szájon keresztül bevett xenobiotikumok először a bélcsatornát érik el. Csak azok a molekulák juthatnak a felszívódást követően változatlan formában a májba, illetve a szisztémás keringésbe, amelyek a bélben nem metabolizálódtak és nem exkretálódtak a béllumenbe. Ez az oka annak, hogy a per os adott gyógyszerek biológiai hasznosíthatóságának a bél ezen tevékenysége az egyik legfontosabb tényezője (9., 120.). Az említett szempontok tehát feltétlenül indokoltá teszik, hogy a vékonybél eliminációs funkcióját körültekintően és széleskörűen vizsgáljuk és hogy erre az eddigieknél jóval nagyobb figyelmet fordítsunk.

A vékonybél metabolizáló és exkréciós tevékenysége rendkívül sokrétű, a biotranszformációban a májhoz hasonlóan számos reakciótípus játszik szerepet (22., 41., 42., 54., 59.). Az intesztinális metabolizmusban fontos helyet foglalnak el a konjugációs jellegű átalakulások, melyek során a gyógyszerek, egy a szervezetünkben

jelenlévő (endogén) vegyülettel vagy csoporttal (pl. glukuronsav, glutation, aminosavak, szulfát, metil, acetyl stb.) kapcsolódnak össze (16., 17.). Az értekezésben bemutatott kísérletekben a glukuronsavval és a szulfáttal történő konjugációt, azaz a glukuronid és a szulfát képzés jelentőségét vizsgáltuk a xenobiotikumok intesztinális eliminációjában. A glukuronid képzés során a glukuroniltranszferázok glukuronsavat visznek rá a különböző exogén és endogén vegyületekre. Az enzimek membránokhoz kötöttek és főleg az endoplazmás retikulumban lokalizálódnak.

A glukuronsavas konjugáció szubsztrátjai általában fenolok, alkoholok, szerves savak vagy amino és szulfhidril csoportokat tartalmazó vegyületek. Ilyen csoportok számos endogén molekula vagy gyógyszer kémiai struktúrájában megtalálhatók vagy az elsőrendű metabolikus reakciók során kerülnek azokra. A szulfát képzés forrása a 3-foszfo-adenozin-5-foszfoszulfát (PAPS), főleg hidroxil- és aminocsoportokat tartalmazó aromás vegyületek (pl. katekolaminok, szerotonin, fenolok, szteroidok) képeznek konjugáció révén szulfát metabolitokat. A glukuronid és a szulfátképzésben tehát nem csak exogén, hanem endogén szubsztrátok is részt vehetnek, e tekintetben esetenként kompetíció (interakció) is kialakulhat.

A p-nitrofenolt modellvegyületként használtuk, amelyről ismert, hogy szinte kizárólag a fenti konjugációs reakciókkal metabolizálódik, ezért optimális az ilyen irányú vizsgálatokban szubsztrátként történő alkalmazása. További előny, hogy a metabolitok (PNP-G, PNP-S) meghatározására pontos és megbízható módszerek állnak a rendelkezésünkre (4., 5., 74.). A PNP *in vivo* lumenális perfúziója a vékonybélben pedig olyan kísérleti elrendezést jelent, amely lényegében megfelel a per os történő gyógyszeradásnak, ezt követően ugyanis a molekulák ugyancsak a vékonybélbe kerülnek.

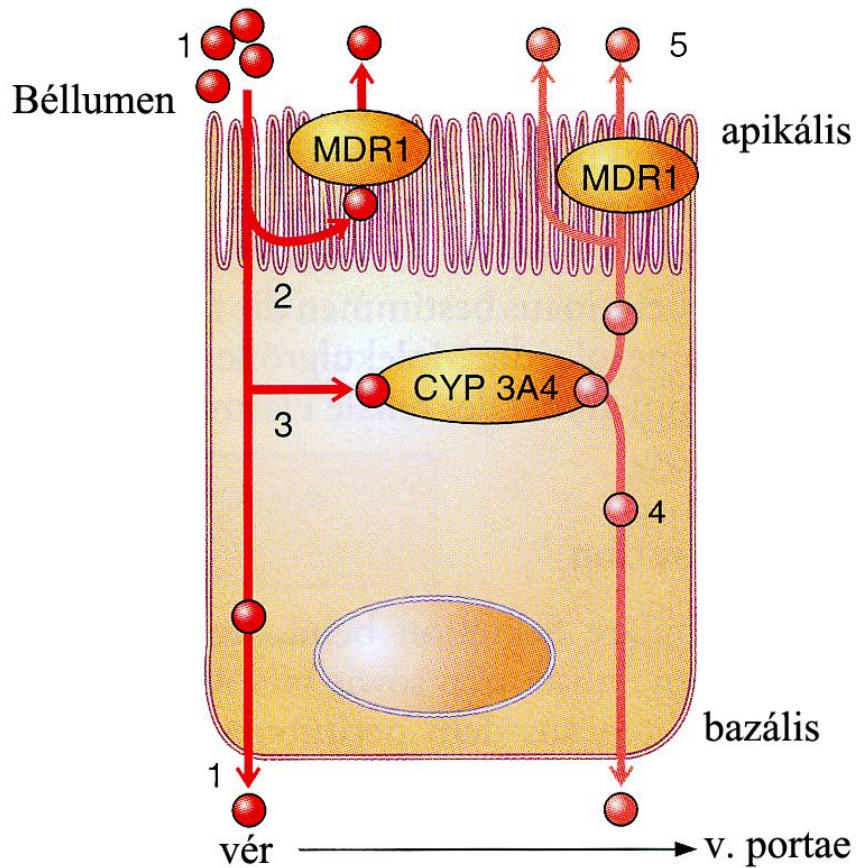
A PNP különböző dózisban (koncentrációban) történő perfúziója során kapott eredményekből megállapítható, hogy patkányban viszonylag gyorsan megjelentek a vékonybélben a PNP-metabolitok, és pedig döntő mértékben glukuronid formájában (PNP-G), a szulfát (PNP-S) ennél lényegesen kisebb mértékben volt kimutatható. Ez a megállapítás eltér a tengerimalacnál észlelt eredményektől több szempontból is. Irodalmi adatok és korábbi saját kísérletek is azt mutatják, hogy tengerimalacnál a biotranszformáció mértéke jóval nagyobb mértékű és a döntő metabolit a PNP-S. A különbség oka nem kellően ismert, a mennyiségi és a minőségi differenciát esetleg magyarázhatja a speciesek közötti eltérés a táplálkozásban, illetve a különbség az elfogyasztott táplálékok összetételében. A dózis-függő változások vizsgálata során azt

találtuk, hogy a PNP mennyisége folyamatosan és gyorsan esett a perfúziós médiumban, a kísérleti periódus (90 perc) végére a kiinduló PNP mennyiségének már csak mintegy 10-15 százaléka volt kimutatható. A bélben megjelent glukuronid metabolit folyamatosan emelkedő tendenciát mutatott ugyan, de az egyes, növekvő dózisoknál mért értékek összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a PNP-G képződés nem a dózisznövelés arányában fokozódott, az induló PNP mennyiség százalékában kifejezett adatok ugyanis egyre kisebbek lettek, ami egyértelműen szaturációra utal. Ez azt jelenti, hogy a vékonybél jelentős mértékben képes a PNP-t metabolizálni, illetve a béllumenbe exkretálni, ez a dózis emelésével növelhető ugyan, de az eliminációs kapacitás limitált.

Egy farmakon metabolitjainak a vékonybél lumenében történő megjelenésének a háttérben különböző folyamatok (transzport, enzimreakciók) állhatnak, ezeket egy összefoglaló sematikus ábrán tekinthetjük át (30. ábra).



30. ábra. A gyógyszerek (sötétebb körök, az ábra baloldali része) és metabolitjaik (világosabb körök, az ábra jobb oldali része) intesztinális exkréciója az MDR1-P-Glykoprotein-transzport közreműködésével



Az ábra az intesztinális exkréció folyamatának az egyes lépéseit mutatja be: 1- diffúzió az enterocitákba és átlépés a vérbe; 2-a gyógyszer exkréciója a béllumenbe; 3- metabolizmus; 4-a metabolitok egy részének a transzportja a vérbe; 5-a metabolitok egy részének a transzportja a béllumenbe az MDR-transzport segítségével (2., 61. old.).

Míthogy a leírt kísérleti elrendezésben mi egy különböző lépésekből (bejutás az enterocitákba, metabolizmus, a metabolit kilépése a béllumenbe) álló folyamat végeredményét mértük, a lumenben történő PNP-G metabolit megjelenésében észlelt szaturáció okáról és mechanizmusáról részleteket mondani a bemutatott kísérleti adatok alapján nem tudunk, ezek tisztázása további vizsgálatot igényel. A PNP-S mennyisége a béllumenben minden esetben és valamennyi PNP-dózisnál lényegesen alacsonyabb volt, mint a glukuronid konjugátumé, ezért a szulfát metabolitnál határozott és egyértelmű

dózisfüggés kevésbé volt kimutatható. Különböző szubsztrátok konjugációs reakcióiban más szerzők is találtak eltéréseket az extracelluláris szubsztrát koncentrációjától függően (53., 96.).

A hiperglikémiát egy kezdeti glukóz dózis i.v. adását követő folyamatos glukóz infúzióval váltottuk ki, különböző koncentrációjú glukóz infúziójával elérhető a kívánt szintű hiperglikémia (29., 31.), olyan magas vércukorszint is beállítható, amely a streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabéteszben alakul ki (17 - 34 mM = 330-600 mg/dl). A diabétesz egy komplex anyagcserezavar, amely krónikus betegség lévén, tartós változásokat hoz létre sok tekintetben, például a membrán funkciókban, transzportfolyamatokban (116.), az enzimek működésében stb. A diabétesz hátterében alapvetően hormonális változások (inzulin, glukagon) állnak és az egyik vezető tünet a magas vércukorszint, a hiperglikémia. Viszonylag kevesebb információ áll rendelkezésre a xenobiotikumok metabolizmusára és exkréciójára vonatkozólag a diabéteszhez, még kevesebb a hiperglikémiával kapcsolatban. Az értekezés egy részét képező kísérletekben ezért a hiperglikémia hatását vizsgáltuk annak a tudatában, hogy a hiperglikémia ugyan az egyik vezető, kardinális tünete a diabétesznek, de természetesen nem azonos vele. Alapvető különbség többek között, hogy a diabétesz egy krónikus betegség bizonyos patológiai változásokkal és kompenzatórikus reakciókkal, a hiperglikémia pedig csak egy tünet és a bemutatott kísérletekben egy akutan létrehozott és fenntartott állapot. Mindezzel együtt is érdekes lehet, hogy egy-egy kardinális tünet vagy eltérés a diabéteszben önmagában is képes-e kiváltani bizonyos változásokat és hogy ezek mennyiben azonosak a diabéteszben létrejövő működési zavarokkal. Az értekezésben demonstrált kísérleti adatok azt mutatják, hogy az epében mért glukóz koncentrációk gyakorlatilag párhuzamosan változtak a vércukorszinttel. Hasonló tendenciájú parallelitás volt megfigyelhető az epefolyásnál is csak éppen ellenkező előjellel, azaz a magas vércukorszintnél, illetve az epe emelkedett glukóz koncentrációja esetén alacsonyabb epefolyási értékeket mértünk, azaz a depresszív (kolesztatikus) hatás következtében csökkent az epefolyás.

A PNP-G luminális megjelenésében egyetlen időpont (15 perc) kivételével nem észleltünk szignifikáns különbséget a kontroll és a hiperglikémiás patkányok adatai között, ez azt jelenti, hogy a vékonybél glukuronidációs aktivitását a hiperglikémia lényegesen nem befolyásolta. Érdekes módon a béllumenben kisebb mértékben kimutatható PNP-S mennyiségét a hiperglikémia szignifikánsan fokozta. Minthogy a metabolitok zömét azonban a PNP-G adta, a metabolitok össz-megjelenése (PNP-G +

PNP-S) a vékonybél lumenében patkányban nem változott számottevően hiperglikémia hatására. A streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabéteszben saját egyéb vizsgálataink szerint a PNP-S a hiperglikémiás patkányokban megfigyeltekhez hasonlóan emelkedő tendenciát mutatott, míg a PNP-G lumenális megjelenése STZ előkezelést követően nőtt, azaz eltérően változott, mint a hiperglikémiás állatokban. A különbségek okát és magyarázatát nem ismerjük, differenciák lehetnek a hormonszintekben (inzulin, glukagon stb.), feltehetően a STZ beadása után eltelt hosszabb idő alatt bizonyos kompenzációs mechanizmusok is létrejöhetnek, illetve egyéb faktorok is felelősek lehetnek az eltérésekért (1.). Mindenesetre kísérleti adataink alapján megállapítható, hogy maga a hiperglikémia is létrehozhat bizonyos változásokat a xenobiotikumok eliminációjában, de eltérések találhatók például a vékonybélben történő cukorfelszívódásban is hiperglikémia hatására (28.).

A különböző bélszakaszokat érintő megbetegedések vagy sebészi beavatkozások miatt is felmerül és fontossá válhat az a kérdés, hogy az egyes bélszegmentumok funkciója hogyan változik meg, illetve hogy milyen eltérések figyelhetők meg ebből a szempontból. Az értekezésben ismertetett kísérletek egy részében azt a kérdést vizsgáltuk, hogy van-e különbség a vékonybél egyes szegmentjei (proximális jejunum, disztális jejunum és terminális ileum) között a PNP intesztinális eliminációjában. A kísérleti adatok egyértelműen mutatják, hogy valamennyi vizsgált bélszegmentum esetében a PNP-G volt a domináns metabolit, a PNP-S ennél lényegesen kisebb mennyiségben volt kimutatható a béllumenben (13.). A különböző bélszakaszokkal végzett perfúziós kísérletek adatai egyértelműen arra utalnak, hogy a PNP-G mennyisége a béllumenben szubsztrátkoncentráció függő, de szaturáció felé tendál, azaz a magasabb perfúziós koncentrációknál (dózis) relatíve egyre kisebb PNP-G megjelenési arányt észleltünk, mint amilyen mértékű a dózis emelése volt (13.). Ezek a kísérleti adatok tehát lényegében valamennyi vizsgált bélszakasz esetében megerősítik azt a megállapítást, amit a dózis-függés és a szaturáció vonatkozásában a proximális jejunális szegmentum perfúziója során tettünk. Az egyes bélszakaszoknál kapott kísérleti eredmények, valamint az összesített adatok egyúttal egyértelműen demonstrálják a csökkenő glukuronid képző aktivitást a vékonybél proximális szakaszától (proximális jejunum) a disztális irányba (terminális ileum) haladva. Az első és második fázisú metabolikus reakcióknál különböző modellvegyületek esetén a gyomortól a vastagbél irányába haladva csökkenő tendenciát más szerzők is leírtak (113.). A vékonybél és a vastagbél metabolizmusában és metabolit transzportjában

szintén megfigyeltek különbségeket például a laxatív difenolok esetén (99., 100.). A PNP-G-nél megfigyelhető tendenciáktól kvantitatíve némileg eltérően, de alapvetően ahhoz hasonlóan a telítődés jelensége a szulfát konjugátumnál is megfigyelhető volt. A glukuronid képzés csökkenésével szemben a szulfát konjugáció nem volt alacsonyabb, sőt inkább egy enyhe emelkedést észleltünk a PNP-S-nek a vékonybél lumenében történő megjelenését illetően a proximálistól a disztális irányba haladva, ami azt jelenti, hogy a disztális szegmentumokban (disztális jejunum és terminális ileum) a PNP-S luminális megjelenése magasabb volt, mint a proximális jejunumban. Hasonló kompenzatórikus emelkedést a PNP és az acetaminofen szulfatációjában korábbi kísérleteinkben magunk is észleltünk, illetve más szerzők is megfigyeltek (27., 30., 38.).

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok eredményeit röviden a következőkben foglalhatjuk össze:

1. A farmakonok eliminációjában a vékonybélnek is fontos szerepe van a per os adott gyógyszerek esetében.
2. A modellvegyületként használt PNP-t a vékonybél gyorsan és hatékonyan metabolizálja, a metabolitok megjelennek és kimutathatók a vékonybél lumenében.
3. A PNP esetében patkányban a fő metabolit a PNP-G, ennél sokkal kisebb mértékben jelenik meg a béllumenben a PNP-S.
4. A PNP-G béllumenben történő megjelenése dózisfüggő, de a folyamat szaturáció felé tendál.
5. A diabétesz egyik fő tünetét reprezentáló hiperglikémia önmagában is produkál fontos változásokat, például csökkenti az epefolyást, növeli a PNP-S luminális megjelenését, de nem változtatja meg lényegesen a PNP glukuronidációját és az össz-metabolitok luminális megjelenését.
6. A PNP-G dózisfüggő megjelenése és a szaturációs tendencia nemcsak a vékonybél proximális szakaszában, de a disztálisabb szegmentumokban (disztális jejunum, terminális ileum) is megfigyelhető.
7. Egyértelmű grádiens mutatható ki a PNP-G intesztinális eliminációjában a vékonybél proximális szakaszától a disztális irányba haladva. A PNP-G luminális megjelenése ebben az irányban kifejezetten csökken.
8. A PNP-S luminális megjelenése a PNP-G-vel ellentétben nem csökken, sőt ebben inkább egy enyhe emelkedést észleltünk: a disztális vékonybél szegmentumokban (disztális jejunum, terminális ileum) a PNP-S inkább nagyobb mennyiségben volt jelen, mint a proximális jejunumban.

A fentiekben összefoglalt eredmények egyértelműen jelzik, illetve megerősítik azt az álláspontot, mely szerint a farmakonok eliminációjában a béltraktus is nagyon fontos szerepet játszhat. Ennek különleges jelentősége elsősorban természetesen a gyógyszerek per os történő bevitele esetén van, ilyenkor ugyanis ezek a folyamatok az első passzázs effektus, illetve a biológiai hasznosíthatóság döntő tényezői lehetnek, másszóval a korrekt dozírozás szempontjából alapvetően fontos az ismeretük és a figyelembevételük. A folyamatok hátterének és a változások mechanizmusának a részletesebb analízise valamint egyéb faktorok szerepének a tisztázása további vizsgálatokat igényel.

## 6. Saját közlemények és kongresszusi prezentációk

### 6.1. Közlemények

1. E. Fischer, A. Rafiei, S. Bojcev: Intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* 83: 355-362, 1995.
2. E. Fischer, A. Rafiei, S. Bojcev: Effect of hyperglycaemia on the hepatic metabolism and excretion of xenobiotics.  
*Acta Physiol. Hung.* 83: 363-372, 1995.
3. E. Fischer, A. Rafiei, S. Bojcev: Effect of insulin on the biliary excretion of exogenous organic anions in control and hyperglycemic rats.  
*Ital. J. Gastroenterol.* 27: 155, 1995.
4. E. Fischer, A. Rafiei, S. Bojcev: Effect of hyperglycemia on the intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* 84: 287-288, 1996.
5. S. Bojcev, A. Rafiei, E. Fischer: Changes in the biliary excretion of exogenous organic anions by streptozotocin-induced diabetes.  
*Acta Physiol. Hung.* 84: 263-264, 1996.
6. A. Rafiei, S. Bojcev, E. Fischer: Dose-dependent intestinal and hepatic glucuronidation and sulfatation of p-nitrophenol in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* 84: 333-335, 1996.
7. E. Fischer, A. Rafiei, S. Bojcev, M. Beró: Intestinal and hepatic elimination of p-nitrophenol in the rat.  
*Z. Gastroenterol.* 36: 331, 1998.

8. S. Bojcsev, A. Almási, H. Simon, P. Perjési, E. Fischer: Investigation of drug metabolism in various segments of small intestine in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* 100: 115-123, 2013.
9. A. Almási, S. Bojcsev, T. Fischer, P. Perjési, E. Fischer: Metabolic enzyme activities and drug excretion in the small intestine and in the liver in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* 100: 478-488, 2013.
10. E. Fischer, A. Almási, S. Bojcsev, T. Fischer, Noémi Kovács, P. Perjési: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on the intestinal metabolism and excretion of 4-nitrophenol in the rat.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* Közlése elfogadva.
11. A. Almási, S. Bojcsev, T. Fischer, H. Simon, P. Perjési, E. Fischer: Changes in the metabolic enzyme activities and hepatic elimination of p-nitrophenol in streptozotocin-induced diabetes with or without insulin replacement in the rat.  
*Acta Physiol. Hung.* Közlés alatt.

## 6.2. Kongresszusi prezentációk

1. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: A hiperglikémia hatása testidegen anyagok metabolizmusára és exkréciójára. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1995. (Előadás)
2. Rafiei A., Bojcev S., Fischer E.: A p-nitrofenol metabolizmusa és exkréciója patkány vékonybélben. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1995. (Poszter)
3. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Effect of insulin on the biliary excretion of exogenous organic anions in control and hyperglycemic rats. Európai Bél-Transzport Csoport (EITG) Kongresszusa, Lecce-Otranto (Olaszország), 1995. (Poszter)
4. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: A p-nitrofenol hepatikus és intesztinális eliminációja patkányban. MÉT Vándorgyűlés, Budapest, 1995. (Poszter)
5. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: A hiperglikémia hatása a xenobiotikumok metabolizmusára és exkréciójára patkány májban és vékonybélben. MÉT Vándorgyűlés, Budapest, 1995. (Poszter)
6. Rafiei A., Bojcev S., Fischer E.: A p-nitrofenol dózis-függő eliminációja patkány vékonybélben. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1996. (Poszter)
7. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: A glukuronid- és a szulfátképzés jelentősége a p-nitrofenol biliáris exkréciójában luminális bélperfúzió esetén. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1996. (Előadás)
8. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Species különbségek a fenolos karakterű xenobiotikumok intesztinális eliminációjában. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1996. (Poszter)



9. Rafiei A., Bojcev S., Fischer E.: Dose-dependent intestinal and hepatic glucuronidation and sulfatation of p-nitrophenol in the rat. Magyar-Lengyel-Olasz Farmakológiai Társaságok 5. Közös Kongresszusa, Pécs, 1996. (Poszter)
10. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: Changes in the biliary excretion of exogenous organic anions by streptozotocin-induced diabetes. Magyar-Lengyel-Olasz Farmakológiai Társaságok 5. Közös Kongresszusa, Pécs, 1996. (Poszter)
11. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Effect of hyperglycemia on the intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat. Magyar-Lengyel-Olasz Farmakológiai Társaságok 5. Közös Kongresszusa, Pécs, 1996. (Poszter)
12. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: Dose-dependent intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat. Magyar és Román Élettani Társaságok Közös Kongresszusa, Szeged, 1996. (Poszter)
13. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Effect of hyperglycemia on the intestinal elimination of xenobiotics. Magyar és Román Élettani Társaságok Közös kongresszusa, Szeged, 1996. (Poszter)
14. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: Comparison of the hepatic and intestinal metabolism and excretion of p-nitrophenol in the rat. Magyar és Román Élettani Társaságok Közös Kongresszusa, Temesvár (Románia), 1996. (Poszter)
15. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Gradient of conjugating activity in the small intestine in the rat. Magyar és Román Élettani Társaságok Közös Kongresszusa, Temesvár (Románia), 1996. (Poszter)
16. Bojcev S., Rafiei A., Fischer E.: A p-nitrophenol hepatikus eliminációja. POTE Tudományos Ülései, Pécs. 1996.
17. Fischer E., Rafiei A., Bojcev S.: Az eliminációs kapacitás változása a vékonybélben a duodenumtól a coecumig. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1997. (Poszter)

18. Bojcsev S., Rafiei A., Fischer E.: A máj és a vékonybél relatív jelentősége a farmakonok eliminációjában. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1997. (Poszter)
19. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: A lumenális szulfát jelentősége a farmakonok intesztinális konjugációjában. MÉT Vándorgyűlés, Pécs, 1997. (Poszter)
20. Bojcsev S., Rafiei A., Fischer E.: A vékonybél szerepe a xenobiotikumok eliminációjában lumenális és intravénás adás esetén. MÉT Vándorgyűlés, Pécs, 1997. (Poszter)
21. Bojcsev S., Rafiei A., Fischer E.: Relative importance of the liver and small intestine in the elimination of drugs. Az Orvostudományok 13. Nemzetközi Hallgatói Konferenciája, Istanbul, 1997. (Előadás)
22. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S., Beró M.: Intestinal and hepatic elimination of p-nitrophenol in the rat. Európai Bél-Transzport Csoport Kongresszusa, Sundvollen (Norvégia), 1998. (Előadás)
23. Bojcsev S., Beró M., Fischer E.: A hiperglikémia hatása a farmakonok hepatikus és intesztinális eliminációjára. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1998. (Poszter)
24. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A., Beró M.: A xenobiotikumok vékonybélben történő metabolizmusát befolyásoló tényezők. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1998. (Poszter)
25. Bojcsev S., Beró M., Fischer E.: A hepatikus és intesztinális elimináció változása hiperglikémia hatására. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen, 1998. (Poszter)
26. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A., Beró M.: A vékonybél és a máj szerepe az első passzázs effektusban. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen, 1998. (Poszter)

27. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: A vékonybél szerepe az első passzázs effektusban, különös tekintettel a szulfát és a glukuronid képzésre. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1999. (Pozster)
28. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: Az első passzázs effektus jelentősége: konjugációs molekulák a vékonybélben. MÉT Vándorgyűlés, Budapest, 1999. (Pozster)
29. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A.: Species és dózis különbségek okozta változások a gyógyszerek eliminációjában. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2000. (Pozster)
30. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A.: Hepatic and intestinal transport of xenobiotics. Angol-Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Budapest, 2000. (Pozster)
31. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A.: A vékonybél és a máj eliminációs kapacitása fenolos karakterű gyógyszerek esetén. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2001. (Pozster)
32. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A.: A vékonybél szerepe a farmakonok eliminációjában. MÉT Vándorgyűlés, Szeged, 2001. (Pozster)
33. Fischer E., Bojcsev S., Rafiei A.: Az első passzázs effektus jelentősége a farmakonok eliminációjában. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. (Pozster)
34. Bojcsev S., Almási A., Simon H., Perjési P., Fischer E.: A metabolikus aktivitás vizsgálata a vékonybél különböző szegmentjeiben. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. (Pozster)
35. Almási A., Takács Cs., Bojcsev S., Fischer T., Perjési P., Fischer E.: A p-nitrofenol metabolizmusa: a p-nitrofenol metabolitok (glükuronid, szulfát) a bélben, májban és a vérben. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2013. (Pozster)

36. Fischer E., Fischer T., Almási A., Bojcevs S., Perjési P.: A vékonybél és a máj relatív jelentősége a gyógyszerek metabolizmusában különböző dózisok alkalmazása esetén. Membrán- Transzport Konferencia, Sümeg, 2014. (Pozster)

37. Fischer T., Almási A., Bojcevs S., Simon H., Fischer E., Perjési P.: A gyógyszermetabolizmus vizsgálata a vékonybélben perfúziós és recirkulációs módszerrel. Membrán- Transzport Konferencia, Sümeg, 2015. (Pozster)

## 7. Irodalom

1. Ackerman DM., Leibman KC.: Effect of experimental diabetes on drug metabolism in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 5 (4), 405-410 (1977)
2. Aktories K., Förstermann U., Hofmann F.B., Starke K. eds. (2008) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier, Urban und Fischer, München.
3. Almási A., Bojcssev S., Simon H., Perjési P., Fischer E.: Metabolic enzyme activities and drug excretion in the small intestine and in the liver in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 100, 478-488 (2013)
4. Almási A., Fischer E., Perjési P.: A simple and rapid ion-pair HPLC method for simultaneous quantitation of 4-nitrophenol and its glucuronide and sulfate conjugates. *J. Biochem. Biophys. Methods* 69, 43-50 (2006)
5. Almási A., Fischer E., Perjési P.: Isocratic Ion-pair HPLC Method for Quantification of 4-Nitrophenol and its conjugated metabolites from bile. *Sci. Pharm.* 79, 837-847 (2011)
6. Artursson P., Epithelial transport of drugs in cell culture. I.: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-) cells. *J. Pharm. Sci.* 79, 476-482 (1990)
7. Ayrton A., Morgan P.: Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31, 469-497 (2001)
8. Baldwin MK., Selby MA., Bloomberg H.: Measurement of phenol in urine by the method of van Haften and Sie: a critical appraisal. *Analyst* 106, 763-767 (1981)

9. Beaumont K. (2004): The importance of gut wall metabolism in determining drug bioavailability. In: Drug bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability, eds, van de Waterbeemd, Lenneräus H, Artursson P, Willey-VCH Verlag Gmbh and Co. KgaA, Weinheim, FRG, Ch. 13, pp. 311-328
10. Beaumont K., Harper A., Smith D.A., Abel S.: Pharmacokinetics and metabolism of a sulphamide NK2 antagonist in rat, dog and human. *Xenobiotica* 30, 627-642 (2000)
11. Beaumont K., Harper A., Smith D.A., Benneth J.: The role of P-glycoprotein in determining the oral absorption and clearance of the NK2 antagonist. UK-224,671, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 41-50 (2000)
12. Benet L.Z., Izumi T., Zhang T., Silverman J., Wachter V.J.: Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J. Controlled Release* 62, 25-31 (1999)
13. Bojcsev S., Almási A., Simon H., Perjési P., Fischer E.: Investigation of drug metabolism in various segments of small intestine in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 100: 115-123 (2013)
14. Bojcsev S., Rafiei A., Fischer E.: Changes in the biliary excretion of exogenous organic anions streptozotocin-induced diabetes I. *Acta Physiol. Hung.* 84, 171-172 (1996)
15. Bojcsev S., Rafiei A., Fischer E.: Changes in the biliary excretion of exogenous organic anions by streptozotocin-induced diabetes II. *Acta Physiol. Hung.* 84, 263-264 (1996)
16. Capiello M., Franchi M., Guiliani L., Pacifici G.M.: Distribution of 2-naphthol sulphotransferase and its endogenous substrate adenosine 3-phosphate 5-phosphourate in human tissues. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 37, 317-320 (1989)

17. Capiello M., Guiliani L., Pacifici G.M.: Distribution of UDP-glucuronosyl transferase and its endogenous substrate uridine 5-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 41, 345-350 (1991)
18. Cassidy MK., Huston JB.: Phenol conjugation by lung in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 29, 471-474 (1980)
19. Christophidis D. P.: Dose-dependent change of first pass effect. *Clin. Pharmacokin.* 3, 330 (1978)
20. Cvetkovic M., Leake B., Froom M.F., Wilkinson G.R., Kim R.B.: OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug. Metab. Disp.* 27, 866-871 (1999)
21. Csáky TZ., Fischer E.: Intestinal sugar transport in experimental diabetes. *Diabetes* 30, 568-574, (1981)
22. de Waziers I., Cugene P.H., Yang C.S., Lerous J.P., Beaune P.H.: Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 387-394 (1990)
23. Eadsforth CV., Coveney DC.: Measurement of phenol in urine using a high-performance liquid chromatographic method. *Analyst* 109, 175-176 (1984)
24. Escudero-López B., Calani L., Fernández- Pachón MS., Ortega A., Brighenti F., Crozier A., Del Rio D.: Absorption, metabolism, and excretion of fermented orange juice (poly)phenols in rats. *Biofactors.* 40, 327-335 (2014)
25. Fischer E., Almási A., Bojsev S., Fischer T., Kovács N., Perjési P.: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on the intestinal metabolism and excretion 4-nitrophenol in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol. Közlésre elfogadva.* (2014)

26. Fischer E., Lauterbach F.: Intestinal metabolism and metabolic transport of p-nitrophenol in the guinea pig in vivo after luminal and blood side administration. *Z. Gastroenterol.* 30, 224 (1992)
27. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: Intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 83, 355-362 (1995)
28. Fischer E., Lauterbach F.: Effect of hyperglycemia on sugar transport in the isolated mucosa of guinea pig small intestine. *J. Physiol. (London)*. 355, 567-586 (1984)
29. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: Effect of hyperglycemia on the intestinal elimination of p-nitrophenol in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 84, 287-288 (1996)
30. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S., Beró M.: Intestinal and hepatic elimination of p-nitrophenol in the rat. *Z. Gastroenterol.* 36, 331 (1998)
31. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: Effect of hyperglycaemia on the hepatic metabolism and excretion of xenobiotics. *Acta Physiol. Hung.* 83, 363-372 (1995)
32. Fischer E., Rafiei A., Bojcsev S.: Effect of insulin on the biliary excretion of exogenous organic anions in control and hyperglycemic rats. *Ital. J. Gastroenterol.* 27, 155 (1995)
33. Floren L.C., Bekersky I., Benet L.Z., Mekki Q., Dressler D., Lee J.W., Roberts J.P., Hebert M.F.: Tacrolimus oral bioavailability doubles with co-administration of ketoconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62, 41-49 (1997)
34. Fricker G., Drewe J., Huwyler J., Gutmann H., Beglinger C.: Relevance of P-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1841-1847 (1996)
35. Fromm M.F., Kim R.B., Stein M., Wilkinson G.R., Roden D.M.: Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: a unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. *Circulation* 99, 552-557 (1999)



36. George C.F.: Drug metabolism by gastrointestinal mucosa. *Clin. Pharmacokinet.* 6, 259-274 (1981)
37. Gomez D.Y., Wachter V.J., Tomlanovich S.J., Hebert M.F., Benet L-Z.: Effects of ketoconazole on intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 15-19 (1995)
38. Goon D., Klaasen CD.: Dose-dependent intestinal glucuronidation and sulphation of acetaminophen in the rat in situ. *J. Pharm. Exp. Ther.* 252, 201-207 (1990)
39. Gramatte T., Oertel R., Terhaag B., Kirch W.: Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the  $\beta$ -blocker Talinolol in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 66, 239-245 (1996)
40. Hall S.D., Thummel K.E., Watlins P.B., Kown K.S., Benet L.Z., Paine N.F., Mayo R.R., Turgeon D.K., Bailey D.G., Fontana R.J., Wrighton S.A.: Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug. Metab. Disp.* 27,161-166 (1999)
41. Hännien O., Lindström – Seppä P., Pelkonen K.: Role of the gut in xenobiotic metabolism. *Arc. Toxicol.* 60, 34-36 (1987)
42. Hartiala KJW.: Metabolism of hormones, drugs and other substances by the gut. *Physiol. Rev.* 53, 496-534 (1973)
43. Hebert M.F.: Contributions of hepatic and intestinal P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv. Drug. Del. Rew.* 27, 201-214 (1997)
44. Heizmann P., Eckert M., Ziegler W.H.: Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 16, 43S-49S (1983)

45. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmoller J., John A., Cascorbi I., Gerlo T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U.: Functional polymorphism of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3473-3478 (2000)
46. Jacobsen W., Kircher G., Hallensleben K., Mancinelli L., Detres M., Hackbarth I., Baner K., Benet L.Z., Sewing K.F., Christians U.: Small intestinal metabolism of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor lovastatin and comparison with pravastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 131-139 (1999)
47. Jones B.C., Clark S.E.: Human cytochromes P450 and their role in metabolism based drug-drug interactions, in: *Drug-Drug Interactions*. Rodrigues A.D. (ed.), Chapter 3, 55-88. Marcel Dekker Inc. New York. (2001)
48. Jones R.S.: Effect of insulin on canalicular bile formation. *Am. J. Physiol.* 231, 40-43 (1976)
49. Juliano R.L., Ling V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152-162 (1976)
50. Kaminsky L.S., Zhang Q.: The small intestine as a xenobiotic-metabolising organ. *Drug Metab. Dispos.* 31 (12), 1520-1525 (2003)
51. Kantola T., Kivisto K.T., Neuvonen P.J.: Grapefruit juice greatly increases serum concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin. Pharmacol. Ther.* 63, 397-402 (1998)
52. Kauffman F.C.: Sulfatation in Pharmacology and Toxicology. *Drug Metab. Rev.* 36, 823-843 (2004)
53. Koster A.S., Noordhoek J.: Glucuronidation in the rat intestinal wall. Comparison of isolated mucosal cells, latent microsomes and activated microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 895-900 (1983)

54. Kothare AP., Zimmerman CL.: Intestinal metabolism: The role of enzyme localization in phenol metabolite kinetics. *Drug Metab. Dispos.* 30, 586-594 (2002)
55. Krishna D.R., Klotz U.: Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 144-160 (1997)
56. Kuhn MD., Rost M., Müller D.: P-nitrophenol glucuronidation and sulphation in rat and human slices. *Exp. Toxic. Pathol.* 53, 81-87 (2001)
57. Kupferschmidt H.H.T., Riem H., Ziegler W.H., Meier P.J., Krahenbuhl S.: Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 20-28 (1995)
58. Labroo R.B., Paine M.F., Thummel K-E., Kharasch E.D.: Fentanyl metabolism by human hepatic and intestinal cytochrome P450 3A4. Implications for interindividual variability in disposition, efficacy and drug interactions. *Drug Metab. Disp.* 25, 1072-1080 (1997)
59. Laitinen M., Watkins JB. (1986): Mucosal biotransformations. In: *Gastrointestinal Toxicology*, eds. Rozman K, Hänninen O, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 169-192
60. Lampen A., Christians U., Guengerich F.P., Watkins P.B., Kolars J.C., Bader A., Dralle H., Hackbarth I., Sewing K.F.: Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450 drug interactions, and interindividual variability. *Drug. Metab. Disp.* 23, 1315-1324 (1995)
61. Lampen A., Zhang Y., Hackbarth I., Benet L.Z., Sewing K., Christians U.: Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1104-1112 (1998)
62. Lauterbach F., Schorn M., Sprakties G, Sund RB: Compartmentalization of intestinal conjugation reactions and conjugate transports: studies with phenols and p-aminobenzoic acid. *Progr. Pharmacol. Clin. Pharmacol* 7, 231-242 (1982)

63. Lilja J.J., Kivisto K.T., Neuvonen P.J.: Duration of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate simvastatin . *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 384-390 (2000)
64. Lilja J.L., Kivisto K.L., Neuvonen P.J.: Grapefruit juice-simvastatin interaction: effect on serum concentrations of simvastatin and HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* 64, 477-483 (1998)
65. Lilja J.L., Kivisto K.T., Backman J.T., Lamberg T.S., Neuvonen P.J.: Grapefruit juice substantially increases plasma concentrations of buspirone. *Clin. Pharmacol. Ther.* 64, 655-660 (1998)
66. Linn L.H., Chiba M., Baillie T.A.: Is the role of small intestine in first-pass metabolism overemphasised? *Pharm. Rev.* 51, 135-157 (1999)
67. Liu H., Wu B., Pan G., He L., Li Z., Fan M., Jian L., Chen M., Wang K., Huang C.: Metabolism and pharmacokinetics of conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats. *Drug Metab. Dispos.* 40 (11), 2109-2118 (2012)
68. Lown K.S., Bailey D.G., Fontana R.R., Janardan S.K., Adair C.H., Fortlage L.A., Brown M.B., Guo W., Watkins P.B.: Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* 99, 2545-2553 (1997)
69. Lown K.S., Fontana R.J., Schmiedlin-Ren P., Turgeon D.K., Watkins P.B.: Interindividual variation in intestinal MDR1 expression: lack of short term diet effects. *Gastroenterology* 108, A737 (1995)
70. Lown K.S., Ghosh M., Watkins P.B.: Sequences of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A4 cDNAs are identical. *Drug. Metab. Disp.* 26, 185-187 (1998)

71. Lown K-S., Mayo R.R., Leichtman A.B., Hsiao H., Turgeon D.K., Schmiedlin-Ren P., Brown M.B., Guo w., Rossi S.J., Benet L.Z., Watkins P.B.: Role of intestinal P-glycoprotein in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62, 248-260 (1997)
72. Lundahl J., Regardh C.G., Edgar B., Johnsson G.: Effects of grapefruit juice ingestion: pharmacokinetics and haemodynamics of intravenous and orally administered felodipine in healthy men. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 52, 139-145 (1997)
73. Machida M., Morita Y., Hazashi M., Awazu S.: Pharmacokinetic evidence for the occurrence of extrahepatic conjugative metabolism of p-nitrophenol in rats. *Biochem. Pharmacol.* 31, 787-791 (1982)
74. Morris ME., Hansel SB.: High-performance liquid chromatographic analysis of nitrophenol and its conjugates biological samples. *J. Chromatogr.* 522, 255-293 (1990)
75. Oda Y., Kharasch E.D.: Metabolism of methadone and levo- $\alpha$ -acetyl-methadol (LAAM) by human cytochrome P450 3A4 (CYP3A4): potential contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance and bioactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1021-1032 (2001)
76. Pacifici G.M., Franchi M., Bencini F., Repetti F., di Lascio N., Muraro G.B.: Tissue distribution of drug metabolising enzymes in humans. *Xenobiotica* 18, 849-856 (1988)
77. Pacifici G.M., Eligi M., Guiliani L: (+) and (-) terbutaline are sulphated at a higher rate in human intestine than in liver. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45, 483-487 (1993)
78. Paine M.F., Khalighi K., Fisher J.M., Shen D.D., Kunze K.L., Marsh C.L., Perkins J.D., Thummel K.E.: Characterisation of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1552-1562 (1997)

79. Paine M.F., Shen D.D., Kunze K.L., Perkins J.D., Marsh C.L., McVicar J.P., Barr D.M., Gillies B.S., Thummel K.E.: First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin. Pharm., Ther.* 60, 14-24 (1996)
80. Pesola G.R., Walle T.: Stereoselective sulfate conjugation of isoproterenol in humans: comparison of hepatic, intestinal and platelet activity. *Chirality* 5, 602-609 (1993)
81. Peters W.H., Kock L., Nagengast F.M., Kremers P.G.: Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut*. 32, 408-412 (1991)
82. Peters W.H., Kremers P.G.: Cytochromes P450 in the intestinal mucosa of man. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1535-1538 (1989)
83. Prueksaritonont T., Deluna P., Gorham L.M., Ma B., Cohn D., Pang J., Xu X., Leung K., Lin J.H.: In vitro and in vivo evaluation of intestinal barriers for the zwitterions L-767,679 and its carboxyl ester prodrug L-775,318. *Drug. Metab. Disp.* 26, 520-527 (1998)
84. Prueksaritonont T., Gorham L.M., Hochman J.H., Tran L.O., Vyas K.P.: Comparative studies of drug metabolising enzymes in dog, monkey and human small intestines and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Disp.* 24, 634-642 (1996)
85. Raeissi S.D., Guo Z., Dobson G.L., Artursson P., Hidalgo I.J.: Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine. *Pharm. Res.* 14, 1019-1025 (1997)
86. Raffei A., Bojcsev S., Fischer E.: Dose-dependent intestinal and hepatic glucuronidation and sulfatation of p-nitrophenol in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 84, 333-335 (1996)
87. Rau S.E., Bend J.R., Arnold M.O., Tran L.T., Spence J.D., Bailey D.G.: Grapefruit juice terfenadine single dose interaction: magnitude, mechanism and relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 61, 401-409 (1997)

88. Rerup CC.: Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22, 485-520 (1970)
89. Riches Z., Bloomer JC., Coughtrie MW.: Comparison of 2-aminophenol and 4-nitrophenol as in vitro probe substrates for the major human hepatic sulfotransferase, SULT1A1, demonstrates improved selectivity with 2-aminophenol. *Biochem. Pharmacol.* 74, 352-358 (2007)
90. Ritter JK.: Intestinal UGT1's as potential modifiers of pharmacokinetic and biological responses to drugs and xenobiotics. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3, 93-107 (2007)
91. Schmedlin-Ren P., Edwards D.J., Fitzsimmons M.E., He K., Lown K.S., Woster P.M., Rahman A., Thummel K.E., Fisher J., Hollenberg P.F., Watkins P.B.: Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit juice constituents. *Drug. Metab. Disp.* 25, 1228-1233 (1997)
92. Schwenk M.: Directed efflux of glucuronides and sulphate esters from the intestinal mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* 311, R15 (1980)
93. Schwenk M.: Glucuronidation and sulphatation in gastrointestinal tract. *Progr. Pharmacol. Clin. Pharmacol.* 7, 155-169 (1989)
94. Schinkel A.H., Smit J.J., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A.A.M., van der Valk M.A., Robanus Mandaag E.C., Borst P.: Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood brain and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 77, 491-502 (1994)
95. Shimada T., Yamazaki H., Mumura M., Inui Y., Guengerich F.P.: Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414-423 (1994)

96. Shiratani H., Katoh M., Nakijama M., Yokoi T.: Species differences in UDP glucuronyltransferase activities in mice and rats. *Drug. Metab. Disp.* 36, 1745-1752 (2008)
97. Smith M.T., Eadie M.J., Brophy T.O.: Pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 19, 271-278 (1981)
98. Sparreboom A., van Asperen J., Mayer U., Schinkel A.H., Smit J.W., Meier D.K., Borst P., Nooijen W.J., Beijnen J.H., van Tellingen O.: Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2031-2035 (1997)
99. Sund RB., Hillestad B.: Uptake, conjugation and transport of laxative diphenols by everted sacs of the rat jejunum and stripped colon. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51, 377-387 (1982)
100. Sund RB., Lauterbach F.: Drug metabolism and metabolite transport in the small and large intestine: experiments with 1-naphthol and phenolphthalein by luminal and contraluminal administration in the isolated guinea pig mucosa. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 58, 74-83 (1986)
101. Suzuki H., Sugijama S.: Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur. J. of Pharm. Sciences.* 12, 3-12 (2000)
102. Szkudelszki T.: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 536-546 (2001)
103. Testa B., Pedretti A., Vistoli G.: Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov. Today.* 17, 549-560 (2012)
104. Teubner W., Meinl W., Florian S., Kretzschmar M., Glatt H.: Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem J.* 404(2). 207-215 (2007)



105. Thiebaut F., Tsuroro T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C.: Cellular localisation of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7735-7738 (1987)
106. Thummel K.E., O'Shea D., Paine M.F., Shen D.D., Kunze K.L., Perkins J.D., Wilkinson G.R.: Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 59, 491-502 (1996)
107. Thummel K-E., Kunze K.L., Shen D.D.: Enzyme catalysed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv. Drug. Del. Rev.* 27, 99-127 (1997)
108. Toda A., Eyanagi R., Saito H., Soedo S., Shimeno H., Moriyama M., Shigematsu H.: Effects of experimental diabetes on hepatic drug metabolism in rats: the activities of flavin- containing monooxygenase, the phase II conjugation reactins and glutathione related enzymes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 117-118,13-27 (2005)
109. Trausch B., Oertel R., Richter K., Gramatte T.: Disposition and bioavailability of the  $\beta$ -adrenoceptor antagonist Talinolol in man. *Biopharmaceut. Drug Disp.* 16, 403-414 (1995)
110. Tukey RH., Strassburg CP.: Human UDP-glucuronosyltransferasa: metabolism, expression and disease. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 518-616 (2000)
111. van Asperen J., van Tellingen O., Beijnen J.H.: Pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol. Res.* 37, 429-435 (1998)
112. van de Kerkhof EG., de Graaf IA., Groothuis GM.: In vitro methods to study intestinal drug metabolism. *Curr. Drug. Metab.* 8, 658-675 (2007)

113. van der Kerkhof EG., de Graaf IA., de Jager MA., Meijer DK., Groothuis GM.: Characterisation of rat small intestinal and colon precision-cut slices as an in vitro system for drug metabolism and induction studies. *Drug. Metab. Dispos.* 33, 1613-1620 (2005)
114. Wachter V.J., Salphati L., Benet L.Z.: Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv. Drug. Del. Rev.* 20, 99-112 (1996)
115. Wachter V.J., Silverman J. A., Zhang Y., Benet L.Z.: Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J. Pharm. Sci.* 87, 1322-1330 (1998)
116. Watkins JB., Dykstra TP.: Alterations in biliary excretory function by streptozotocin-induced diabetes. *Drug Metabol. Disp.* 15, 177-183 (1987)
117. Watkins P.B., Wrighton S.A., Schuetz E.G., Molowa D.T., Guzelian P.S.: Identification of glucocorticoid cytochrome P450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J. Clin. Invest.* 80, 1029-1036 (1997)
118. Wetterich U., Spahn-Langguth H., Mutschler E., Terhaag B., Rosch W., Langguth P.: Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of Talinolol enantiomers: concentration and dose dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* 13, 514-522 (1996)
119. Wollenberg P., Rummel W.: Vectorial release of sulfoconjugates in the vascularly perfused mouse small intestine. *Biochem. Pharmacol.* 33, 205-208 (1984)
120. Wu B., Kulkarni K., Basu S., Zhang S., Hu M.: First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J. Pharm. Sci.* 100(9), 3655-3681 (2011)
121. Xie H., Sun S., Cheng X., Yan T., Zheng X., Li F., Qi Q., Wang G., Hao H.: Dysregulations of intestinal and colonic UDP-glucuronosyltransferases in rats with type 2 diabetes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 28, 427-434 (2013)

122. Yee. S.: In vitro permeability across Caco-2 cells can predict in vivo absorption in man – Fact or myth? *Pharm. Res.* 14, 763-766 (1997)

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Fischer Emil** egyetemi tanárnak, program- és témavezetőmnek, aki mindvégig támogatott és stimulált a PhD munkám során. Tanácsai, útmutatása, türelmes és segítőkész hozzáállása alapvetően hozzájárult ahhoz, hogy az értekezésben bemutatott kísérleteket eredményesen elvégezhettem és az adatokat az értekezésben összefoglalhattam.

Köszönöm **Dr. Barthó Loránd** és **Dr. Pintér Erika** egyetemi tanároknak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, valamint a Gyógyszertudományi Doktori Iskola korábbi és jelenlegi vezetőinek, hogy lehetővé tették számomra a kísérletes munka elvégzését és a Doktori Iskola keretein belüli tevékenységet.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Reiszné Horváth Mária** asszisztensnőnek, akitől nem csak az állatkísérletek kivitelezésében, de az értekezés összeállításának a technikai vonatkozásaiban is rendkívüli értékes segítséget kaptam.

Köszönöm **Kovács Péter** informatikusnak az értekezés összeállításában nyújtott értékes technikai segítségét.

Végül, de nem utolsósorban megköszönöm **feleségemnek** és **családomnak**, hogy mindvégig kitartó támogatásban részesítettek.