

**Kísérletes diabétesz hatása fenol- és arilpropionsav-
származékok eliminációjára a vékonybélben és a
májban**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Kovács Noémi-Piroska



Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerészi Kémia Program

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Perjési Pál

Témavezető: Dr. Almási Attila

Korábbi témavezető: Prof. Dr. Fischer Emil és Prof. Dr. Perjési Pál

Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerészi Kémia Intézet

Pécs, 2019

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés, célkitűzések	
1.1. A vékonybél és a máj szerepe a xenobiotikumok eliminációjában	6. oldal
1.2. A <i>p</i> -nitrofenol vékonybélből történő felszívódása és biotranszformációja, a folyamatokban résztvevő enzimek és transzporterek	11. oldal
1.3. Az ibuprofén vékonybélből történő felszívódása és biotranszformációja, a folyamatokban résztvevő enzimek és transzporterek	13. oldal
1.4. Metabolikus változások a diabéteszes állapotban	17. oldal
1.5. Célkitűzés	19. oldal
2. Vizsgálati módszerek és felhasznált anyagok	
2.1 Anyagok	21. oldal
2.2 Kísérletes módszerek	21. oldal
2.3 Analitikai eljárások	22. oldal
2.3.1 Módszerfejlesztés az ibuprofén-tartalmazó vékonybél-perfuzátum HPLC-UV-Vis vizsgálatára	23. oldal
2.3.1.1. A standard oldatok előállítása és kalibrációs egyenes felvétele	23. oldal
2.3.1.2. A bélperfuzátumok mintaelőkészítése az analitikai méréshez	24. oldal
2.3.2. Módszerfejlesztés az ibuprofén vékonybélperfúziója során keletkező epeminták HPLC-UV-Vis vizsgálatára	24. oldal
2.3.2.1. A standard oldatok előállítása és kalibrációs egyenes felvétele	25. oldal
2.3.2.2. Az epeminta előkészítése az analitikai méréshez	25. oldal
2.3.3. PNP HPLC analitikai módszerének ismertetése	26. oldal
2.3.3.1. PNP bélperfuzátumból való analízisének módszere	26. oldal
2.3.3.2. PNP epemintáinak analíziséhez alkalmazott HPLC módszer ismertetése	27. oldal
2.4. Eredmények értékelése, statisztikai analízis	27. oldal
3. Eredmények	
3.1. A HPLC-UV-Vis módszer kifejlesztése és validálása vékonybél-perfuzátumok (Módszer I) és epeminták (Módszer II) analízise céljából	29. oldal
3.1.1. Szelektivitás	29. oldal
3.1.2. Linearitás	30. oldal

3.1.3. Rendszeralkalmasság	32. oldal
3.1.4. Pontosság	32. oldal
3.1.5. A legkisebb kimutatható és a legkisebb mennyiségileg meghatározható értékek meghatározása	33. oldal
3.2 Az ibuprofén eltűnésének követése a vékonybél lumenből a kontroll És a kísérletes diabéteszes állatok esetében	35. oldal
3.3. A máj eliminációs tevékenységének vizsgálata - az ibuprofén és az ibuprofén-β-D-glükuronid megjelenése az epében a kezeletlen és a kísérletes diabéteszben szenvedő állatok esetében	36. oldal
3.4. A vékonybél és a máj eliminációs tevékenységének vizsgálata <i>p</i> -nitrofenol esetében	38. oldal
4. Diskusszió	
4.1. HPLC-UV-Vis analitikai módszerfejlesztés	40. oldal
4.2. A vékonybél és máj first-pass effektusban betöltött szerepe az ibuprofén intesztinális perfúziója esetében	41. oldal
4.2.1. A kísérletes diabétesz hatása a first-pass effektusban résztvevő főbb szervek (vékonybél, máj) eliminációs tevékenységére	43. oldal
4.2.1.1. A kísérletes diabétesz hatása a vékonybél eliminációs tevékenységére	44. oldal
4.2.1.2. A kísérletes diabétesz hatása a máj eliminációs tevékenységére	45. oldal
4.3. A vékonybél és máj eliminációban betöltött szerepének összehasonlítása a <i>p</i> -nitrofenol és az ibuprofén esetében	47. oldal
5. A disszertációban tárgyalt kísérleti eredmények összefoglalása	50. oldal
6. Közlemények és kongresszusi prezentációk	
6.1. Közlemények	52. oldal
6.2. Kongresszusi prezentációk	52. oldal
7. Irodalom	54. oldal
8. Köszönetnyilvánítás	64. oldal
9. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények	65. oldal

Rövidítések jegyzéke

ACN	acetonitril
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AS	aminosav
ATP	adenozin-trifoszfát
AUC _x	a vegyületek görbe alatti területe
BCRP	mellrák rezisztencia fehérje
BSEP	epesó export pumpa
Co-A	koenzim-A
COOH-IBP	karboxi-ibuprofén
COOH-IBP-G	karboxiibuprofén-glükuronid
CYP450	citokróm P450
DICL-Na	diklofenák-nátrium
ER	endoplazmatikus reticulum
MATE1	multidrog toxin extrúziós fehérje
MCT	monokarboxilát transzporter fehérje
MDR1	multidrog rezisztencia protein 1
MRP	multidrog rezisztencia protein 1
MSE	átlagos négyzetes hiba (mean squared error)
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer
NTCP	nátrium taurokolát kotranszporter
OAT	organikus anion transzporter
OATP	szerves anion transzporter polipeptid
OCT	organikus kation transzporter
OCT1	organikus kation transzporter 1
OCTN	karnitin/szerves kation transzporter
OH-IBP	hidroxiibuprofén
OST α/β	heteromér szerves oldott anyag transzporter
PEPT	peptid transzporter fehérje
P-gp	P-glikoprotein transzporter
PMAT	plazma membrán monoamin transzporter
PNP	<i>para</i> -nitrofenol/ <i>p</i> -nitrofenol
PNP-G	<i>p</i> -nitrofenol-glükuronid

PNP-S	<i>p</i> -nitrofenol- szulfát
R ²	determinációs koefficiens
RMSE	átlagos négyzetes hiba gyöke (root-mean-squared error)
RSD	relatív szórás (relative standard deviation)
SD	korrigált tapasztalati szórás (sample standard deviation)
SE	standard hiba (standard error)
STZ	streptozotocin
SULT	szulfotranszferáz
UDPGA	uridin-difoszfát-glükuronsav
UGT	uridin-glükuronil-transzferáz

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés, célkitűzések

1.1. A vékonybél és a máj szerepe a xenobiotikumok eliminációjában

A vékonybél elsődleges feladata a szervezet számára létfontosságú tápanyagok és víz felvétele, amelyhez társul az a tulajdonsága, hogy képes az orálisan bejutott vegyületek biotranszformációjára és exkréciójára (Caldwell 1982, Ilett 1990a,b), ezáltal csökkenti a vegyületek biohasznosulását. A tudomány sokáig csak a májat tekintette metabolizáló szervnek, ugyanis itt a legnagyobb a metabolizáló enzimek mennyisége és aktivitása. Az orális alkalmazás során a gyógyszerek először a gyomor-bél traktusba, majd a felszívódást követően a *vena portae*-n áthaladó vér szállításával a májba kerülnek. A vegyületek a májból a *vena hepatica*-n keresztül a szisztémás keringésbe jutnak és a véráram elszállítja őket a hatás helyére (szövetek, szervek, receptorok stb.) (Lin 1999). Ezen folyamatok során a gyógyszermolekulák átalakulhatnak (biotranszformáció, metabolizmus) és változatlan vagy metabolitok formájában kiválasztódhatnak a bélbe, illetve az epébe, mielőtt elérik a szisztémás keringést (*first-pass* effektus) (Kanter 2002, Lin 1999, Caldwell 1982, Renwick 1989, Ilett 1990a,b, Krishna 1994). Mindezekből következik, hogy a szervezetbe *per os* juttatott molekuláknak csak egy bizonyos része, hányada hasznosul, fejt ki terápiás hatást.

Ezekből adódóan a *first-pass* hatásban kiemelkedő szerep jut a vékonybélnek és a májnak egyaránt. A megvizsgált molekulák többségénél a májnak nagyobb jelentősége van a metabolizmusban, mint a vékonybélnek, de egyes gyógyszerek, illetve vegyületek vizsgálata rávilágított arra, hogy a vékonybél metabolizmusban betöltött szerepe jelentős, összevethető a máj metabolizációs aktivitásával, akár meg is haladhatja azt (Hebert 1992, Wu 1995, Paine 1996, Holtbecker 1996, Fromm 1996, Vargas 1997).

A biotranszformáció során a vegyületek lipofilitása általában csökken, a végbemenő reakciókat a szervek szintjén expresszáladó enzimesaládok katalizálják. A legjelentősebbek ezek közül a CYP450, UGT, GST valamint a SULT enzimek. Ezen enzimesaládok megtalálhatóak mind a vékonybélben, mind a májban, és szerepet játszanak a gyógyszerek jelentős hányadának a szervezetből történő eliminációjában (Shipkova 2005). Mivel a disszertációs munkában csak az UGT és a SULT enzimek aktivitását vizsgáltuk, e helyen csak a két enzimesalád tagjai által katalizált reakciók kerülnek bemutatásra.

Az UGT enzimek a CYP450 enzimekhez hasonlóan, egy több gén által kódolt enzimes család tagjai, melyek a máj, a bélfal epithél sejtek és néhány további extrahepatikus szövet (pl. vese, agy, tüdő) endoplazmatikus reticulum (ER) membránjában lokalizálódnak (Aitio 1974, Burchell 1991, Rowland 2013). A CYP450 és az UGT enzimek e speciális lokalizációja igen jelentős szerepet tölt be a CYP450 enzimek által katalizált reakciókban képződő reaktív (elektrofil) metabolitok semlegesítésében azokban a szervekben, szövetekben, ahol mind a CYP450, mind az UGT enzimek expresszálódnak.

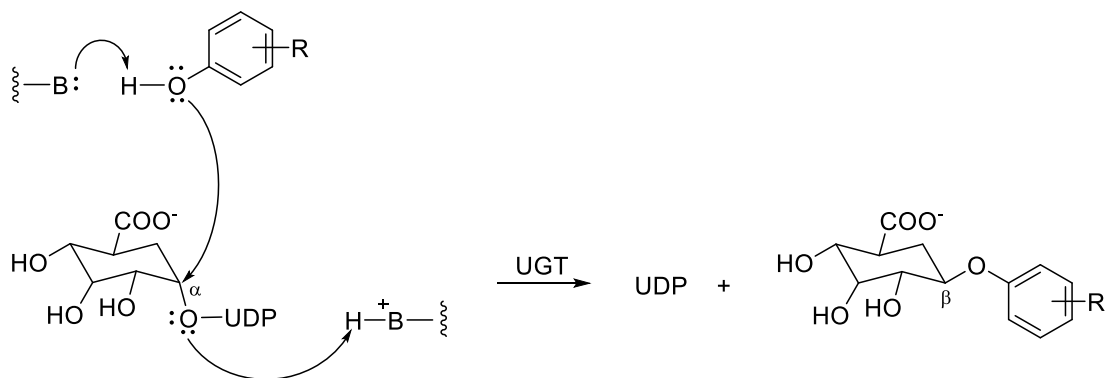
A CYP450 enzimekhez hasonlóan, az aminosav sorrend hasonlósága alapján az UGT enzimek is családokba, illetve alcsoportokba oszthatók. A humán UGT enzimek két családba, UGT1 (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10) és UGT2 (UGT2A1, UGT2A2, UGT2A3, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28) sorolhatók (Rowland 2013). A humán UGT enzimek mindegyike számos testidegen anyag glükuronsavval lejátszódó konjugációját katalizálja, és egy adott xenobiotikum általában több UGT enzimnek is a szubsztrátja.

Az UGT enzimek szubsztrátjai között szerepelnek endogén vegyületek, mint például a bilirubin, a retinoidok, a pajzsmirigy hormonok, a szteroid hormonok és a katekolaminok (Rowland 2013). Emellett számos xenobiotikum, többek között gyógyszerek és a kémiai karcinogének jelentős része inaktiválódik glükuronsavas konjugáció segítségével (Miners 1991). Az endogén szubsztrátok között a hem lebontásának végtermékét, a bilirubint vizsgálták leginkább, mivel a bilirubin magas koncentrációban agy- és vesekárosodást okoz, így kiürítése létfontosságú. Napjainkban a bilirubin metabolizmusának két olyan örökölt rendellenessége (Criegler–Naijjar szindróma és Gilbert szindróma) ismert, melyek elsődleges oka az UGT1 enzimek hiánya, vagy csökkent működése (genetikai polimorfizmus).

Az UGT enzimek szubsztrátjainak közös szerkezeti jellegzetessége, hogy reaktív nukleofil centrummal rendelkeznek melyek részvételével játszódik le az 1 ábrán bemutatott szubsztitúciós reakció. A szubsztrátok (a) hidroxilcsoporttal (alkoholok, fenolok, enolok, N-hidroxilaminok), (b) karboxilcsoporttal (aromás karbonsavak, arilalkil karbonsavak), (c) aminocsoporttal (aromás aminok, alifás aminok, savamidok, szulfonamidok), (d) tiolcsoporttal (pl. metimazol, propiltiouracil) vagy (e) lazított hidrogénatomot hordozó szénatommal (pl. fenilbutazon, szulfinpirazon) rendelkező

vegyületek (Shipkova 2005). A különböző funkciós csoporttal lejártszódo reakciók egyszerűsített egyenleteit az 1. ábra mutatja be.

1. ábra. Az UGT enzimek fenolos hidroxilcsoporttal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciója.



A humán UGT enzimek által katalizált reakciók lejártszódoása során az UDP-glükuronsav kosubsztrát anomer szénatomjának konfigurációja minden esetben ellentétessé válik, a reakció lejártszódoása az aszimmetriás szénatom inverziójával jár (1. ábra). E tapasztalat alapján Axelrod a reakciót a kosubsztrát és a szubsztrát (testidegen anyag) között lejártszódo S_N2 mechanizmus alapján lejártszódoó reakcióként értelmezte (Parkinson 2013). A későbbi vizsgálatok eredményei alátámasztották Axelrod feltételezését. A szubsztrát kötőhely környezetében lévő hisztidin aminosav egység a szubsztrát deprotonálódását és ennek eredményeképpen nukleofil erejének megnövekedését eredményezi.

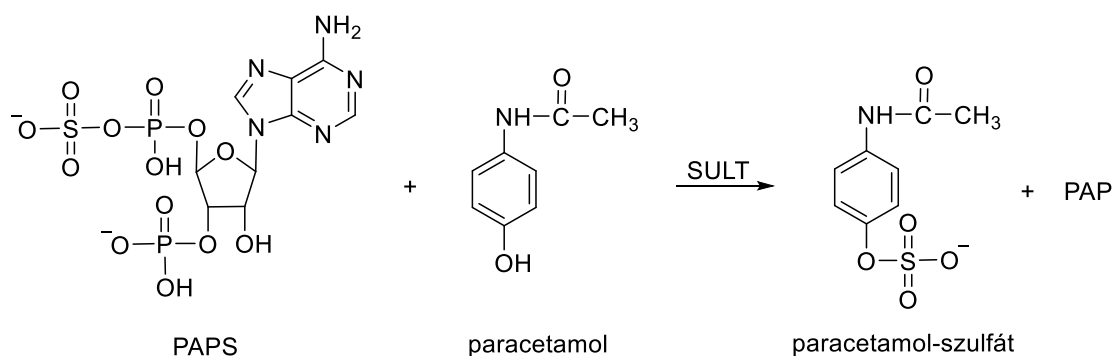
A glükuronid-konjugátumok poláris, vízben jól oldódó metabolitok. A konjugáció eredményeképpen az anyavegyület hidrofil tulajdonsága nő, tömege nagyobb lesz, nehezebben kötődik a fehérjékhez, ezáltal a szervezetből történő kiürülése kedvezményezettebbé válik. A glükuronid konjugátumok főleg az epével, vagy a vizelettel ürülnek ki a szervezetből (Shipkova 2005).

A szulfát-konjugáció (szulfálás, szulfatálás) a második leggyakoribb átalakulás a Fázis II reakciók között. A szulfát-konjugáció igen fontos metabolikus átalakulási reakciója többek között a szteroid hormonoknak, az epesavaknak, a pajzsmirigyhormonoknak, a katekolamin neurotranszmittereknek, valamint a fenolos hidroxilcsoporttal rendelkező gyógyszervegyületeknek és egyéb testidegen anyagoknak (Falany 1991 és 1997). A konjugátumok fiziológiai szempontból legfontosabb

tulajdonsága azok megnövekedett vízdékonysága és kiválasztódása, mivel a keletkező szulfátészterek pK_s értéke 1-2 közötti érték (így a konjugátumok fiziológiai körülmények között teljesen ionizált formában található). Néha azonban az elsődleges konjugátumok továbbalakulása reaktív (toxikus) elektrofil részek képződését eredményezi (Glatt 1997, Glatt 1998a,b).

Bár a metabolikus átalakulás meglehetősen régóta ismert, a konjugáció mechanizmusát, illetve abban a szulfotranszferáz (SULT) enzimek és a 3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát (PAPS) kofaktor szerepét csak az 1950-es évektől kezdődően írták le. A szulfát-konjugáció általános reakcióútját - a paracetamol-szulfát képződésének példáján - a 2. ábra mutatja be.

2. ábra. A paracetamol-szulfát képződésének szulfotranszferáz (SULT) enzimek által katalizált reakciója.



Az aktivált szulfát (3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát; PAPS) szervesen szulfát és ATP reakciójában, kétlépéses reakcióban képződik. Az első - ATP szulfuriláz enzim által katalizált - reakcióban a szervesen szulfát és ATP reakciójában adenzin-5'-foszfoszulfát (adenil-szulfát) képződik, ami a foszfoadenozin-foszfoszfát enzimkomplex második tagja, az adenzin-5'-foszfoszulfát-kináz enzim által katalizált reakcióban - egy következő ATP molekulával reagálva - 3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfáttá (PAPS) alakul (2. ábra). Az aktivált szulfát (PAPS) és az akceptor vegyület közötti reakciót a szulfotranszferáz (SULT) enzimek katalizálják (2. ábra).

A metabolikus transzformáció leírására az irodalomban leggyakrabban a szulfát-konjugáció kifejezéssel találkozhatunk. Amint azonban az ábrán látható, a szulfát-konjugáció kifejezés egy szulfocsoport ($-SO_3^-$) és nem egy szulfátion (SO_4^{2-}) átvitelét jelenti a PAPS-ről a szubsztrát molekulára. A SULT enzimek a szulfocsoportnak

hidroxilcsoportokra és aminocsoportokra történő átvitelét katalizálják. Ezért a reakció leírására a szulfálás, illetve a szulfatálás megnevezés is alkalmazható.

A SULT enzimek több gén által kódolt enzimcsalád tagjai, melyek két nagy csoportba sorolhatók:

(1) membránhoz kötött SULT enzimek, melyek a sejtek Golgi-apparátusában lokalizálódnak és endogén peptidek, proteinek, lipidek és glükóz-aminoglikánok szulfálását katalizálják, valamint

(2) elsősorban a máj, a bélfal epithel sejtek, a vese, az agy és a vérlemezkék citoszoljában lokalizálódó SULT enzimek, melyek a testidegen anyagok és kismolekulatömegű endogén szubsztrátok (szexuáliszteroidok, epesavak, neurotranszmitterek) szulfatálását katalizálják (Coughtrie 1998, Falany 1997).

Jelen dolgozat keretében csak az utóbbi csoportba tartozó enzimek által katalizált folyamatok kerülnek bemutatásra.

A citoszolban lokalizálódó SULT enzimek emlősökben hat géncsaládba (SULT1-6) csoportosíthatók (Falany 1991). Az egy géncsaládba tartozó enzimek legalább 45% aminosav homológiát mutatnak (Yamazoe 1994). A SULT3 családba tartozó enzimek ezideig halakban, madarakban, kétélűekben, emlősökben, a SULT5 családba tartozó SULT5A1 rágcsálókban, nyúlban, kétélűekben, halakban, míg a SULT6 családba tartozó enzimek számos emlősben, madárban és halban voltak megtalálhatók. Emberben a SULT1, a SULT2 és a SULT4 családba tartozó szulfotranszferázok voltak ezideig azonosíthatók.

Az egyes családokba tartozó szulfotranszferázok aminosav homológiájuk alapján alcsoportokba csoportosíthatók. Az egy alcsoportba tartozó individuális enzimek legalább 60%-os homológiát mutatnak (Yamazoe 1994). Ez alapján a SULT1 családba tartozó enzimek öt alcsoportba (SULT1A-SULT1E), a SULT2 családba tartozó enzimek két alcsoportba (SULT2A és SULT2B) sorolhatók. A SULT4 családba tartozó enzimek egy alcsoportot (SULT4A1) alkotnak. A SULT1A2, SULT1A3 és SULT1A5 izoenzimek számos fenolos gyógyszervegyület (pl. paracetamol), szteroid hormon és katekolamin átalakítását katalizálják. A SULT1B1 preferáltan a pajzsmirigyhormonok, a SULT1E1 az ösztadiol (E2) és az ösztrol (E1) szulfát-konjugációjában vesznek részt.

A szulfát-konjugáció elsődlegesen a fenolos vegyületek metabolikus transzformációs reakciója. A PAPS, illetve a szervetlen szulfát-kínálat a reakciók sebességét meghatározó tényezők. A szulfát-kínálat általában alacsony, ezért az könnyen

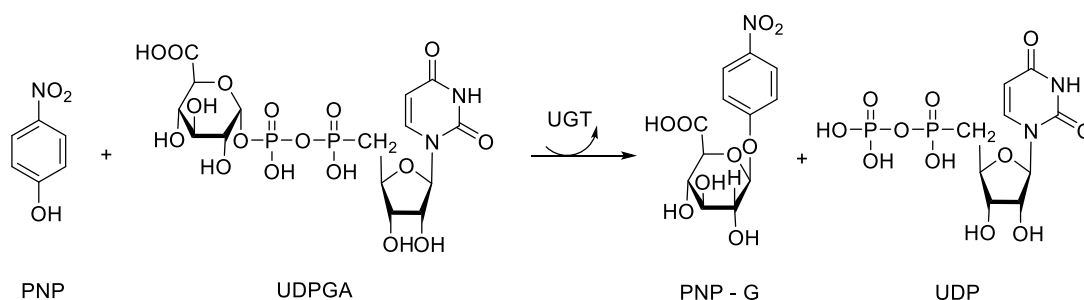
kimeríthető. A gyógyszervegyület növekvő dózisával a szulfát-konjugáció dominanciája csökken (Krijgheld 1981). A szerves szulfát mellett szerves szulfát prekursorok (L-metionin, L-cisztein) is növelik a celluláris PAPS szintet. Alacsony PAPS, szerves szulfát és kéntartalmú aminosav szintek, illetve magas fenolos gyógyszervegyület koncentrációk esetén a fenolos funkció szulfálása helyett annak kompetitív metabolikus átalakulásai, így a glükuronsav-konjugáció, illetve az O-metilézés kerülnek előtérbe.

1.2. A *p*-nitrofenol vékonybélből történő felszívódása és biotranszformációja, a folyamatokban résztvevő enzimek és transzporterek

A *p*-nitrofenol egy benzolgyűrűs alapvázal rendelkező, 4-helyzetben nitrocsoporttal szubsztituált fenol. A vegyület szubtoxikus dózisban terápiás hatással nem rendelkezik. Mint modellvegyület, igen alkalmas a vékonybél konjugációs (Fázis II) aktivitásának vizsgálatára, mivel metabolizmusa szinte kizárólagosan *p*-nitrofenol-glükuronid (PNP-G) és *p*-nitrofenol-szulfát (PNP-S) képződését eredményezi (Kuhn 2001, Kothare 2002, Eadsforth 1984). A glükuronidképzésben az UDP-glükuroniltranszferáz (UGT) vesz részt, a szulfátképzést pedig a szulfotranszferáz (SULT) enzimek katalizálják.

A *p*-nitrofenol glükuronsavval lejátszódó konjugációs reakcióját a 3. ábra, míg a szulfát-konjugációt a 4. ábra mutatja be.

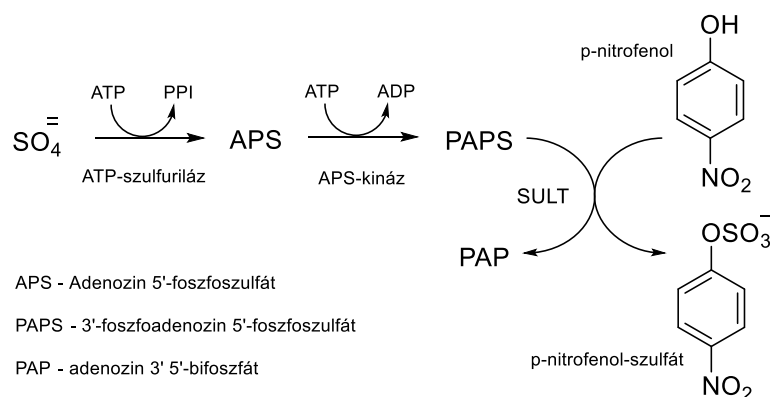
3. ábra. A *p*-nitrofenol glükuronsavval lejátszódó konjugációja.



A kísérleteink során alkalmazott patkány bélcsatornájának a felépítése és működése sok hasonlóságot mutat a humán intesztinális rendszerrel, eltérően más, a törzsfajlásban hozzá közelebb álló fajokétól (Zhao 2003). A tápcsatornában található

enzimek döntő hányada a vékonybélben, azon belül is az epitelsejtekben található. A vékonybél a tápcsatorna leghosszabb szakasza, emellett számos felületnövelő struktúrát is tartalmaz, ami mind a felszívódás, mind az elimináció szempontjából fontos. Az egyes enzimek expressziója és aktivitása változó a bélrendszer különböző szakaszain, ezért a gyógyszerek metabolizmusa is jelentősen eltérhet az egyes szegmentumokban.

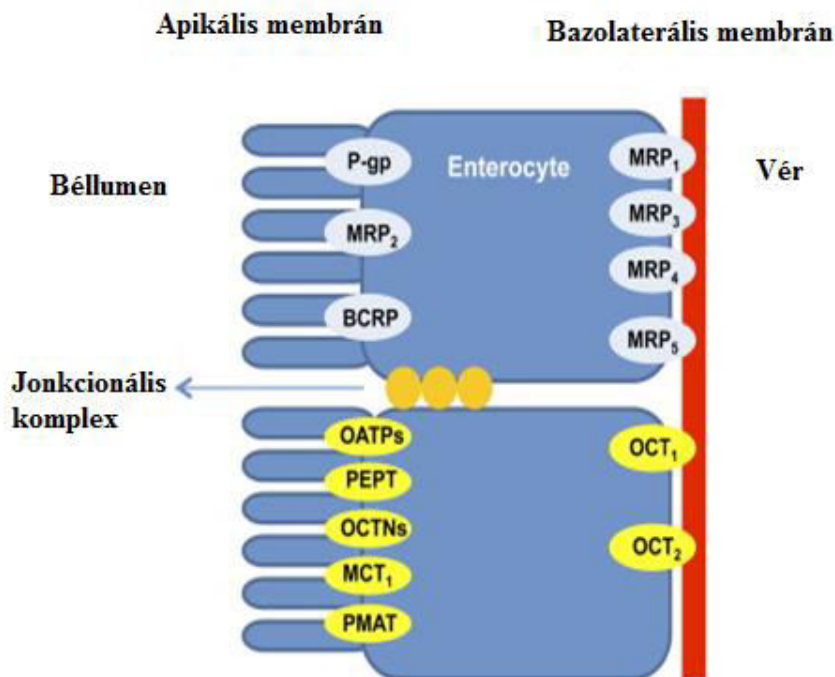
4. ábra. A *p*-nitrofenol szulfát-konjugátummá történő átalakulása.



Az 5. ábra demonstrálja azokat a lehetséges folyamatokat, amelyek a gyógyszerek *per os* adása során a molekulák sorsát a béltraktusban befolyásolják, illetve meghatározzák. A hatóanyag a gyógyszerkészítményből (pl. tabletta) történő felszabadulását követően a gyógyszer-molekulák a bélen keresztülhaladva a széklettel elhagyhatják a szervezetet bármilyen változás vagy felszívódás nélkül. A molekulák azonban már a béllumenben is kémiai átalakulhatnak és metabolitként, vagy eredeti formában beléphetnek az enterocitákba. A bélhámsejtekből mind az anyavegyületek, mind az ott képződött metabolitok továbbjuthatnak a *vena portae*-n keresztül a májba, de exkréció révén visszakerülhetnek a bél lumenébe is, ahonnan ismét visszajuthatnak a májba (enterohepatikus körforgás), vagy intesztinális exkrécióval eliminálódhatnak, azaz a széklettel elhagyják a szervezetet (5. ábra).

Munkám során vizsgált vegyületek és metabolitjaik szempontjából kiemelkedő jelentőséggel bírnak az enterociták apikális oldalán expresszáldó P-glikoprotein (P-gp, MDR1) valamint MRP2 transzporterek, melyek részt vesznek az enterocitákban szintetizálódó metabolitoknak az intesztinális lumenbe történő exkréciójában.

5. ábra. A bélsejtekben expresszálandó főbb, felvételben (sárga) és kiürítésben (világoskék) résztvevő transzporter fehérjék (Estudante 2013).



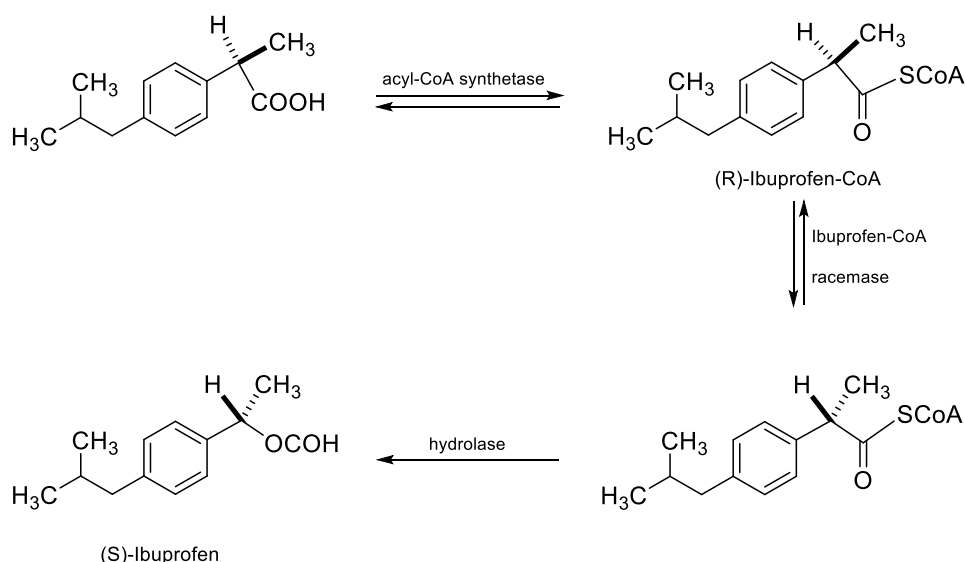
1.3. Az ibuprofén vékonybélből történő felszívódása és biotranszformációja, a folyamatokban résztvevő enzimek és transzporterek

Az ibuprofén a 2-arilpropionsav csoportba tartozó nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyület (NSAID). Az egy szimmetriacentrumot hordozó molekula a terápiában racém formában kerül alkalmazásra, kihasználva három fő (gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és lázcsillapító) farmakológiai hatását (Adams 1967). Széles körben alkalmazzák lázas állapotok, különböző eredetű fájdalmak, gyulladás csillapítására többféle (kapszula, szuszpenzió, tablettá, drazsé, kúp, gél) gyógyszerformában. A terápiában leggyakrabban *per os* adagolás révén kerül felhasználásra. A felszívódása patkányokban nagymértékben a vékonybél szintjéről valósul meg (Adams 1969), amint az a vegyület $pK_s=4,50$ (Domanska 2009, Dietzel 1990) értékéből várható; ugyanakkor, a gyomor szerepe sem elhanyagolható ezen a téren (Adams 1969). A racém vegyület (*R*)-enantiomerje felszívódás után átalakulást, inverziót szenved (farmakológiai szempontból aktív enantiomer képződése), melynek lépéseit a 6. ábra mutatja be. A

vizelettel, széklettel kiürülő metabolitok jobbra forgatják a polarizált fény síkját (Adams 1967).

A metabolikus transzformációk egyik igen speciális esete a 2-arylpropionsav származékok epimerizációja. A propionsav oldalláncban aszimmetrikus szénatomot hordozó arilpropionsav származékok mindegyikének (*S*)-enantiomerje mind *in vitro* mind *in vivo* hatékonyabb COX-inhibitor mint a megfelelő (*R*)-enantiomer. Nincs szükség azonban a vegyületek optikailag aktív formában történő terápiás alkalmazására, mert a szervezetben az (*R*)-enantiomerek 2-arylpropionsav-CoA epimeráz enzim által katalizált egyirányú (*R*)→(*S*) epimerizációja játszódik le. Az epimerizáció egyirányú lejátszódásának alapja az epimeráz enzim (*R*)-arylpropionsav CoA-S-észter szubsztrátjának acil-CoA-szintáz enzim által katalizált sztereoszelektív képződése. A reakciót katalizáló enzim sztereospecificitást mutat az (*R*)-ibuprofén iránt (Knihinicki 1989, Hall 1994). Az (*R*)-ibuprofén→(*S*)-ibuprofén inverzió több szövetben lezajlik, ilyen a máj, a diafragma, az izom, a vese, a zsírszövet, de nem észleltek acil-CoA-szintáz aktivitást a vékonybélben, a tüdőben és a vakbélben (Knadler 1990, Jeffrey 1991, Hall 1993). Az arilpropionsavak propionsav oldallánca epimerizációjának mechanizmusát a 6. ábra mutatja be.

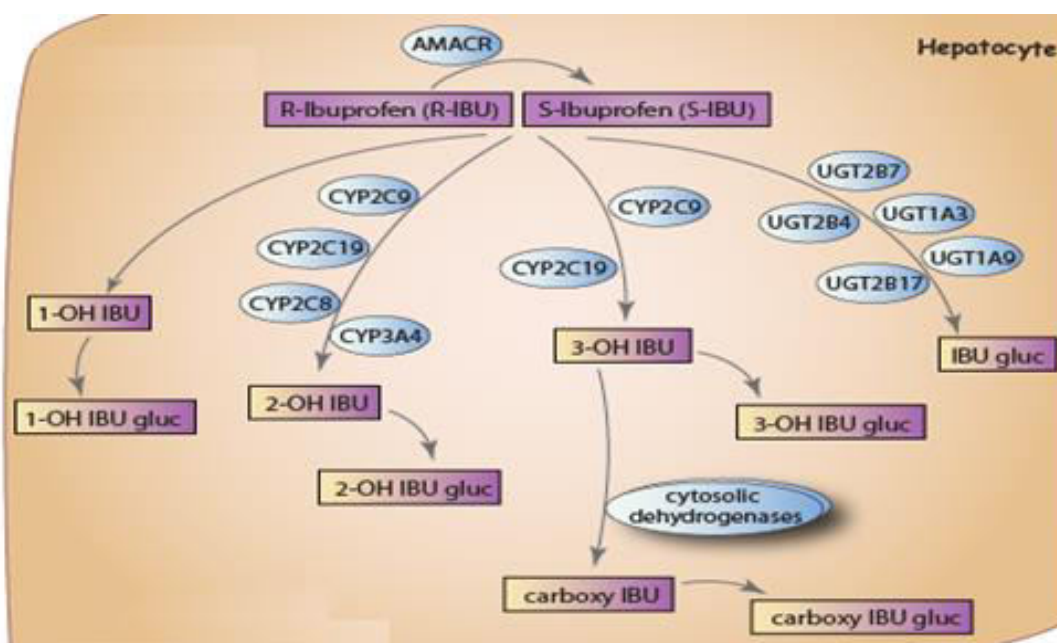
6. ábra. Az ibuprofén inverziójának sematikus bemutatása.



Az ibuprofén a szervezetben a legtöbb gyógyszermolekulához hasonlóan kémiai átalakul a szervezetben (metabolizmus). A szervezetbe kerülő ibuprofén teljes

mennyisége átalakul, a vizeletben az anyavegyület nem mutatható ki (Liudmila 2015). Az anyavegyület metabolizmusának fő iránya a CYP enzimek által katalizált oxidatív átalakulás, melynek eredményeképpen 1-, 2-, illetve 3-helyzetben hidroxilszubsztituált ibuprofén metabolitok keletkeznek. Utóbbi a citoszolban található dehidrogénázok által katalizált reakcióban a megfelelő 3-karboxiszármazékká oxidálódik. Mind az ibuprofén, mind oxidált metabolitjai glükuronsav konjugátumot képeznek, melyek a széklettel, vagy a vizelettel exkretálódnak a szervezetből (Liudmila 2015). A metabolizmusban résztvevő enzimeket és a képződött metabolitokat a 7. ábra foglalja össze.

7. ábra. Az ibuprofén metabolikus útvonalai, enzimek és képződő metabolitok (Liudmila 2015).



Ahogy az ábra is mutatja az ibuprofén metabolizmusa számos enzim részvételével zajlik a szervezetben. Az ibuprofén oxidatív átalakulásaiban a CYP2C9 izoforma játsza a fő szerepet. Az enzim mint az (*R*)-, mint az (*S*)-ibuprofén 2-OH- illetve 3-OH-ibuproféné történő oxidációját katalizálja (Kepp 1997, Hamman 1997, Chang 2008) A CYP2C8 izoforma oxidációban betöltött szerepe kisebb, az (*R*)-ibuprofén oxidációját katalizálja 2-OH-ibuproféné (Hamman 1997, Chang 2008). Magasabb terápiás dózisoknál az oxidációs folyamatban a CYP3A4 izoforma is részt vesz, 2-OH-ibuprofént képezve (Chang 2008). A CYP2C19 izoforma szerepe minimális az ibuprofén metabolizmusában (Chang 2008).

A felszívódott ibuprofén egy része glükuronsavval konjugációba lép anélkül, hogy előtte oxidációt szenvedett volna (Davies 1998). *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy reakciót az UGT szupercsalád több izoenzime is képes katalizálni: UGT2B7, UGT2B4, UGT1A3, UGT2B17 és UGT1A9 (Kuehl 2005, Sakaguchi 2004, Turgeon 2003). Az ábrára nincs feltüntetve de a bélben expresszáldó UGT1A10 is képes az ibuprofén konjugációs reakcióját katalizálni (Basu 2004). A CYP izoformák által létrehozott hidroxil- és karboxiszármazékok glükuronsavval konjugálódhatnak, de a reakciókat katalizáló UGT enzimeket ezideig még nem sikerült azonosítani (Liudmila 2015).

A transzporter fehérjék többsége képes kölcsönhatásba lépni a NSAID csoport tagjaival. Ezek közül megemlíthjük az:

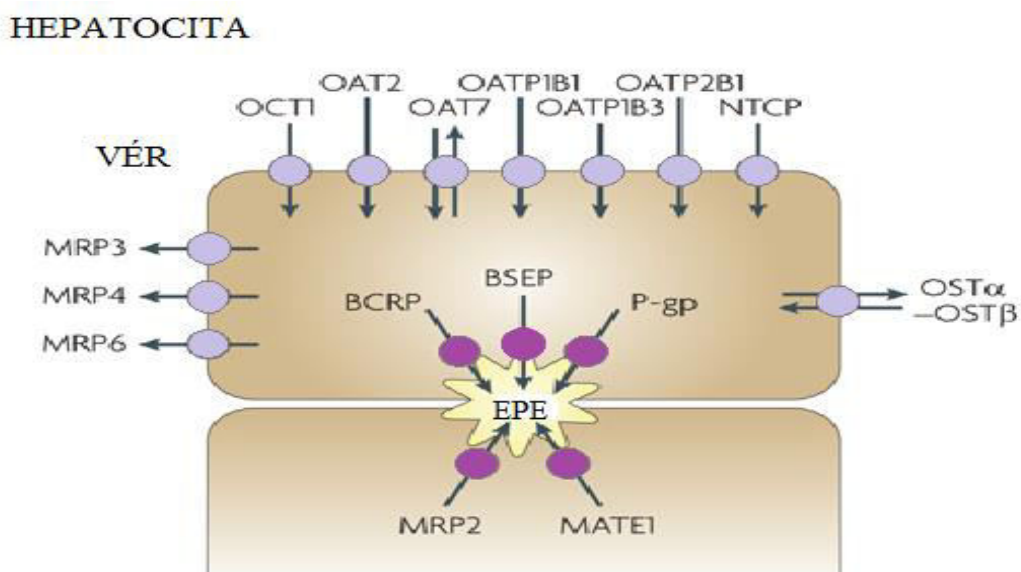
- organikus anion transzportert (hOAT) a vesében és a bélben,
- a máj organikus anion transzportert (hOATP),
- multidrog rezisztencia protein transzporter családot (MRP), valamint a
- bél peptid transzportert (SLC15A1).

Az IBP egy gyenge sav, lipofil karakterű, emiatt elképzelhető, hogy transzporterek segítségével felszívódik. Még nem sikerült tisztázni, hogy abszorpciójában fehérjék részt vesznek vagy nem, ám számos transzporterrel lép kölcsönhatásba, ami a gyógyszer- interakciók szempontjából jelentőséggel bír. *In vitro* kísérletekben sikerült kimutatni, hogy különböző organikus transzporterek, SLC22A6 (hOAT1), SLC22A7 (hOAT2), SLC22A8 (hOAT3), SLC22A9 (hOAT4), SLC22A1 (OCT1), SLC15A1 (hPEPT1), SLC5A8 (hSMCT1) és SLC16A1 (MCT1) képesek voltak az IBP felvételére, ezáltal gátolni más vegyületek felvételét (inhibitor hatás) (Khamdang 2002, Chu 2007, Itagaki 2006, Omkvist 2010, Tamai 1995, Wang 2012). A fenolos vegyületek vizsgálata során sikerült kimutatni az MRP2, MRP3, illetve MRP4 szerepét a glükuronsav-konjugátumok szállításában a sejtek között. Az MRP2 szerepe a szervezet védelme a káros anyagokkal szemben, ezek eltávolítása a sejtekből, emiatt a fontosabb eliminációban résztvevő szervek szintjén jelen van, megtalálható a bélben, májban, vesében, placentában egyaránt (Wu 2011).

A 8. ábra mutatja be azokat a lehetséges folyamatokat amelyek a vegyületek sorsát a májban befolyásolhatják és meghatározzák. A *per os* bejuttatott hatóanyag molekuláinak egy része a *véna-portae*-n a májsejtekbe jut, ahol biotranszformációt szenvedhet, melynek során aktív vagy inaktív metabolitok keletkezhetnek. Az aktív formák a megfelelő transzporterek segítségével a szisztémás keringésbe, onnan pedig a

hatás helyére szállítódnak, kiváltva a várt farmakológiai hatást. A kémiai átalakulás következtében képződött metabolitok (és a nem-metabolizálódó anyavegyület) transzportfehérjékhez (esetünkben a P-gp-nek illetve a MRP2-nek van jelentős szerepe) kapcsolódva kiválasztódnak az epébe, és így visszakerülnek a vékonybélbe, ahonnan a széklettel kiválasztódnak a szervezetből. Azonban a vékonybélbe kiválasztódott metabolitok az itt expresszálódó (elsősorban hidrolitikus) enzimek regenerálhatják az aktív molekulát, ami a vékonybélből újból felszívódhat (enterohepatikus körforgás).

8. ábra. A hepatocita felszínén expresszálódó főbb, felvételen (szürke) és kiürítésben (lila) résztvevő transzporterek (Giacomini et al. 2010)



1.4. Metabolikus változások a diabéteszes állapotban

A diabétesz mellitus egy összetett endokrin anyagcserezavar, amely a világ lakosságának nagy hányadát érinti és folyamatosan növekvő tendenciát mutat. A szervezet ezen kóros állapota számos élettani funkció megváltozását vonja maga után, érintve a hormonális változásokat, a glükóz felvételt és felhasználást, a protein szintézist, az enzimek mennyiségét és működését (Anderson 1974 és 1975, Bojcev 1996, Csáky 1981, Dostalek 2012, Fischer 1984, Jefferson 1983). Legjellemzőbb tünetei a hiperglikémia és a glükózuria. Annak ellenére, hogy a hiperglikémia önmagában képes a szervezet normális működésében különböző változásokat kiváltani,

ilyen például a cukor transzport/szállítás fokozása (Fischer 1984, Csáky 1977 és 1981), közvetlen hatását a vegyületek eliminációjára kevesen vizsgálták (Ackerman 1977, Fischer 1995 és 1996).

Mivel a cukorbetegséget számos tünet és élettani funkció zavara jellemzi, a szakirodalom több adattal szolgál az exogén anyagok biotranszformációjában és exkréciójában megfigyelt változásokról kísérletes diabéteszben. Az enzimek és a transzporterek mennyiségében és működésében észlelt változások következtében módosulhat a vegyületek farmakokinetikája (Dostalek 2012, Watkins 1988). Ezenkívül kísérletes diabéteszben változhat az epefolyás illetve a vegyületek biliáris exkréciós aránya (Bojcssev 1996, Watkins 1987).

A kísérletes diabétesznek a vegyületek metabolizmusára kifejtett hatását számos állatkísérletes modell szemlélteti (Dixon 1961, Toda 1987, Cook 1984, Kudo 2010).

Dixon és társai különböző vegyületek metabolizmusát vizsgálva kísérletes diabéteszben szenvedő patkányokon csökkenést észleltek a vizsgálatokba bevont exogén anyagok (hexobarbitál, klórpromazin és kodein) hepatikus biotranszformációjában (Dixon 1961). Ezen kísérleti eredményekből kiindulva Ackerman és Leibman a későbbiekben más körülmények között újra vizsgálatnak vetette alá a hexobarbitált, amikor megfigyelték, hogy a streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabéteszben a hexobarbitál hatása megnyúlt, illetve a metabolizmusa lelassult (Ackerman 1977).

Az aminopirin metabolizmusát experimentális diabéteszes állatkísérletes modellen Toda (1987) és társai vizsgálták. Az aminopirint *i.p.* adagolva HPLC segítségével vizsgálták az át nem alakult vegyület és fő metabolitjainak mennyiségét a vérben. Az endokrin anyagcserezavarban szenvedő patkányok lassabban metabolizálták az aminopirint a kontroll csoporthoz képest. A vegyület farmakokinetikai paramétereit vizsgálva növekedett plazmakoncentrációt, növekedett szérumszfézési időt és csökkent szérumszfézési klírenszt figyeltek meg a kutatók.

Az antibiotikumok köréből a klaritromicin farmakokinetikai paramétereit és hepatikus metabolizmusát diabéteszes állatkísérletes modellen Kim és társai (2005) vizsgálták. A vegyület perorális és intravénás úton való alkalmazását követően a szerzők a klaritromicin koncentráció-idő görbe alatti területének szignifikáns csökkenést figyeltek meg a diabetikus állapotban a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezen kívül a klaritromicin hepatikus metabolizmusának gyorsulása volt megfigyelhető. A teofillin

metabolizmusát vizsgálva hasonló körülmények között ezen csoport szintén csökkenést figyelt meg a vegyület görbe alatti területének nagyságában (Kim 2005).

A β -blokkolók köréből a metoprolol-t vetették alá az előbbiekhöz hasonló vizsgálatoknak. Perorálisan adagolva a vegyületet és a farmakokinetikáját vizsgálva az előbbi néhány példához hasonlóan, a kísérletes diabéteszben szenvedő állatcsoport esetében a metoprolol görbe alatti területének csökkenése volt megfigyelhető a kontroll csoporthoz viszonyítva (Lee 2013).

A vizsgálatokba bevont vegyületek sora még nem ér véget. Ugyanakkor, a fentiektől eltérő változások is megfigyelhetők voltak. Az orális antidiabetikumok közül a glibenklamid, míg a nem-szteroid gyulladáscsökkentők csoportjából a diklofenák farmakokinetikáját vizsgálva a kutatók növekedést észleltek a glibenklamid görbe alatti területének nagyságában, illetve mind a glibenklamid, mind a diklofenák kiürülése csökkent a kísérletes diabetikus állapotban (Li 2012).

1.5. Célkitűzés

A disszertációs munka célja a különböző funkciós csoportokkal rendelkező vegyületek, metabolizmusának és exkréciójának vizsgálata a vékonybélben és a májban, kontroll és kísérletes diabéteszes állatokon. A választásunk azért esett e két szervre, mert *per os* alkalmazás esetén a vegyületek legnagyobb része a vékonybélből szívódik fel, ott metabolizálódhatnak, és az anyavegyület valamint a metabolitok kiválasztódhatnak a széklettel, illetve a *vena portae*-n keresztül májba kerülhetnek. Megjegyzést érdemel, hogy a két szerv metabolikus és eliminációs tevékenységének egyidejű vizsgálatára kevés irodalmi adat áll rendelkezésre.

Napjainkban egyre több családot érint a diabétesz mellitus kóros állapot. A betegségben fennálló hiperglikémiás állapot számos élettani szempontból fontos reakciót befolyásol; így többek között változhat a testidegen anyagok felszívódása, biotranszformációja, és kiürülése a szervezetből. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre arról, hogy a diabetikus állapot hogyan hat a különböző gyógyszervegyületek metabolizmusára és szekréciójára orális alkalmazás esetén.

Az ibuprofént, mint nem-szteroid gyulladáscsökkentőt számos cukorbetegségben szenvedő beteg is alkalmazhatja különböző eredetű panaszok enyhítésére. Emiatt fontosnak tartjuk a vegyület biotranszformációjának és kiválasztódásának vizsgálatát

diabéteszes állapotban. A *p*-nitrofenolt azért választottuk a vizsgálatok tárgyául, mert egyrészt biotranszformációja jól ismert, másrészt korábban már vizsgáltuk a vegyület intesztinális eliminációját hasonló körülmények között.

Ahhoz, hogy a vizsgálatok során pontos következtetéseket tudjunk levonni, gyors és pontos analitikai módszerekre volt szükségünk, amely segítségével vizsgálni tudtuk a kísérletek során gyűjtött nagyszámú mintából a vegyületek a képződött metabolitjainak a mennyiségét. E célból validált HPLC-UV-Vis módszereket alkalmaztunk.

Összefoglalva a fentebb elmondottakat, a dolgozatban a következő fontosabb célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. RP-HPLC-UV-Vis analitikai módszer fejlesztése az IBP azonosítására és mennyiségi meghatározására patkány vékonybél-perfuzátumban,
2. RP-HPLC-UV-Vis analitikai módszer kidolgozása az IBP és IBP- β -D-G azonosítására és mennyiségi meghatározására patkány epemintákban,
3. A vékonybél és a máj *first-pass* effektusban betöltött szerepének vizsgálata ibuprofén *per os* adagolásához hasonló intesztinális perfúzió során, *in vivo* állatkísérletekben,
4. A kísérletes diabétesz hatása a vékonybél és a máj eliminációs tevékenységére *in vivo* állatkísérletekben,
5. A vékonybél és máj eliminációban betöltött szerepének összehasonlítása az ibuprofén és a *p*-nitrofenol esetében.

2. Vizsgálati módszerek

2.1. Anyagok

Az ibuprofént, ammónium-acetátot ($\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$) és a jégecetet (CH_3COOH) a Molar Chemicals Kft-től (Budapest) vásároltuk. Az acetonitrilt (ACN), kálium-kloridot (KCl), kalcium-kloridot ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dinátrium-hidrogén-foszfátot ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) és a Tris-t a Reanaltól (Budapest) szereztük be. A Sigma-Aldrich Company-től (Budapest) származik a nátrium-klorid (NaCl), a diklofenák-nátrium, a citromsav, a nátrium-citrát és a streptozotocin (STZ). A magnézium-szulfát (MgSO_4) és a dihidrogén-nátrium-foszfát (NaH_2PO_4) a Spektrum-3D Kft-től (Magyarország) került beszerzésre. Az ibuprofén β -D-glükuronidot a Toronto Research Company-től (Toronto, Kanada) vásároltuk. A bélperfúzióhoz használt izotóniás oldat összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl 96.4, KCl 7.0, CaCl_2 3.0, MgSO_4 1.0, TRIS puffer (pH 7.4) 29.5, nátrium foszfát puffer 0.9 (pH 7.4), glükóz 14.0, mannitol 14.0.

2.2. Kísérletes módszerek

Az állatkísérleteinket 250-300g súlyú, hím Wistar patkányokon (Toxi-Coop Zrt, Budapest) végeztük. Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt uretánnal narkotizáltuk (1,2 g/kg, i.p.). A hasfalat a középvonal mentén felnyitottuk és a duodénum utáni jejunális szegmentumot kb. 10 cm hosszúságban kanuláltuk. Ezt a szakaszt 37°C -ra melegített izotóniás oldattal jól átöblítettük, hogy a tápanyagok maradványait eltávolítsuk. Az izotóniás oldat maradékát 4-5 ml levegő befúvásával távolítottuk el. Az izolált jejunális szakaszt mindkét oldalán bemetszettük majd mindkét oldalra műanyag csövet helyeztünk és rögzítettünk. Ezen kanülökön keresztül, recirkulációs módszert alkalmazva, a béllumenen átáramoltattuk az izotóniás oldatot ami $250\ \mu\text{M}$ ibuprofént, illetve $500\ \mu\text{M}$ PNP-t tartalmazott. Az oldat áramlási sebessége 13 ml/perc volt. A jejunális szegmentum alsó részén, az ileum felőli végen kiáramló oldatot egy tartályba vezettük, amelyből azt egy pumpa segítségével folyamatosan recirkuláltattuk a lumenbe. A kezdeti perfúziós volumen 16,5 ml, a vizsgálat időtartama 90 perc volt. Az izolált bélszakaszból kiáramló perfúziós médiumból meghatározott időpontokban $250\ \mu\text{l}$ mintát gyűjtöttünk. A kísérlet alatt biztosítottuk a normál élettani funkcióhoz

szükséges körülményeket, az állatok és a perfúziós médium hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Az állatkísérleteket a 243/1998. (XII. 31.) számú kormányrendeletben leírtak betartásával, a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottság által kiadott engedélyek (BA02/2000-10/2006 és BAI/35/51-61/2016) alapján végeztük.

A biliáris exkréció vizsgálatához az epevezeték egy műanyagcsővel kanüláltuk és a kifolyó epét 15 perces időintervallumokban gyűjtöttük.

Mind a bélperfuzátum mintáit, mind az epemintákat az analitikai vizsgálatok megkezdéséig -20 °C fokon tároltuk.

A kísérletes diabéteszt 0.1 M citrát pufferban (pH 4.0) frissen oldott STZ 65 mg/kg i.v. beadásával váltottuk ki. A kísérleteket az STZ beadását követő 7. napon végeztük. A vércukor-szintet, illetve a hiperglikémia (>20 mmol/l patkányban) kialakulását Accu-Chek® (Roche) digitális vércukormérővel ellenőriztük.

2.3. Analitikai eljárások

A fordított-fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás elválasztási technika (HPLC) egyike a leggyakrabban alkalmazott módszereknek a gyógyszervegyületek analízisében. Előnyének számít, hogy 1) viszonylag gyors kimutatást tesz lehetővé, ami nagyszámú biológiai minta esetén előnyös, 2) alkalmas kis koncentrációban megjelenő vegyületek kimutatására és azonosítására, valamint 3) pontos és megbízható.

Az ibuprofén különböző biológiai mintákból (plazma, epe, vizelet) történő kimutatására és azonosítására számos HPLC módszer került korábban leírásra a szakirodalomban. Vannak köztük UV-Vis detektálással kapcsolt HPLC módszerek (Dietzel 1990, Espinosa-Mansilla 2006, Sochor 1995, Teng 2003, Zhao 2005), tömegspektrometriával csatolt analitikai eljárások (Kot-Wasik 2006), fluoreszcenciás detektáláson alapuló mérések, (Canaparo 2000, Hassan 2008, Palmgren 2004, Santos 2005), de kapilláris elektroforézis alkalmazását is leírták már (Hamoudová 2006).

Annak ellenére, hogy a szakirodalom bővelkedik analitikai eljárásokban az ibuprofén azonosítására és meghatározására, ezek többsége viszonylag hosszú időt vesz igénybe; az IBP retenciós ideje túl nagy, ami nagyszámú minta esetében időigényes feladat. Fontosnak tartottuk ezért egy gyors RP-HPLC/UV-Vis módszer kifejlesztését, ami a nagyszámú bélperfúziós és epeminta mérése során előnyt jelent; megnövelve a mérések és kiértékelések hatékonyságát.

2.3.1. Módszerfejlesztés az ibuprofént tartalmazó vékonybél-perfuzátum HPLC-UV-Vis vizsgálatára (Módszer I)

A kromatográfiás elválasztáshoz Agilent 1100 Series HPLC készüléket használtunk. Az analitikai vizsgálat során Zorbax SB C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) kolonnát, a biológiai mintákból származó esetleges szennyeződések kivédése céljából Teknokroma TR-C-160K1 előtétoszlopot alkalmaztunk. A vizsgálatok során izokratikus elúciós módszert alkalmaztunk. Az eluens összetétele ACN: 5 mM acetát puffer (pH 3) 55:45 % v/v volt. Az eluens 1 ml/perc áramlási sebességgel haladt át a kromatográfiás oszlopon. Az injektált minták térfogata 20 µl-re, míg a termosztát hőmérséklete 40 °C-ra volt beállítva. Az oszlopról eluálódó vegyületek detektálását 220 nm hullámhosszon, 10 percen át végeztük. A puffer oldat pH-nak beállításához a Mettler Toledo MP 220 pH-mérő készüléket és Mettler Toledo Inlab 413 elektródát használtuk.

2.3.1.1. A standard oldatok előállítása és kalibrációs egyenes felvétele

A módszer validálásához felhasznált standard oldatok IBP 0,1 M foszfát pufferben történt feloldásából, majd ennek a törzsoldatnak a kontroll állatoktól származó, ibuprofént nem tartalmazó vékonybél-perfuzátum oldatával történt hígításából származnak. Az ismert ibuprofén mennyiséget tartalmazó standard oldatok hígítása az 5-250 µM (5, 10, 50, 100, 250 µM) koncentráció-tartományban történt. Minden standard oldat 200 µM diklofenák-nátrium belső standardot tartalmazott, melyet előzetes foszfát pufferben való oldás után, oldat formájában adagoltuk a hígítási sor minden egyes standard oldatához. Az előbb részletesen leírt kromatográfiás módszer szelektivitás, linearitás, illetve pontosság, vizsgálatához szükséges IBP törzsoldat két független bemérés alapján történt. Mindkét bemérésből megtörtént a fentebb leírt koncentráció-tartomány szerint a hígítási sor standard oldatainak elkészítése, így összesen 10 minta állt rendelkezésünkre a módszervalidálás vizsgálatainak elvégzéséhez.

A vékonybél-perfuzátum mintáinak leméréséhez kifejlesztett izokratikus kromatográfiás módszer linearitás vizsgálatához szükséges kalibrációs egyenes felvétele, a relatív csúcs alatti területeknek a bemért ibuprofén koncentráció

függvényében való ábrázolásából került származtatásra. Az így kapott kalibrációs egyenes az ibuprofénre a következő volt: $y = 0,0092x + 0,1131$ ($R^2 = 0,9942$).

A módszer pontosságának vizsgálata céljából az egy napon belüli, valamint a napok közötti ismételhetséget, a görbe alatti területek és a retenciós idők (t_R) relatív standard deviáció (RSD %) értékeit határoztuk meg.

A retenciós idők és csúcs alatti területek napok közötti pontosságának meghatározására az előző mérésekhez is használt kalibrációs oldatsorozat került felhasználásra. A mérések három egymás utáni napon lettek elvégezve. A retenciós időkre és csúcs alatti területekre kapott RSD % értékeket az I. táblázat tartalmazza.

2.3.1.2. A bélperfuzátumok mintaelőkészítése az analitikai méréshez

Az analitikai vizsgálatnak alávetett bélperfuzátum mintákat (250 μ l) a hűtőszekrényből kivéve szobahőmérsékleten állni hagytuk amíg felvették a környezet hőmérsékletét; majd a megfelelő elegyítés végett vortexeltük őket. Minden 200 μ l bélperfuzátum mintához 50 μ l 1mM-os DICL-Na belső standard oldatot adagoltunk, így a vizsgálatnak alávetett minták mindegyike ismert koncentrációjú, 200 μ M belső standardot (DICL) tartalmazott. Az oldatok vortexelés, majd 10 perces 900xg centrifugálás után kerültek lemérésre.

2.3.2. Módszerfejlesztés az ibuprofén vékonybélperfúziója során keletkező epeminták HPLC-UV-Vis vizsgálatára (Módszer II)

A 2.3.1. alpontnál leírt analitikai módszer (Módszer I) nem felelt meg az epeminták analízisére, ugyanis az IBP- β -D-G metabolit, ami a hepatocitákban lezajló folyamatok hatására keletkezett, korán lejött az oszlopról, ezáltal nehezen lehetett elkülöníteni a többi poláros szennyeződéstől. Ebből kiindulva továbbfejlesztettük a módszert, hogy alkalmas legyen a metabolit és az anyavegyület elválasztására.

Az epeminták mérésénél gradiens elválasztási technikát alkalmaztunk. A mobil fázist ugyancsak ACN:5 mM ammónium acetát puffer (pH 3) alkotta, de az eluens összetétele változó volt az analízis időtartama során. Az ammónium acetát puffer kezdeti 65 % (v/v)-os arányát 6 percen át 45 % (v/v)-ra csökkentettük, ilyen körülmények alatt áramoltattuk 5,5 percig, majd 6 percen keresztül visszaállítottuk a kezdeti feltételeket.

Az eluens áramlási sebessége 1 ml/perc, a kromatográfiás analízis időtartama 15 perc volt. Ezalatt az időtartam alatt sikerült mind a három vegyületet, (IBP- β -D-G, DICL, illetve IBP) egymástól elválasztani. Minden egyes mérés után a HPLC rendszert 15 percen keresztül ekvibráltuk a kiindulási eluens keverékkel (65 % (v/v) puffer). A kapott jel intenzitásának detektálása 240 nm hullámhosszon történt. A minta injektálás volumene 20 μ l, az oszlop hőmérséklete 40 °C volt.

2.3.2.1. A standard oldatok előállítása és kalibrációs egyenes felvétele

A kalibrációs egyenes felvételéhez szükséges standard oldatokat IBP és IBP- β -D-G Krebs-Tris pufferben készült törzsoldatainak, kontroll állatoktól származó (IBP-t, illetve belső standardot nem tartalmazó) epemintákkal történt hígításával nyertük. A kalibrációs oldatsorozat koncentrációja a 7,5-150 μ M (7,5, 15, 30, 75, 150 μ M) tartományba esett. Az így kapott ismert koncentrációjú oldatsorozatot, a korábban leírt vékonybél-perfuzátum standard oldatainkhoz hasonlóan 5-ször injektáltuk, és vizsgáltuk az egy napon belüli valamint a napok közötti ismételhetőséget.

A kalibrációs egyenesek felvétele a mért relatív görbe alatti területek és IBP, illetve IBP- β -D-G ismert koncentráció függvényében való ábrázolás lineáris összefüggésén alapszik. Az így kapott kalibrációs egyenesek IBP-re: $y=0,0049x-0,0008$ ($R^2=0,9999$), illetve IBP- β -D-G-ra: $y=0,0062x+0,0013$ ($R^2=1,000$) voltak. A módszer pontosságának vizsgálata a görbe alatti területek és retenciós idők (t_R) RSD% értékeinek meghatározása alapján történt.

Mind az egy napon belüli, mind a napok közötti ismételhetőség vizsgálata esetén az oldatokat ötször injektáltuk. A napok közötti ismételhetőség vizsgálata esetében a méréseket öt egymás utáni napon végeztük el. A retenciós időkre és csúcs alatti területekre kapott RSD % értékeket a II., illetve a III. táblázatok tartalmazzák.

2.3.2.2. Az epeminta előkészítése az analitikai méréshez

Az epemintákat a vizsgálat napjáig -20 °C hőmérsékleten tároltuk. A mérések elvégzése előtt a mintákat hagytuk szobahőmérsékletre felmelegedni, 1 percig vortexeltük majd minden mintából 50 μ l mennyiséget 200 μ l 0,1 M perklórsavval kezeltük, ami 31,25 μ M diklofenák-nátrium belső standardot tartalmazott. Az így kapott

minták mindegyike ismert koncentrációjú, 25,0 μM belső standardot tartalmazott. A keveréket 10000 rpm sebességgel (10000 x g) 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót a fentebb leírt módszerrel analizáltuk.

2.3.3. PNP HPLC analitikai módszereinek ismertetése (Módszer III és Módszer IV)

A PNP mérése egy már korábban közölt (Almási 2006, illetve Fischer 2015) RP-HPLC módszerrel történt. Mivel ez a módszer már korábban már közlésre került, jelen disszertációban csak röviden kerül megemlítésre.

2.3.3.1. PNP bélperfuzátumban történő HPLC analízisének módszere

A PNP és metabolitjainak bélperfuzátumokból való szeparálása és mennyiségi meghatározása Nucleosil 100 fordított fázisú C18 kolonnán (250 mm x 4.6 mm, 10 μm részecskeméret) és TR-C-160K1 előtét oszlopon való átáramoltatással történt. A készülék a következő egységekből épül fel: Varian 2010 pumpa, Rheodyne 7725i injector, UV - Detector 308 detektor, PowerChrom 280 adatgyűjtő. Az UV-Vis mérések Pye Unicam (Philips) PU 8800 UV-Vis spektrofotométer segítségével valósultak meg, szobahőmérsékleten. Az eluens 0,01M tetrabutil–ammónium–bromid ionpárképzőt tartalmazó, 50:50 % v/v arányú metanol:víz elegy volt. Áramlási sebessége 1,2 ml/perc volt. A minta injektálási volumene 20 μl , a jelerősség detektálási hullámhossza 290 nm volt. A vékonybél-perfuzátum mintákat 1 perc vortexelés után 10 percig 3000 x g-vel való centrifugálást követően szobahőmérsékleten vizsgáltuk (Almási 2006, Fischer 2015).

2.3.3.2. PNP epemintákban történő HPLC analízisének módszere

Az epeminták analízise HPLC-UV-Vis módszerrel történt. A mérésekhez ugyanazt a HPLC készüléket használtuk, amit a 2.3.3.1. alpontnál leírtunk.

Az eluens összetétele módosult: 0,01 M citrát puffer (pH 6,2) 0,03 M tetrabutil-ammónium-bromidot tartalmazó metanol elegy, 47:53 v/v% arányban; áramlási sebessége 1 ml/perc. Minden 50 μl térfogatú epemintához 200 μl hideg metanolt adagoltunk, majd 10 másodperc állás után a fehérjék kicsapása céljából 10 percig 10000

x g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót injektáltuk. Minden minta 2,5 mM 4-etilfenol belső standardot tartalmazott. A citrát puffer pH-jának beállításához a Mettler Toledo MP 220 pH métert és a Mettler Toledo Inlab 413 elektródot (Mettler Toledo, Budapest) használtunk (Almási 2018).

2.4. Eredmények kiértékelése, statisztikai analízis

Az IBP szeparálására és a vékonybél-perfuzátumból vett mintákból történő mennyiségi meghatározására a 2.3.1. alfejezetben leírt HPLC-UV-Vis módszert alkalmaztunk. A mérések alapján kapott AUC_{IBP}/AUC_{DICL} arányának értékei, illetve a kalibrációs egyenes ismeretében számoltuk ki az IBP koncentrációját (C_{IBP}) a bélperfuzátumban az egyes időpontokban. A kísérlet alatt a keringetett perfuzátumból mintákat gyűjtöttük (V_1) előre meghatározott időközökben. A kísérlet végeztével lemértük a keringetett perfuzátum össz volumenét (V_3). A keringetett perfuzációs oldat elméleti (V_2) illetve gyakorlatban (V_3) kapott összterfogatának különbségéből számoltuk ki a felszívódott (V_4), illetve a percnként felszívódott oldószermennyiséget, ezt követően pedig a maradék térfogatot (V_5) minden egyes mintavételi időpontban. A korrekciós faktort (F_k), a perfuzációs oldat kezdeti (kiinduló) volumene (16,5 ml) és a maradék térfogat (V_5) hányadosából származtattuk. A korrekciós faktor, az egyes időközökben meghatározott IBP koncentrációja és az egyes időpontokban származtatott maradék térfogat szorzata adta a vegyület bélperfuzátumban kapott aktuális mennyiségét ($IBP \text{ aktuális mennyisége} = C_{IBP} \times V_5 \times F_k$).

Az IBP és metabolitjának az epéből vett mintákban történő szeparálására és az IBP valamint az IBP- β -D-G mennyiségi meghatározására a 2.3.2. alfejezetben leírt HPLC-UV-Vis módszert alkalmaztunk. A mérések alapján számítottuk ki az IBP és az IBP- β -D-G koncentrációját az epében. Az epét folyamatosan gyűjtöttük a kísérlet alatt 15 perces időközökben, a gyűjtött frakciók tömegét lemértük. Az epeminták tömeg – térfogat konverziója során az irodalomban általánosan elfogadott (Klaassen 1973) $1,00 \text{ g/cm}^3$ sűrűség-értékkel számoltunk. Az egyes periódusokban gyűjtött térfogatot a HPLC-módszerrel meghatározott koncentrációval összeszorozva megkaptuk a kiválasztott vegyület mennyiségét. A kumulatív biliáris exkréció a kísérlet alatt begyűjtött epeminták összesített adatát tartalmazza.

A táblázatokban és ábrákon feltüntetett adatok az átlagértékeket és a korrigált tapasztalati szórást (SD), vagy a standard hibát (SE) jelölik. A relatív szórás százalékos értékét (RSD %) az $RSD \% = SD/n_{\text{átlag}} * 100$ képlettel számítottuk ki. Az n a kísérletek vagy mérések számát jelöli. A standard hibát (SE) az $SE = SD/\sqrt{n}$ képlettel számoltuk ki. A szignifikancia kiszámítására a Student féle t-tesztet alkalmaztuk. A kontrolltól való szignifikánsnak bizonyuló eltérés jelölése * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ módon történt.

3. Eredmények

3.1. A HPLC-UV-Vis módszer kifejlesztése és validálása vékonybél-perfuzátumok (Módszer I) és epeminták (Módszer II) analízise céljából

A vékonybél perfúziója során begyűjtött minták analízisére egy RP-HPLC-UV-Vis kromatográfiás eljárást fejlesztettünk ki, amely alkalmas volt a racém IBP és a DICL (mint belső standard) szeparálására és mennyiségi meghatározására (Módszer I).

A vékonybél és máj egyidejű eliminációs tevékenységének a vizsgálata és összehasonlítása szempontjából a kísérlet során vett epemintákat is vizsgáltuk. Az epeminták analízisére a már előzőleg kifejlesztett módszert (Módszer I) módosítottuk, annyi változtatással, hogy itt gradiens eluens áramlást alkalmaztunk és a vegyületek fényelnyelését 240 nm hullámhosszon detektáltuk (Módszer II).

Az általunk kifejlesztett RP-HPLC/UV-Vis módszerek lehetővé tették az IBP és glükuronid metabolitja (IBP- β -D-G) pontos, ismételhető, megbízható mennyiségi meghatározását viszonylag rövid idő alatt, ami nagyszámú minta esetén fontos szempontot tölt be.

3.1.1 Szelektivitás

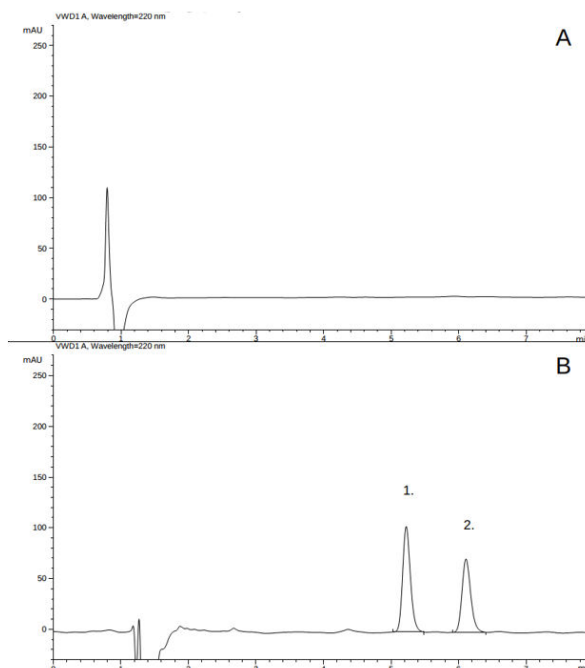
3.1.1.1. Módszer I

Az analitikai módszer validálási paramétereinek meghatározását megelőzően vizsgáltuk, a módszer szelektivitását. A kontroll bélperfuzátumban oldott DICL (**1**) (t_R 5,21 perc) és IBP (**2**) (t_R 6,11 perc) alapvonalon elváltak egymástól (9B. ábra). Belső standardot (DICL) és IBP-t nem tartalmazó bélperfuzátum nem mutatott zavaró csúcsot a kérdéses időintervallumban (9A ábra).

3.1.1.2. Módszer II

A kontroll epében oldott IBP- β -D-G (t_R 4,74 perc), DICL (t_R 10,08 perc) és az IBP (t_R 10,92 perc) alapvonalon elváltak egymástól (10B ábra). A belső standardot (DICL), IBP- β -D-G-t és IBP-t nem tartalmazó kontroll epe nem mutatott zavaró csúcsot a kérdéses időintervallumban (10A ábra).

9. ábra. A kontroll bélperfuzátum (A), valamint a kontroll bélperfuzátumban odott DICL (belső standard) (1) és IBP (2) kromatogrammja (B).



3.1.2. Linearitás

3.1.2.1. IBP linearitás (Módszer I)

A Módszer I linearitás vizsgálatához ismert IBP koncentrációjú oldatsorozatot készítettünk, ahol az ibuprofén gyógyszermentes (kontroll) vékonybél-perfuzátumban oldottuk. Az oldatsorozat koncentrációs tartománya 5-250 μM (5, 10, 50, 100 és 250 μM) terjedt; a minták mindegyike 200 μM DICL (belső standard) tartalmazott. Az oldatok elkészítéséhez szükséges ibuprofénből két független bemérést végeztünk, mindegyik ismert koncentrációjú oldatot 5-ször injektáltunk, így a kapott adatokat összesen 10 minta eredményeiből származtattuk.

A kalibrációs egyenest a relatív csúcs alatti területeknek az ismert ibuprofén koncentráció függvényében való ábrázolásából kaptuk. A kalibrációs egyenes az ibuprofénre a bélperfuzátumban a következő volt: $y = 0,0092x + 0,1131$ ($R^2 = 0,9942$).

3.1.2.2. IBP linearitás (Módszer II)

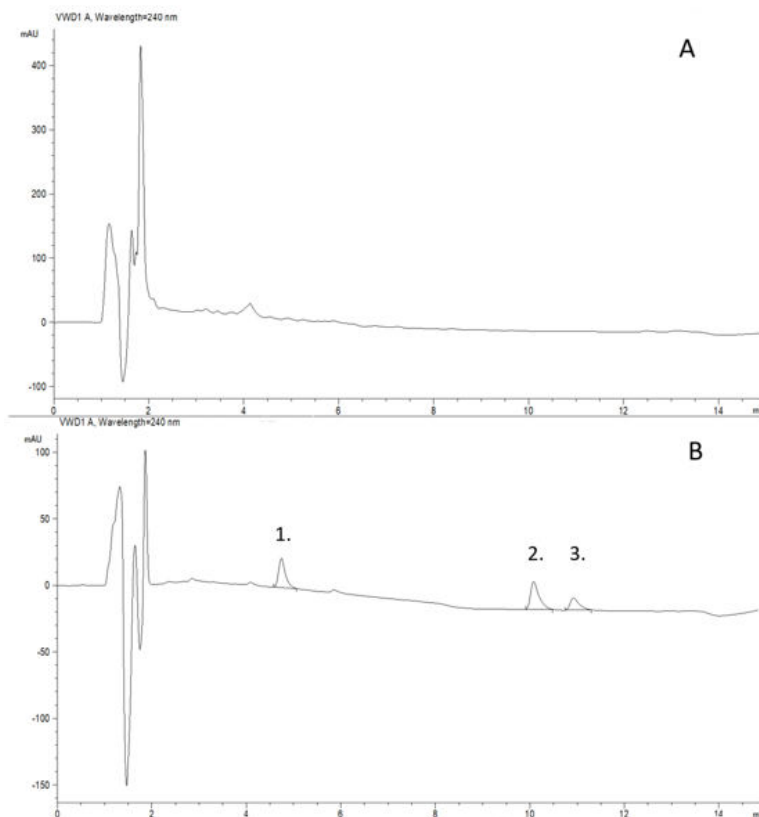
A linearitás vizsgálatához ismert koncentrációjú IBP-t és DICL-ot (belső standard) tartalmazó oldatsorozatot készítettünk, ahol a vegyületeket gyógyszermentes (kontroll)

epében oldottuk 7,5–150 μM (7,5, 15, 30, 75 és 150 μM) koncentráció-tartományban. Az oldatokat 5-ször injektáltuk. A kalibrációs egyenest a relatív csúcs alatti területeknek az ismert IBP koncentráció függvényében való ábrázolásából kaptuk. Az így kapott regressziós egyenes IBP-re az epében $y = 0,0062x + 0,0013$ ($R^2=1,000$) volt.

3.1.2.3. IBP- β -D-G linearitás (Módszer II)

A linearitás vizsgálatához ismert koncentrációjú IBP- β -D-G-t és DICL-ot (belső standard) tartalmazó oldatsorozatot készítettünk, ahol a vegyületeket gyógyszermentes epében oldottuk 7,5–150 μM (7,5, 15, 30, 75 és 150 μM) koncentráció-tartományban. Az oldatokat 5-ször injektáltuk. A kalibrációs egyenest a relatív csúcs alatti területeknek az ismert IBP- β -D-G koncentráció függvényében való ábrázolásából kaptuk. Az így kapott regressziós egyenes IBP- β -D-G-re az epében $y = 0,0049x - 0,0008$ ($R^2 = 0,9999$) volt.

10. ábra. Az kontroll epe (A), valamint a kontroll epében oldott IBP- β -D-G (1), DICL (2) és IBP (3) kromatogrammja (B).



3.1.3. Rendszeralkalmasság

A rendszeralkalmasságának adatait a kontroll vékonybélben és a kontroll epében oldott ibuprofén és ibuprofén- β -D-G standard oldatok kromatogramjaiból származtattuk. Az eredményeket 5 párhuzamos injektálásból kaptuk. A retenciós idők és görbe alatti területek napon belüli RSD % -át mutató adatokat az I. táblázat (Módszer I) illetve II. és III. táblázatok (Módszer II) foglalják össze.

3.1.4. Pontosság

3.1.4.1. Módszer I

A kromatográfias módszer pontosságát a napon belüli ismételhetőség, valamint a napok közötti ismételhetőség (intermediate precision) meghatározásával jellemeztük. A retenciós idő (0,53-0,67 RSD %) és a görbe alatti terület (3,20–12,91 RSD %) értékeit az I. táblázat mutatja be.

Az analitikai módszer napok közötti ismételhetőségének meghatározása alapján a retenciós idők RSD % értékei a 1,83-2,17 % tartományba, míg a csúcsok alatti területek RSD % értékei a 1,58-10,40 % tartományba estek. Az adatokat az I. táblázat foglalja össze.

I. táblázat. A retenciós idők és a csúcs alatti területek egy napon belüli és három egymást követő nap közötti méréseinek pontossága kontroll perfúziós oldatokban oldott IBP standard esetén (Módszer I)

Standard oldatok koncentrációja (μ M) IBP	Retenciós idők - napon belüli ismételhetősége (RSD %) n=5	Csúcsok alatti területek napon belüli ismételhetősége (RSD %) n=5	Retenciós idők napok közötti ismételhetősége (RSD %) n=5	Csúcsok alatti területek napok közötti ismételhetősége (RSD %) n=5
5	0,53	12,91	2,17	10,40
10	0,55	5,71	2,00	3,41
50	0,64	3,59	1,97	3,17
100	0,67	5,99	1,83	3,46
250	0,57	3,20	2,10	1,58

3.1.4.1. Módszer II

A kromatográfias módszer pontosságát a napon belüli ismételhetőség, illetve a napok közötti ismételhetőség (intermediate precision) meghatározásával jellemeztük. A kontroll epében oldott IBP retenciós idejének napok közötti ismételhetősége a különböző koncentrációjú standard oldatok esetén a 0,22-1,08 RSD % intervallumba, míg a csúcsok alatti területek hasonló értékei a 3,79-8,76 RSD % intervallumba estek (II. táblázat). Az IBP- β -D-G esetén a retenciós idők hasonló értéke az 1,05-2,45 RSD % intervallumba, míg a görbe alatti területeké a 4,68-8,33 RSD % intervallumba estek. Ennek alapján, mind a retenciós időket, mint a csúcsok alatti területeket elfogadhatónak találtuk. Az eredményeket a II. és III. táblázatok foglalják össze.

II. táblázat. A retenciós idők és a csúcsok alatti területek egy napon belüli és egymást követő napok közötti méréseinek pontossága kontroll epében oldott IBP standard esetén (Módszer II).

Standard oldatok koncentrációja (μM) IBP	Retenciós idők napon belüli ismételhetősége (RSD %) n=5	Csúcsok alatti területek napon belüli ismételhetősége (RSD %) n=5	Retenciós idők napok közötti ismételhetősége (RSD %) n=5	Csúcsok alatti területek napok közötti ismételhetősége (RSD %) n=5
7.5	0,10	7,80	1,08	5,56
15	0,10	7,33	0,26	3,79
30	0,14	4,58	0,22	4,35
75	0,11	4,59	0,63	8,76
150	0,09	2,76	0,26	6,19

3.1.5. A legkisebb kimutatható és a legkisebb mennyiségileg meghatározható értékek meghatározása

3.1.5.1. IBP kimutatási és meghatározási határa (Módszer I)

A legkisebb kimutatható értéket gyakorlatilag határoztuk meg, mint az a legkisebb koncentráció amely az alapvonal zaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adja a detektoron. A vékonybél-perfuzátumban az ibuprofénre kapott legkisebb kimutatható érték 0,15 μM volt.

A meghatározási határ jelenti azt a legkisebb mennyiségileg meghatározható mennyiséget, amely még megfelelő precizitással és helyességgel még kimutatható. A bélperfuzátumban az IBP legkisebb mennyiségileg meghatározható értéke 0,51 μM volt. A legkisebb meghatározható érték a bélperfuzátumban a következő képlettel lett kiszámolva $(10 \times \text{RMSE})/m$, ahol m a kalibrációs görbe meredekségét jelenti.

III. táblázat. A retenciók idők és a csúcsok alatti területek egy napon belüli és egymást követő napok közötti méréseinek pontossága kontroll epében oldott IBP- β -D-G standard esetén (Módszer II).

Standard oldatok koncentrációja (μM) IBP- β -D-G	Retenciók idők napon belüli pontossága (RSD %) $n=5$	Csúcsok alatti területek napon belüli pontossága (RSD %) $n=5$	Retenciók idők napok közötti pontossága (RSD %) $n=5$	Csúcsok alatti területek napok közötti pontossága (RSD %) $n=5$
7,5	0,54	5,12	1,34	8,32
15	0,25	5,20	1,19	6,49
30	0,05	4,83	1,05	8,33
75	0,25	3,45	2,45	4,68
150	0,09	5,27	1,78	6,82

3.1.5.2. IBP kimutatási és meghatározási határa (Módszer II)

Az epében mért legkisebb kimutatható IBP koncentráció 1,33 μM , az IBP-re kapott kalibrációs görbe RSD %-a 7,49 volt.

Az IBP legkisebb mennyiségileg meghatározható értéke 4,42 μM , melynek számolása az RMSE kiszámításán alapult. A legkisebb meghatározható érték az epében az $(10 \times \text{RMSE})/m$ képlettel lett kiszámolva, ahol m a kalibrációs görbe meredekségét jelenti.

3.1.5.3. IBP- β -D-G kimutatási és meghatározási határa (Módszer II)

Az epében mért legkisebb kimutatható IBP- β -D-G koncentráció 3,09 μM , az IBP- β -D-G-ra kapott kalibrációs görbe RSD %-a 4,48 volt.

Az IBP- β -D-G legkisebb mennyiségileg meghatározható értéke 10,3 μM volt, melynek számolása az RMSE kiszámításán alapult. A legkisebb meghatározható érték

az epében az $(10 \times \text{RMSE})/m$ képlettel lett kiszámolva, ahol m a kalibrációs görbe meredekségét jelenti.

3.2 Az ibuprofén eltűnésének követése a vékonybél lumenből a kontroll és a kísérletes diabéteszes állatok esetében

A 2.3.1. alfejezetben részletesen bemutatott HPLC analitikai eljárást (Módszer I) alkalmaztuk az ibuprofén vékonybélből történő eltűnésének vizsgálatára. Az ibuprofén vékonybél lumenben mért kezdeti mennyiségének módosulásáról kapott eredményeket a 11. ábra szemlélteti.

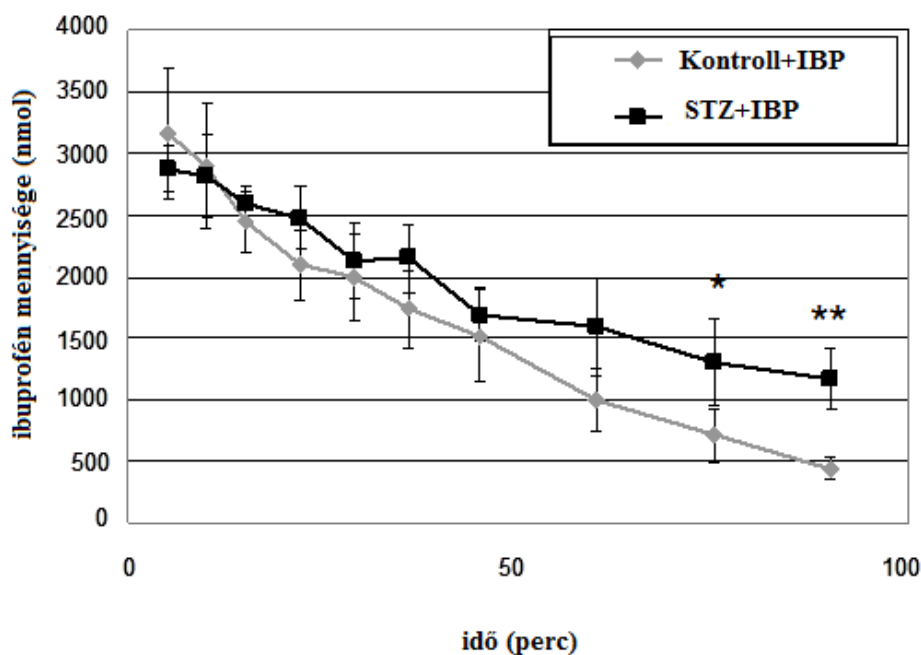
A kísérletes diabéteszt 65 mg/kg STZ *i.v.* beadásával váltottuk ki; a kísérleteket beadás utáni 7. napon végeztük. A vércukorszintet, illetve a hiperglikémia beálltát AccuCheck automata vércukormérővel ellenőriztük. Az átlag vércukorszint $7,85 \pm 1,02$ mM volt a kontroll állatcsoportban, míg a STZ-vel előkezelt csoportban $23,32 \pm 2,06$ mM értéket mértünk.

A 11. ábráról jól látható, hogy az IBP mennyisége a keringetett bélperfuzátumban az idő múltával egyre csökken; kezdetben a két csoport között nem észleltünk szignifikáns mennyiségbeli különbséget. Az perfundált oldatban az ibuprofén mennyisége a különböző mérési időpontokban konzekvensen kevesebb volt a kontroll állatoknál, mint a kísérleti diabéteszben szenvedő állatcsoport esetében. A kísérlet 75. percétől egészen a kísérlet végéig, a 90. percig, már statisztikailag is kimutatható szignifikáns eltérés mutatkozik a kontroll és kezelt csoportok között. (A 75. percnél $*p < 0,05$, míg a kísérlet végére, a 90 percnél $**p < 0,01$.)

A két csoport vizsgálata során a bélperfuzátumban jelen körülmények között konjugált metabolitra utaló kromatográfiás jelet nem észleltünk.

A kapott eredmények szerint az IBP mennyiségének módosulása – az IBP eltűnése – az STZ-vel előkezelt patkányok vékonybél-perfuzátumából lassabban történik, az eltűnt IBP mennyisége jelentősen kisebb, mint a kontroll patkányok esetében.

11. ábra. Az IBP eltűnésének követése kezeletlen (kontroll) és kísérleti diabéteszes patkányok vékonybél-perfuzátumából. A keringetett izotóniás médium 250 μM ibuprofént tartalmazott. Az adatok különböző kísérletek átlagértékeit ($n=5$) és SE-t jelölik.



3.3. A máj eliminációs tevékenységének vizsgálata - az ibuprofén és konjugatív metabolitjának (ibuprofén- β -D-glükuronid) megjelenése az epében a kezeletlen és a kísérletes diabéteszes állatok esetében.

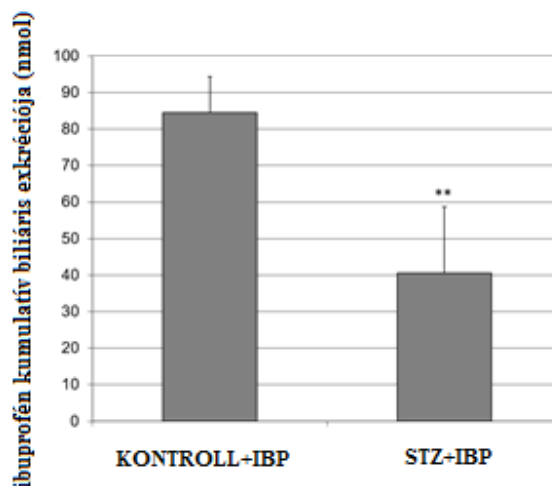
Az állatkísérletek során gyűjtött epemintákat a 2.3.2. alfejezetben részletesen taglalt analitikai módszerrel (Módszer II) vizsgáltuk. Az epemintákat 90 percig, 15 perces időintervallumokban gyűjtöttük.

A következő ábrák a kísérleti diabétesz hatását szemléltetik az IBP (12. ábra) és konjugált metabolitjának, IPB- β -D-G (13. ábra) az epébe történt kiválasztódására. Az oszlopok a két csoport egyes periódusainak összesített adatainak átlagértékeit \pm SE ábrázolják, $n = 5$.

A 12. ábra bemutatja a kísérlet időtartama alatt kiválasztott nem-metabolizált IBP összmenyiségét. Láthatjuk, hogy az előkezelt csoport esetében a kiválasztott össz-

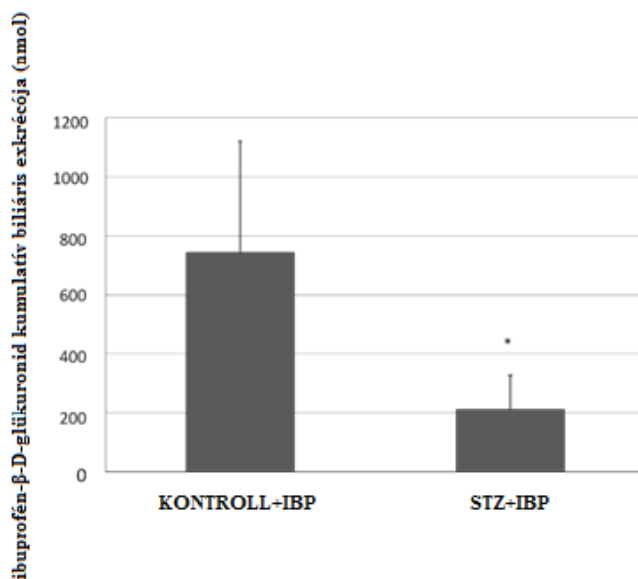
ibuprofén mennyiség körülbelül a fele a kontroll csoporthoz viszonyítva; ez jelentős eltérés a két csoport között, $**p < 0,01$.

12. ábra. Az IBP kumulatív (90. perc) biliáris exkréciójának a mértéke STZ-vel kezelt és kontroll állatcsoportok esetén. A perfundált IBP kezdeti koncentrációja $250 \mu\text{M}$ volt. Az ábra öt különböző állatkísérlet átlagértékét \pm SE-t tartalmazza.



A 13. ábráról leolvasható, hogy az STZ-vel előkezelt csoport esetében jelentős eltérés van az ibuprofén- β -D-glükuronid exkréciójában a kontroll csoporthoz képest. Megállapíthatjuk, hogy az STZ szignifikánsan csökkenti ($*p < 0,05$) a konjugált metabolit kiválasztódását az epével.

13. ábra. Az IBP- β -D-G kumulatív biliáris exkréciójának változása kontroll és kísérletes diabéteszben szenvedő állatcsoportok esetén.



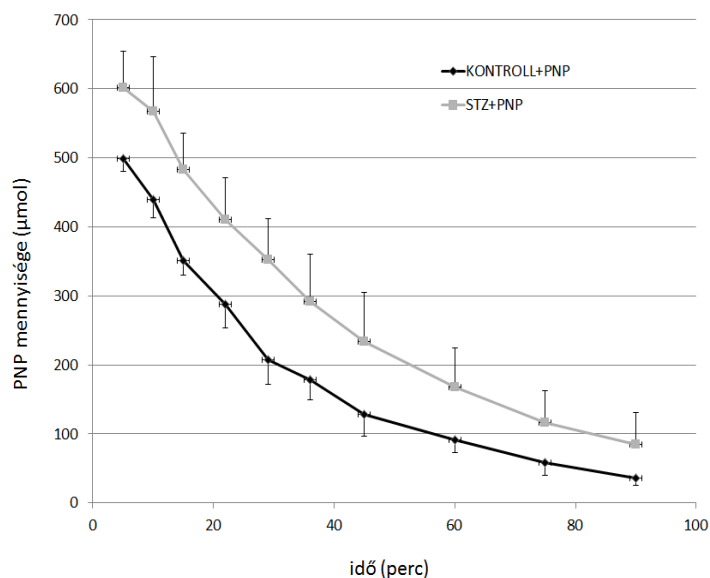
Említésre méltó, hogy a konjugált metabolit, az IBP- β -D-G, minden egyes mintavételi időpontban (15 percenként) lényegesen nagyobb mennyiségben választódott ki a nem-metabolizált IBP-hez képest.

3.4. A vékonybél és máj eliminációban betöltött szerepe a *p*-nitrofenol esetében

Az állatkísérletek során gyűjtött biológiai mintákat a 2.3.3. alfejezetben röviden ismertetett analitikai módszerrel (Módszer III) vizsgáltuk. A kapott eredményeket a 14. ábra szemlélteti. Az ábra hét különböző állatkísérlet átlagértékeit illetve az SE értékeket szemlélteti.

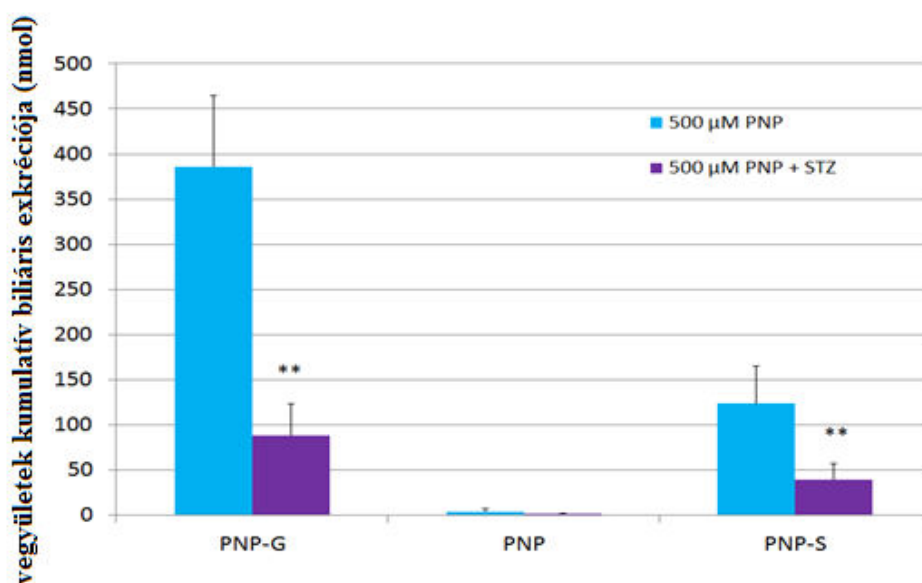
A 14. ábrán látható, hogy a kísérlet időtartama alatt a PNP kezdeti koncentrációja (500 μ M) a vékonybél-perfuzátumban módosul, fokozatosan csökken, mind a kontroll, mind az STZ-vel előkezelt csoportok esetében. Az ábráról az is leolvasható, hogy a diabéteszes csoportnál mért eltűnt PNP mennyiség minden egyes mérési időpontban alacsonyabb a kontroll csoportnál mért értékekhez viszonyítva. A PNP-nek a perfuzátumból történő eltűnésénekértékei közötti különbség azonban nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

14. ábra. A PNP mennyiségének módosulása a vékonybél-perfuzátumban.



A PNP-nek és képződött metabolitjainak kumulatív biliáris exkréciójának változását a 15. ábra mutatja be. Az epemintákat 90 percig, 15 perces időintervallumban gyűjtöttük a kísérlet alatt. A perfundált PNP kezdeti koncentrációja a perfúziós médiumban 500 μM volt. Az ábra hét állatkísérlet átlagértékét, illetve az SE értékeket szemlélteti.

15. ábra. A PNP és metabolitjainak, PNP-G és PNP-S biliáris exkréciójának változása kezeletlen és STZ-vel előkezelt állatcsoportokban, $n = 7 \pm \text{SE}$



Az ábrán láthatjuk, hogy a PNP a kísérleti időintervallum alatt nagy mennyiségben metabolizálódott. A PNP és a képződött metabolitok az epével választódnak ki, nagyobb mennyiségben figyelhető meg a PNP-G exkréciója, kisebb mértékben pedig a PNP-S-é. Megállapítható, hogy a kísérleti időintervallum alatt a kontroll csoport nagyobb mértékben üríti a PNP-G-t, mint a kísérleti diabéteszben szenvedő állatcsoport. A PNP-S esetében is hasonló a helyzet, a kísérleti diabétesz csökkenti a szulfát-metabolit kiürülését ezen kísérleti körülmények között.

Összegzésben elmondhatjuk, hogy a kísérletes diabétesz és a hiperglikémia szignifikánsan csökkenti a metabolitok exkrécióját az epével. A PNP változatlan formában csekély mennyiségben jelenik meg az epében mind a kontroll, mind az STZ-kezelt állatoknál.

4. Diskusszió

A dolgozat három fő témát érint és tárgyal meg részletesebben, ezek a következők:

1. Az ibuprofén és glükuronid metabolitja kísérleti patkány vékonybél-perfuzátumában és epéjében történő meghatározására alkalmas RP-HPLC-UV-Vis módszerek fejlesztése.

2. A vékonybél és máj first-pass effektusban betöltött szerepe az ibuprofén vizsgálata során és a kísérletes diabétesz hatása a first-pass effektusban résztvevő főbb szervek, a vékonybél és a máj eliminációs tevékenységére.

3. Két különböző vegyület, az ibuprofén és a *p*-nitrofenol felszívódásának és az intesztinális és a hepaticus eliminációjának összehasonlítása.

Az eredmények bemutatása is ezen tagolás köré csoportosult, ezért úgy vélem, hogy a megbeszélésben is hasonló megközelítésben célszerű tárgyalni és értékelni a kapott adatokat és eredményeket.

4.1. HPLC-UV-Vis analitikai módszerfejlesztés

Egy analitikai módszer akkor tekinthető hitelesnek, ha a minimális validálási követelményeknek így a szelektivitás, precizitás, ismételhetőség linearitás, eleget tesz. Csak ekkor vonhatunk le hiteles következtetéseket méréseinkből. Célkitűzésünk megvalósítására szükség volt egy gyors, pontos és megbízható analitikai módszerre, ugyanis állatkísérleteink alatt nagyszámú biológiai mintát gyűjtöttünk össze és ezeknek a lemérése időigényes feladat. Célunk volt egy olyan analitikai módszer kidolgozása, ami egyidejűleg több vegyület elválasztására és mennyiségi meghatározására (IBP, IBP-β-D-G, DICL) egyaránt alkalmas a vizsgált biológiai mintákból. A HPLC módszer (Method I) kidolgozásánál az anyavegyület és az esetleges képződő metabolitok tulajdonságait figyelembe véve választottuk az eluenseket, a belső standardként alkalmazott diklofenák-nátrium sót, illetve állítottuk be a kromatográfiai paramétereket. A vékonybél-perfuzátumban rövid analízis időtartam alatt sikerült az IBP-t és DICL-t elválasztani; a retenciós idők 6,11 és 5,21 perc voltak. Az IBP retenciós időket ismételhetőnek találtuk (1,83-2,17 RSD %), a görbe alatti területek ismételhetőségének eredményei az 1,58-10,40 RSD % tartományba estek. A racém IBP azonosítására

kifejlesztett HPLC-UV-Vis módszer gyorsabb, hatékonyabb, mint más szerzők által korábban közölt módszerek (Giessler 1989, Pietre 1979, Wang 2005).

Az epeminták esetében az analitikai módszer paramétereit módosítottuk. A képződött konjugált metabolit (glükuronid) nagyon hidrofil, kevésbé kötődött az oszlophoz és paraméterek nem tették lehetővé a hatékony szeparálását az oldószer lehetséges szennyeződéseitől. Emiatt a kromatográfiás módszert a következőképpen módosítottuk (Method II): 1) a detektálási hullámhosszat megnöveltük 20 nm egységgel, 240 nm-en vizsgáltunk a 220 nm helyett, illetve 2) izokratikus elválasztás helyett gradiens áramlást alkalmaztunk. Ezek a változtatások ahhoz vezettek, hogy a vizsgálati időtartam 10 percről 15 percre növekedett. Azonban még e megváltozott körülmények is az anyavegyület és konjugátum gyorsabb és hatékonyabb szeparálását tették lehetővé, mint az irodalomban korábban közölt analitikai módszer (Kepp 1997). A retenciósidők az epemintákban a következőképpen módosultak IBP- β -D-G 4,74 perc, DICL 10,08 perc, IBP 10,92 perc. A retenciósidőket ismételtetőknek találtuk 0,22-2,45 RSD % intervallumban, míg a csúcsok alatti területek értékei a 3,79-8,33 RSD % intervallumba estek.

A kapott eredmények alapján a kidolgozott RP-HPLC-UV-Vis vizsgálati módszer alkalmas nagyszámú biológiai minta vizsgálatára, szelektív, pontos, könnyen és gyorsan kivitelezhető. Alkalmas a vizsgált vegyületek IBP, IBP- β -D-G és DICL azonosítására és mennyiségi meghatározására, mind a vékonybél lumenből származó minták, mint az epéből begyűjtött minták analízise esetében. Az ibuprofén, mint racém vegyület azonosítására különböző biológiai mintákból a szakirodalomban találunk, hasonló körülmények mellett leírt analitikai módszereket (Ge 2011, Jung 1993, Berner 1993). Ami a glükuronid-metabolit biológiai mintákból történő azonosítását illeti, a szakirodalom ennek kimutatására alkalmas RP-HPLC (Castillo 1993) illetve UPLC-MS (Plumb 2007) módszert említ.

4.2. A vékonybél és máj first-pass effektusban betöltött szerepe az ibuprofén intesztinális perfúziója esetében

A gyógyszerek döntő többsége *per os* kerül felhasználásra, ez így van az ibuprofén esetében is. Kísérleteink során ezért olyan kísérleti módszert alkalmaztunk, amely a *per os* adagolás körülményeihez hasonló. Ez esetben a vizsgált vegyület az intesztinális

perfúzió révén közvetlenül a vékonybélbe jut. *Per os* adagolás során a vegyületek a bélből felszívódva a májba jutnak, onnan pedig a szisztémás keringéssel a hatás helyére. Tehát mielőtt a gyógyszermolekula kifejtené a hatását, a vékonybélben vagy a májban, vagy akár mindkét helyen, metabolizálódhat. A metabolikus transzformációt követően, a beadott vegyületnek csak egy meghatározott hányada fog majd a szisztémás keringésbe jutni és farmakológiai hatást kifejteni. Ezért felvetődik a kérdés, hogy a vékonybél és a máj milyen mértékben járulnak hozzá a *first-pass* hatáshoz. Sokáig döntő szerepet ebben a májnak tulajdonítottak, ám az utolsó évtizedekben egyre több kutató foglalkozik a vékonybél ilyen típusú szerepével. Számos gyógyszermolekula vizsgálata során sikerült bebizonyítani, hogy a vékonybél *first-pass* hatásban felvetődött szerepe jelentős (Lin 2013, Kanter 2002, Wu 1995 és 2011).

Ezen információk birtokában próbáltunk olyan kísérleti körülményeket létrehozni, amelyek lehetővé teszik egyidejűleg vizsgálni mind a vékonybél, mind a máj eliminációban betöltött szerepét. Kísérleteinkben az ibuprofén sorsát vizsgáltuk a vékonybélben és a májban. A vékonybél biotranszformációban betöltött szerepének vizsgálata rávilágított arra, hogy jelen kísérleti körülmények között az ibuprofén mennyisége a bélperfuzátumban fokozatosan csökken (11. ábra). E mennyiségbeli csökkenés oka lehet a vegyület felszívódásának a változása, vagy a (megváltozott) metabolizmusának a következménye, tekintettel arra, hogy számos metabolikus enzim expresszálódik a vékonybélben, illetve korábban már észleltek intesztinális biotranszformációt más vegyületek vizsgálata során (Lin 2013, Kanter 2002, Kaminsky 2003). Mindezen korábbi eredmények ismerete ellenére, kísérleteink során sem ibuprofén-glükuronid, sem ibuprofén-szulfát konjugátum nem volt kimutatható a vékonybél-perfuzátumban. Korábban, a PNP vékonybél-perfúziós vizsgálata során kimutattuk, hogy a vegyület metabolizálódik a vékonybélben az itt expresszálódó enzimek hatására, és a keletkező metabolitok megjelennek a vékonybél-perfuzátumban (Almási 2006, Fischer 2015).

A máj eliminációban betöltött szerepének vizsgálata az ibuprofén esetében feltárta, hogy az anyavegyület (IBP) és glükuronsavval konjugált metabolitja (IBP- β -D-G) az epével kiválasztódik a májból. Ez az észrevételünk összhangban áll egy korábban már leírt megfigyeléssel, mely szerint *per os* alkalmazott ibuprofén mintegy 40%-át sikerült visszanyerni az epéből, konjugált és konjugálatlan formában (Dietzel 1990). Az általunk fejlesztett analitikai módszerrel sikerült azonosítani az epemintákból az IBP-t és

konjugált metabolitját, az IBP- β -D-G-ot. Amit még az epével való kiürülésnél megfigyeltünk az, hogy a glükuronsavval konjugált metabolit jelentősen (körülbelül tízszer nagyobb mennyiségben) ürült az epével, mint maga az ibuprofén; ez az arány a két vegyület között minden egyes mérési időpontban fennállt. Jelen kísérleti körülmények között a vizsgált mintákban szulfát-konjugátum nem volt kimutatható.

4.2.1. A kísérletes diabétesz hatása a *first-pass* effektusban résztvevő főbb szervek (vékonybél, máj) eliminációs tevékenységére

A diabétesz egy komplex anyagcsere megbetegedés, amely gyakori a világ népességének körében és előfordulása folyamatosan növekszik. Ez a megbetegedés úgy a hormonális, mind az anyagcsere folyamatokat érinti, és befolyással van a farmakonok eliminációjára is (Watkins 1988, Vega 1993 és 1986). Fontosabb tünetei a hiperglikémia, polifágia, polidipszia, acetonszagú lehelet. Az abszolút vagy relatív inzulinhiány következtében számos transzport funkció változik, módosul; például magának a glükóznak a felszívódása és metabolizmusa is (Anderson 1974 és 1975, Fischer 1984, Csáky 1981). De nem csak a transzportfolyamatokban észlelünk eltéréseket, hanem változhat a máj, a hepatociták intracelluláris metabolikus aktivitása, a különböző szövetek struktúrája (Pain 1974, Watkins 1988). Annak ellenére, hogy egy nagyon gyakran előforduló anyagcserezavarról van szó, kevés olyan vizsgálat áll rendelkezésünkre, ami a hiperglikémia, illetve a diabétesz hatását vizsgálja a máj eliminációs tevékenységére (Watkins 1988, Ackerman 1977, Bojcssev 1996, Vega 1993 és 1986, Almási 2018). Még ennél is elenyészőbb azon adatok, közlemények száma, amelyek a változásoknak a vékonybél aktivitására kifejtett hatását tárják fel (Ackerman 1977, Fischer 1996 és 2015, George 1981). Indokolt tehát ezen kérdések tanulmányozása. *In vivo* kísérleteinkben a kísérletes diabétesz hatását vizsgáltuk a fent említett két szerv, a vékonybél és máj metabolikus és az exkréciós folyamataira.

A hiperglikémia experimentális kiváltására több vegyület is alkalmazható, ilyen például az alloxán (Vega 1986 és 1993), a glükóz (Fischer 1996), a fruktóz (Eacho 1981), a 6-aminonikotinamid, az N-metilacetamid (Ackerman 1997), valamint a streptozotocin (Ackerman 1997, Bojcssev 1996, Fischer 2015, Almási 2018). Ami az eredményeket illeti, különbségek mutatkoznak azonban abban, hogy a hiperglikémia beállta után hány nappal végzik a kutatók a vizsgálatokat. Ezáltal megkülönböztetünk

rövid tartamú (short-term) és hosszú tartamú (long-term) experimentális diabéteszt. Leírtak és végeztek már vizsgálatokat az STZ beadását követő 1. naptól kezdődően, illetve 7 napos (Almási 2018, Fischer 2015), 2 hetes (Bojcssev 1996), de már 4-5 hetes időintervallumban is (Watkins 1987). Az eredmények kiértékelésénél és összevetésénél ezt figyelembe kell venni, célszerű hasonló időtartamú vizsgálatokat, illetve azok eredményeit összevetni. Ezáltal pontosabb következtetéseket vonhatunk le a kísérleteink eredményeiből.

Jelen kísérletek során az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges diabetikus állapot kiváltására *i.v.* streptozotocint alkalmaztunk, mert ez a vegyület szelektív hatást gyakorol a pancreas béta-sejtjeire. Állatkísérleteinket a beadás utáni 7. napon végeztük, tehát esetünkben rövid tartamú (short term) kísérleti diabéteszről beszélünk.

4.2.1.1. A kísérletes diabétesz hatása a *first-pass* hatásban résztvevő vékonybél eliminációs tevékenységére

A disszertációban bemutatásra került kísérleti adatok azt mutatták, hogy az ibuprofén eltűnése a bélperfuzátumból hiperglikémiás állapotban kisebb mértékben zajlik le a kontroll csoporthoz képest, illetve ez a különbség jelentős mértékű a két csoport között. Az utolsó vizsgálati időpontokban vett minták IBP mennyiségei között már statisztikailag is szignifikáns különbség volt tapasztalható. Az ibuprofén nagymértékű eltűnése miatt várható volt glükuronsavval képzett metabolit megjelenésére a perfuzátumban, de jelen körülmények között nem sikerült ilyen típusú vegyületet kimutatnunk. A szakirodalomban találunk azonban olyan *in vitro* kísérleteket, amelyek arról számolnak be, hogy számos UGT izoformát sikerült azonosítani, melyek az ibuprofén glükuronsavval történő acil-*O*-glükuronid konjugációs reakcióját katalizálják (Kuehl 2005, Sakaguchi 2004, Basu 2004, Turgeon 2003). Miles (2006) és Graham (2000) közleménye alapján a patkány májban, illetve vékonybélben expresszáldó fontosabb UGT izoenzimek a következők: UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7 és UGT1A8. Egy másik kutatócsoport megfigyelése alapján a karboxilcsoporton lezajló glükuronsavas konjugációs reakciót a patkányban az UGT2B1 izoforma katalizálja, mely a patkány vékonybélében csak kis mértékben expresszáldik (King 2001).

Ami a *p*-nitrofenol vékonybél-perfuzátumból történő eltűnését illeti, e vegyület esetében hasonló kísérleti adatokat kaptunk egy korábbi vizsgálatunk során. A vegyület

vékonybél-perfuzátumból való eltűnésének követési görbéi hasonlóan módosultak, mint az ibuprofén esetében. A PNP bélperfuzátumban mért mennyisége minden mérési időpontban magasabb értéket mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva; eltűnése tehát a perfuzátumból lassabban valósult meg hiperglikémiás állapotban. A *p*-nitrofenol vizsgálata esetében azonban metabolitokat észleltünk a perfuzátum mintáinak vizsgálata során (Almási 2006, Fischer 2015).

Annak a megfigyelésnek, hogy az ibuprofén-glükuronidot nem sikerült kimutatni a vékonybél-perfuzátumban, több magyarázata is lehet. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a vegyület glükuronsav-konjugációs reakcióját más UGT izoenzimek végzik, mint a PNP esetében (Dong 2012). Egy másik lehetséges magyarázat a keletkezett konjugátumok stabilitásával lehet kapcsolatos. Egy korábbi közleményünkben (Fischer 2015) a konjugációs metabolitok azonosítása mellett, intesztinális és hepatikus enzimaktivitásokat is mértünk, mely eredmények azt mutatták, hogy az UGT enzimaktivitás majdnem a duplájára, a béta-glükuronidáz aktivitás pedig négyszeresére növekedett kísérletes diabéteszben. Ezen adatok ismeretében, figyelembe véve, hogy az acil-*O*-glükuronidok, mint jelen esetben az IBP- β -D-G, instabil vegyületek, nagyon reaktívak, ezáltal könnyen hidrolizálhatóak (Kuehl 2005), a megnövekedett glükuronidáz aktivitás is csökkentheti a sejtekben a glükuronid mennyiségét. Az ibuprofén acil-*O*-glükuronsavas konjugátumával ellentétben az éter-*O*-glükuronidok, esetünkben a *p*-nitrofenol glükuronidja, nem toxikus, stabil vegyületek (Parkinson 2013); ezzel is magyarázható az, hogy a PNP vizsgálata esetében sikerült a PNP-G azonosítani a bélperfuzátum mintáiból.

A kapott kísérleti adatokból arra következtethetünk, hogy a kísérletes diabétesz, illetve a hiperglikémia esetenként eltérő módon ugyan, de képes módosítani a vizsgált vegyületek farmakokinetikáját a vékonybélben.

4.2.1.2. A kísérletes diabétesz hatása a máj eliminációs tevékenységére

A kísérlet során gyűjtött epeminták analízise feltárta, hogy a kísérletes diabétesz képes a vizsgált vegyületek kumulatív biliáris exkréciójának módosítására. Az át nem alakult ibuprofén mennyiségének kumulatív biliáris exkréciója STZ-vel való előkezelés során körülbelül a felére csökkent a kontroll csoporthoz képest.

Ezen kívül az epeminták analitikai méréseinek eredményeképpen sikerült kimutatni az IBP- β -D-G-ot, ami arra utal, hogy a vegyület a májban lezajló biotranszformációja során glükuronsavval konjugációs reakcióba lép és a keletkező metabolit kiválasztódik az epével. E glükuronsavval képzett ibuprofén metabolit kumulatív biliáris kiürülése is módosult hiperglikémiás állapotban. Ezen vegyület esetében a STZ-vel való előkezelés szintén csökkenést mutatott a kumulatív exkréciós rátában. A kísérleti időtartam alatt az epével kiválasztásra kerülő IBP- β -D-G össz mennyisége jóval meghaladta az át nem alakult ibuprofén mennyiségét.

Akárcsak a korábban tárgyalt IBP vizsgálata esetében, a *p*-nitrofenol vizsgálata során is észlelhető volt a biliáris kumulatív elimináció csökkenése. A *p*-nitrofenol majdnem teljes mértékben metabolizálódott a májsejtekben. A keletkező metabolitokat – glükuronsav- illetve szulfátkonjugátumok - sikerrel ki tudtuk mutatni az epében vizsgálataink során. Az STZ-vel történt előkezelés szintén visszaszorította, negatívan befolyásolta mindhárom vegyület, PNP, PNP-G és PNP-S, biliáris exkrécióját (Almási 2011, Almási 2018). Említésre méltó, hogy normál vércukor érték mellett a legnagyobb mennyiségben az epével a PNP-G kiürülését észleltük, ezt követte a PNP-S (Almási 2018).

A kapott kísérleti adatokból látható, hogy a kísérletes diabétesz módosítani képes a vegyületek eliminációját. Ennek többféle oka lehet, így a szervek, szövetek szintjén lezajló különböző változások, fehérjeszintézis zavarok, transzportfolyamatok változása, enzimek mennyiségének és minőségének változása, stb. Az *in vivo* állatkísérleteink alatt gyűjtött minták analízise során kapott adatok megfelelnek annak a korábbi észrevételnek, mely szerint a hiperglikémia csökkenti az UGT enzim aktivitást (Almási 2018). Más szerzők a vegyületek hepatocitákból történő kiürítését segítő fehérjék mennyiségének csökkenését észlelték hiperglikémiás állapotban (Anger 2009, Nawa 2010). Hasonló eredményekre jutott Garai és társai 2018-ban közzétett értekezésükben, ahol a kísérletük során a P-gp, az MRP2, valamint a BCRP, exfluxot segítő fehérjék mennyiségének csökkenését észlelték (Garai 2018). Ezen kísérleti eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az *in vivo* állatkísérleteink eredményei -miszerint csökkent IBP, IBP- β -D-G kiürülést észleltünk az epében - megegyeznek mások által korábban észlelt következtetésekkel; miszerint a diabetikus állapot negatív hatást fejt ki egyes farmakonok/vegyületek biliáris exkréciójára (Watkins 1987, Andrews 1984).

4.3. A vékonybél és máj eliminációban betöltött szerepének összehasonlítása a *p*-nitrofenol és az ibuprofén esetében

Állatkísérleteink során különböző vegyületek vékonybélből történő eltűnését valamint intesztinális és hepatikus metabolizmusát vizsgáltuk kezeletlen és streptozotocinnal előkezelt állatcsoportok esetében. Kísérleteinkhez két csoportból választottunk vegyületeket, az 2-arilpropionsav-származékok közül az ibuprofént (nem szteroid gyulladáscsökkentő), míg a fenolok csoportjából a *p*-nitrofenolt.

A disszertációban igyekeztem bemutatni a két vegyület vizsgálata során kapott adatokat, összehasonlítani a vegyületek eliminációjában résztvevő két vizsgált szerv, a vékonybél és máj ebben betöltött szerepét; valamint a kísérletes diabétesz ezekre az összetett folyamatokra gyakorolt hatását a vegyületek perorális adagolását modellező kísérleteink során. A kapott eredmények adatainak mennyiségi összevetése jelen körülmények között nem helyénvaló, egyrészt mert a vegyületeket különböző kezdeti koncentrációban alkalmaztuk (500 μ M PNP, 250 μ M IBP), másrészt, mert a PNP fenol-, míg az IPB karbonsav-származék. Az ibuprofén vizsgálata esetében kezdetben próbálkoztunk az 500 μ M-os koncentrációval is, de ez már toxikus hatásokat okozott a kísérleti állatokban, így azt elvetettük és az említett kisebb koncentrációval dolgoztunk. Az általunk választott koncentráció arányos a gyógyításban alkalmazott terápiás dózissal.

A vékonybélnek a farmakonok eliminációjában betöltött szerepéről még mindig keveset tudunk, annak ellenére, hogy a vékonybél nagy fajlagos felülete elsődleges barrierként szolgál a *per os* bejuttatott molekulák számára. Számos enzim expresszálódik az enterocitákban, amelyek képesek Fázis I, illetve Fázis II típusú reakciók katalizálására. Számos transzportert azonosítottak az enterocitákban, amelyek könnyítik vagy nehezítik a farmakonok be- illetve kiáramlását a sejtekből. Egyes kutatók úgy vélik, hogy ennek a szervnek jelentős szerepe van a gyógyszerek *first-pass* effektusában, mások viszont elvetik ezt a gondolatot és a májat tekintik a *first-pass* hatásban résztvevő egyetlen fontos szervnek. Ami biztos, hogy a fentebb említett fehérvérjék mind hozzájárulhatnak a farmakonok eliminációjának elősegítésében.

A kísérleteink alatt láthattuk hogyan módosul a PNP farmakokinetikája a vékonybél szintjén. A kísérlet időtartama alatt vett minták analízise azt igazolta, hogy a PNP kezdeti mennyisége fokozatosan csökken a keringetett perfuzátumban. A hiperglikémiás állapot azonban negatívan befolyásolta a vegyület eliminációjának görbét a kontroll csoporthoz képest. A PNP kezdeti koncentrációjának csökkenését mutató tendenciája észlelhető volt ebben a kóros állapotban is, de a különbség nem volt szignifikáns a két vizsgálati csoport között. Az ibuprofén esetén, hasonló következtetéseket vonhatunk le. Az IBP kezdeti koncentrációja is fokozatosan csökkenő tendenciát mutat a keringetett perfuzátumban. A bélperfuzátumban a kísérleti időtartam alatt keringetett ibuprofén mennyisége majdnem minden vizsgált időpontban magasabb volt a hiperglikémiás állapotban. Ezek az eltérések a kísérlet vége felé haladva már statisztikailag is szignifikánsnak bizonyultak a két vizsgált csoport között. Korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy diabetikus állapotban csökken a vékonybélben a P-gp mennyisége (Anger 2009, Bojcev 1996, Nawa 2010), melynek következménye, hogy a vegyületek effluxja a sejtekből csökken, ezáltal felszívódásuk fokozódik a vékonybélből. Azt is tudjuk, hogy ezen transzporter mennyisége a vékonybél különböző szegmenseiben is különböző értékeket mutat (Mouly 2003); a duodenum→ileum irányába növekszik. Ezen információk ismeretében arra számítottunk, hogy hiperglikémia hatására fokozódik majd a vegyületek eltűnése a bélperfuzátumból, jobb lesz a felszívódásuk a vékonybélből. Kísérleteink során azonban, a diabetikus csoportnál magasabb IBP, illetve PNP koncentrációt észleltünk a keringetett perfuzátumban a kontroll csoporthoz képest. Feltételezhető, hogy a vizsgált vegyületek esetében a P-gp-nek nincs annyira jelentős hatása a farmakokinetikájukra mint hasonló tulajdonságokkal bíró más típusú gyógyszervegyület esetében (Li 2012). A vegyületek gyengén savas tulajdonságából adódóan előfordulhat, hogy fiziológiás körülmények között transzporterek segítségével képesek átjutni a sejteken és a P-gp expressziójának csökkenése nem befolyásolja jelentősen a vegyületek farmakokinetikáját a vékonybél szintjén. Az ibuprofén vizsgálata kísérleti körülményeink között nem mutatott glükuronid- vagy szulfát-konjugátumok jelenlétére utaló jelet a perfuzátumból vett minták analitikai elemzése során, ellentétben a vizsgált fenolos vegyülettel. A PNP-ről korábbi analíziseink alapján tudjuk, hogy a vékonybélben expresszáldó enzimek hatása alatt glükuronid-metabolitot képez, illetve szulfát-konjugációban is részt vesz (Fischer 2015).

Ami a máj eliminációban betöltött szerepét illeti, ismert, hogy a legtöbb vegyület esetében ez a szerv játssza a fő szerepet az eliminációs folyamatokban. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a hepatocitákba belépve a PNP és az IBP is metabolizálódik; ezen észrevétel összhangban van mások által korábban megfigyelt, hepatocitákban lezajló folyamatokkal (Dietzel 1990, Kanter 2002). A PNP biotranszformációja következtében általunk észlelt két metabolitja a PNP-G és a PNP-S, mely metabolitok akárcsak a nem konjugált PNP, az epével kiválasztódnak. A PNP-G biliáris exkréciója fokozottab mértékű, mint a PNP-S-é. Az ibuprofén nem kéoez szulfát-kojugátumot, glükuronsavas konjugációs útvonalon azonban metabolizálódik, IBP- β -D-G képez.

A hiperglikémia hatása a vegyületek biliáris kiválasztódására negatív hatással volt. Ez a kóros állapot csökkentette mind a glükuronid-, mind a szulfát-konjugátum ürülését az epével mindkét általunk vizsgált vegyület esetében. De nem csak a metabolitok, hanem az anyavegyületek (PNP és IBP) exkréciója is csökkenő tendenciát mutatott a kísérletes diabétesz hatására. A glükuronsavval történő konjugációs reakció STZ-vel való előkezelést követően fokozott glükuronid képződést eredményezett a hepatocitákban. Fentebb bemutatott kísérleti eredményeink sok tekintetben összhangban vannak mások adataival és eredményeivel. Többen leírták már biliáris exkrécióban megfigyelt csökkenést különböző vegyületek vizsgálata során hiperglikémiás állapot hatására (Andrews 1984, Carnovale 1984, Watkins 1987). Az általunk tapasztalt exkrécióban létrejövő változásokat egyes szerzők az exportot végző fehérjék mennyiségének változásával magyarázzák. Egy Garai és társai által elvégzett vizsgálat rámutatott arra, hogy hiperglikémiás állapotban csökken a P-gp (P-glikoprotein), az MRP2 (2-multidrog rezisztencia fehérje) és a BCRP (mellrák rezisztencia fehérje) expressziója a májsejtekben (Garai 2018). Ahogy az előbb is említésre került, diabéteszben csökken a sejtekben a P-gp expressziója melynek következtében a vegyületek exkréciója a szövetekből, sejtekből a vérbe lecsökken, így kevesebb vegyület választódik ki az epébe, illetve a vékonybélbe (Anger 2009, Nawa 2010, Zhang 2011). A kísérleti diabéteszben észlelhető fokozott glükuronizáció lejátszódását a kutatók a glükóz anyagcseréjében bekövetkező változásokkal próbálják magyarázni. A szervezet a glükózt inzulin-szenzitív útvonalon hasznosítja, azonban diabéteszben amikor a glükóznak a sejtekbe való beáramlásának (glükóz felvétel) folyamata csorbul (inzulin hiány vagy elégtelen inzulin felszabadulás következtében) a glükóz inzulin-inszenzitív útvonalon hasznosul. Egy többlépéses folyamat következtében az UDP-

glükózból UDP-dehidrogenáz hatására UDP-glükuronsav (UDPGA) képződik. A fokozott mennyiségben képződő UDPGA glükuronizációs reakcióba lép a kérdéses vegyülettel, mely reakciót az UGT-enzim katalizálja. Tehát diabetikus állapotban nagyobb mennyiségű szabad UDPGA áll rendelkezésre, aminek a következménye lehet a fokozott glükuronid képződés (Anderson 1974 és 1975, Watkins 1987).

5. A disszertációban tárgyalt kísérleti eredmények összefoglalása

Az értekezésben az Eredmények fejezetben bemutatott kísérleti adatok rövid összefoglalása a következő:

1. A kifejlesztett HPLC-UV-Vis analitikai módszerek (Módszer I, illetve Módszer II) szelektívek, pontosak, alkalmasak nagy mennyiségű biológiai minta vizsgálatára, illetve a vizsgált vegyületek, gyors, pontos, egyidejű azonosítására és mennyiségi meghatározására.
 - 1.1. A bélperfuzátumból nyert minták vizsgálatához kifejlesztett HPLC-UV-Vis izokratikus analitikai módszer (Módszer I) lehetővé tette az IBP illetve a DICL (belső standard) egyidejű azonosítását és mennyiségi meghatározását.
 - 1.2. A Módszer I vizsgálatnak alávetett vékonybél-perfuzátum mintákban az IBP, illetve a DICL (belső standard) retenciós ideje 6,11 perc illetve 5,21 perc.
 - 1.3. A vékonybél-perfuzátumban az IBP kimutatási illetve meghatározási határa 0.15 μM illetve 0.51 μM volt.
 - 1.4. Az epeminták vizsgálatához kifejlesztett HPLC-UV-Vis gradiens analitikai módszer (Módszer II) lehetővé tette az IBP, az IBP- β -D-G illetve a DICL (belső standard) egyidejű elválasztását, illetve mennyiségi meghatározását.
 - 1.5. A Módszer II módszerrel analizált epemintákban, az IBP, az IBP- β -D-G illetve a DICL (belső standard) retenciós ideje 10,92 perc, 4,74 perc illetve 10,08 perc volt.
 - 1.6. Az epében az IBP és az IBP- β -D-G kimutatási határa 1,33 μM illetve 3,09 μM , míg meghatározási határa 4,42 μM illetve 10,3 μM volt.
2. Az STZ-kezelés által létrehozott kísérletes diabétesz lehetőséget biztosít a diabétesz által okozott biotranszformációs és transzport-folyamatok változásainak tanulmányozására.
 - 2.1. Az alkalmazott kísérleti protokoll segítségével egyidejűleg vizsgálhatók a vékonybél és a máj biotranszformációs és transzport-folyamatai
 - 2.2 A ibuprofén eltűnése a vékonybél-perfuzátumból STZ-vel való előkezelés következtében lassul a kontroll csoporthoz viszonyítva.

- 2.3. A PNP-vel ellentétben, mely egy fenol típusú vegyület, az ibuprofén, mely egy karbonsav, sem ibuprofén-glükuronidot, sem más ibuprofén metabolitot nem sikerült kimutatni és azonosítani a vékonybél-perfuzátumból jelen kísérleti körülmények között.
- 2.4. A májsejtekben az ibuprofén UGT enzimek által katalizált biotranszformációja eredményeképpen IBP-G keletkezik; a vegyület glükuronsavas konjugációban vesz részt, a képződött metabolit az epével kiválasztódik.
- 2.5. A hiperglikémiás állapot statisztikai szempontból jelentősen csökkenti az IBP és keletkező konjugált metabolitjának, az IBP- β -D-G biliáris kiválasztódását.
- 2.6. A hiperglikémiás állapot negatívan befolyásolja a PNP eltűnését a bélumenből.
- 2.7. Az ibuprofénnel ellentétben, a PNP vizsgálata során a vékonybél-perfuzátum mintáiból PNP-G és PNP-S metabolitok voltak azonosíthatók.
- 2.8. A megemelkedett vércukorszint csökkenti a PNP és a képződött metabolitok kiürülését az epével. Ez az eredmény összhangban van az IBP vizsgálata során kapott tapasztalattal.
- 2.9. Az STZ-kezelés által létrehozott kísérletes diabétesz befolyással bír a PNP, illetve az IBP biotranszformációs és transzport-folyamataira.

6. Közlemények és kongresszusi prezentációk

6.1. Közlemények

1. Fischer, Emil, Almási, Attila, Bojcssev, Sztojan, Fischer, Tamás, Kovács, Noémi Piroska, Perjési, Pál: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on intestinal metabolism and excretion of 4-nitrophenol in rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 93, 459–464 (2015).

Q-besorolás: Q2

IF (2015): 1,704

2. Almási, Attila, Pinto, ÉILN, Kovács, Noémi Piroska, Fischer, Tamás, Markovics, Zoltán, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Changes in hepatic metabolic enzyme activities and biliary excretion of 4-nitrophenol in streptozotocin induced diabetic rats, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 54, e17347 (2018).

Q-besorolás: Q2

IF (2018): 0,512

3. Kovács, Noémi Piroska, Almási, Attila, Garai, Kitti, Kuzma, Mónika, Vancea, Szende, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Investigation of intestinal elimination and biliary excretion of ibuprofen in control and hyperglycemic rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 97, 1080-1089 (2019).

Q-besorolás: Q2

IF (2019): 1,946

6.2. Kongresszusi prezentációk

1a. Székely, Noémi Piroska, Almási, Attila, Kuzma, Mónika, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Az ibuprofen felszívódásának és kiválasztásának vizsgálata in vivo állatkísérletes modellen, *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV.*, Budapest (2014).

1b. Székely, Noémi Piroska, Almási, Attila, Kuzma, Mónika, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Az ibuprofén felszívódásának és kiválasztásának vizsgálata in vivo állatkísérletes modellen, *Gyógyszerészet*, 58 Suppl. 1., S78-S78 (2014).

2. Almási, Attila, Kovács, Noémi Piroska, Szabó, Anett, Sente, Lajos., Fischer, Emil, Perjési, Pál: Investigation of absorption and metabolism of ibuprofen in bile and small intestinal perfusate. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred (2014).

3. Székely Noémi-Piroska, Kuzma Mónika, Almási Attila, Vancea Szende, Sipos Emese, Fischer Emil, Perjési Pál: Az ibuprofén felszívódásának és kiválasztásának összehasonlító vizsgálata in vivo állatkísérletekben, Erdélyi Múzeum Egyesület, Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XXIV. Tudományos Ülésszak, Marosvásárhely (2014).
4. Almási, Attila, Kovács, Noémi Piroska, Fischer, Tamás, Kuzma, Mónika, Mayer, Mátyás, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Az ibuprofén felszívódásának és kiválasztásának vizsgálata vékonybél-perfuzátumban és epében, 45. Membrán-Transzport konferencia, Sümeg, Magyarország (2015).
5. Almási, Attila, Szabó, Anett, Kovács, Noémi Piroska, Mayer, Mátyás, Fischer, Tamás, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Az ibuprofén oxidatív metabolitjainak és felszívódásának vizsgálata a vékonybélben és az epében fiziológiás és diabéteszes körülmények között. 46. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, (2016).
6. Fischer, Emil, Almási, Attila, Bojceev, Sztojan, Kovács, Noémi Piroska, Fischer, Tamás, Perjési, Pál, Simon Higin: A máj eliminációs funkciójának változása Crohn-betegség modellben, 48. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2018.

7. Irodalom

- Ackermann DM, Leibman KC: Effect of experimental diabetes on drug metabolism in the rat, *Drug Metab. Disp.*, 4, 405 – 410 (1977)
- Adams SS, Bough RG, Cliffe EE, Lessel B és Mills RFN: Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 15, 310 – 330 (1969)
- Adams SS, Cliffe EE, Lessel B, Nicholson JS: Some biological properties of 2-(4-isobutylphenyl)-propionic acid, *J. Pharm. Sci.*, 56, 1686 (1967)
- Aitio A: UDP-glucuronyltransferase activity in various rat tissues, *Int. J. Biochem.*, 5, 325 – 330 (1974)
- 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)
- Almási A, Fischer E, Perjési P: HPLC quantification of 4-nitrophenol and its conjugated metabolites from bile, *Sci. Pharm.*, 79, 837-847 (2011)
- Almási A, Pinto ÉILN, Kovács NP, Fischer T, Markovics Z, Fischer E és Perjési P: Changes in hepatic metabolic enzyme activities and biliary excretion of 4-nitrophenol in streptozotocin induced diabetic rats, *Braz. J. Pharm.Sci.*, 54, e17347, (2018)
- Anderson JW: Alterations in metabolic fate of glucose in the liver of diabetic animals, *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 746 – 755 (1974)
- Anderson JW: Metabolic abnormalities contributing to diabetic complications. I. Glucose metabolism in insulin-insensitive pathways, *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 273 – 280 (1975)
- Andrew SM, Griffiths LA: The metabolic and disposition of [^{14}C] diazepam in the streptozotocin –diabetic rat, *Xenobiotica*, 14, 751 – 760 (1984)
- Anger GJ, Magomedova L, Piquette-Miller M: Impact of acute streptozotocin-induced diabetes on ABC transporter expression in rats, *Chem. Biodivers.*, 6, 1943 – 1959 (2009)
- Basu NK, Kubota S, Meselhy MR, Ciotti M, Chowdhury B, Hartori M, Owens IS: Gastrointestinally distributed UDP-glucuronosyltransferase 1A10, which metabolizes estrogens and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, depends upon phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 279, 28320 – 28329 (2004)

- Berner G, Staab R, Vögtle-Junkert U: Solid phase extraction for the determination of ibuprofen by means of HPLC and UV detection in the lower ng range in plasma and urine, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347, 513-515 (1993)
- Bojčev S, Rafiei A, Fischer E: Changes in the biliary excretion of exogenous organic anions by streptozotocin-induced diabetes, *Acta Physiol. Hung.*, 3, 263 – 264, (1996)
- Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Tyanagi T, Jansen PLM, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G, Tephly TR, Mackenzie PI: The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence, *DNA Cell Biol.*, 10, 487 – 494 (1991)
- Caldwell J, Marsh MV: Metabolism of drugs by the gastrointestinal tract, in *Clinical Pharmacology and Therapeutics: Presystemic drug elimination*, Butterworths, 29-42 (1982)
- Canaparo R, Muntoni E, Zara GP, Pepa CD, Berno E, Costa M, Eandi M: Determination of ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.*, 14, 219 - 226 (2000)
- Carnovale CE, Rodriguez-Garay EA: Reversible impairment of hepatobiliar function induced by streptozotocin in rat, *Experientia*, 40, 248 – 250 (1984)
- Castillo M, Smith PC: Direct determination of ibuprofen and ibuprofen acyl glucuronide in plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction, *J Chromatogr.*, 614, 109 – 116 (1993)
- Chang SY, Li W, Traeger SC, Wang B, Cui D, Zhang H, Wen B, Rodrigues AD: Confirmation that cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) plays a minor role in (S)-(+)- and (R)-(-)-ibuprofen hydroxylation in vitro, *Drug Metab Dispos.*, 36, 2513 – 2522 (2008)
- Chu XY, Bleasby K, Yabut J, Cai X, Chan GH, Hafey MJ, Xu S, Bergman AJ, Braun MP, Dean DC, Evers R: Transport of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by human organic anion transporter 3, organic anion transporting polypeptide 4C1, and multidrug resistance P-glycoprotein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321, 673 – 683 (2007) Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Cook DE, Jackson JD, Past MR, Lang CM, Bullock LP: Drug metabolism in spontaneously diabetic guinea pigs, *Experientia*, 40, 840 – 841 (1984)

- Coughtrie MWH, Sharp S, Maxwell K, Innes NP: Biology and function of reversible sulfation pathway catalyzed by human sulfotransferases and sulfatases, *Chem.-Biol. Interact.*, 109, 3 – 27, (1998)
- Csáky TZ, Fischer E: Induction of an intestinal epithelial sugar transport system by high blood sugar, *Experientia*, 33, 223 – 224 (1977)
- Csáky TZ, Fischer E: Intestinal sugar transport in experimental diabetes, *Diabetes*, 30, 568 – 574 (1981)
- Davies NM: Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years., *Clin. Pharmacokinet.*, 34, 101–154 (1998)
- Dietzel K, Beck WS, Schneider HT, Geisslinger G, Brune K: The biliary elimination and enterohepatic circulation of ibuprofen in rats, *Pharm. Res.*, 1, 87 – 90 (1990)
- Dixon RL, Hart LG, Fouts JR: The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 7 – 11 (1961)
- Domańska U, Pobudkowska A, Pelczarska A, Gierycz P: pK_a and solubility of drugs in water, ethanol, and 1-Octanol, *J. Phys. Chem. B.*, 26, 8941 – 8947 (2009)
- Dong D, Ako R, Hu M, Wu B: Understanding substrate selectivity of human UDP-glucuronosyltransferases through QSAR modeling and analysis of homologous enzyme, *Xenobiotica*, 42, 808-820 (2012)
- Dostalek M, Achlaghi F, Puzanovova M: Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs, *Clin. Pharmacokinet.* 51, 481 – 499, (2012)
- Eacho PI, Sweeny D, Weiner M: Effect of glucose and fructose on conjugation of *p*-nitrophenol in hepatocytes of normal and streptozotocin-diabetic rats, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 2616 – 2619 (1981)
- Eadsforth CV, Coveney DC: Measurement of phenol in urine using a high-performance liquid chromatographic method, *Analyst*, 109, 175 – 176 (1984)
- Espinosa-Mansilla A, Muñoz de la Peña A, González Gómez D, Cañada-Cañada F: HPLC determination of ciprofloxacin, cloxacilin, and ibuprofen drugs in human urine samples, *J. Sep. Sci.*, 29, 1969 - 1976 (2006)
- Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ: Intestinal drug transporters: An overview, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol 65, 10, 1340 – 1356 (2013)
- Falany CN: Enzymology of human cytosolic sulfotransferases, *FASEB J.*, 11, 206 – 215 (1997)

- Falany CN: Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferases, *TiPS*, 12, 255 – 259, (1991)
- Ficher E, Lauterbach F: Effect of hyperglycemia on sugar transport in the isolated mucosa of guinea-pig small intestine, *J. Physiol.*, 355, 567 – 586 (1984)
- Fischer E, Almási A, Bojcsev Sz, Fischer T, Kovács NP és Perjési P: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on intestinal metabolism and excretion of 4-nitrophenol in rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 93, 459 – 464 (2015)
- Fischer E, Rafiei A, Bojcsev S: Effect of hyperglycemia on the intestinal elimination of *p*-nitrophenol in the rat, *Acta Physiol. Hung.*, 3, 287 – 288 (1996)
- Fischer E, Rafiel A, Bojcsev S: Intestinal elimination of *p*-nitrophenol in the rat, *Acta Physiol. Hung. Vol.* 83, 4, 355 – 362 (1995)
- Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M: Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampicin, *Hepatology*, 24, 796 – 801, (1996)
- Garai K, Frezik M, Almási A, Pap R, Pandur E, Horváth Gy, Bencsik T, Póor M, Pohóczky K, Pál Sz, Horváth B, Perjési P, Kvell K: The diabetic drug metabolism landscape. “*Innovation Today Medicine tomorrow*” Conference of Pharma Innovation 2018. Hungarian Society for Experimental and Clinical Pharmacology, 2018, April 9-11, Velence, Hungary (2018)
- Ge ZK, Luo YH, Zhao XY, Zhang YJ, Zhang H, Tian CC: Simultaneous determination of ibuprofen and diphenhydramine HCl in orally disintegrating tablets and its dissolution by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 2100-2105 (2011)
- Geisslinger G, Dietzel K: High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, its metabolites and enantiomers in biological fluids, *J. Chromatogr.*, 491, 139 – 149 (1989)
- George CF: Drug metabolism by gastrointestinal mucosa, *Clin. Pharmacokinet.*, 6, 259 – 274 (1981)
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L: Membran transporters in drug development, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 9, 215 – 236, (2010)

Glatt HR: Sulfation and sulfotransferases: 4. Bioactivation of mutagens via sulfation, *FASEB J.*, 11, 314 – 321 (1997)

Glatt^a HR, Bartsch I, Christoph S, Coughtrie MWH, Falany CN, Hagen M, Landsiedel R, Pabel U, Phillips DH, Seidel A, Yamazoe Y: Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems, *Chem.-Biol. Interact.*, 109, 195 – 219 (1998)

Glatt^b HR, Dawis W, Meinel W, Hermersdörfer H, Venitt S, Phillips DH: Rat, but no human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture, *Carcinogenesis*, 19, 1709 – 1713 (1998)

Grams B, Harms A, Braun S, Strassburg CP, Manns MP, Obermayer-Straub P: Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract, *Arch. Biochem. Biophys.*, 377, 255-265 (2000)

Hall SD, Xiaotao Q: The role of coenzyme A in the biotransformation of 2-arylpropionic acids, *Chem.-Biol. Interact.*, 90, 235 – 251 (1994)

Hamman MA, Thompson GA, Hall SD: Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C., *Biochem Pharmacol.*, 54, 33 – 41 (1997)

Hamoudová R, Pospíšilová M: Determination of ibuprofen and flurbiprofen in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1463 - 1467 (2006)

Hassan AS, Sapin A, Ubrich N, Maincent P: Simple and sensitive HPLC method with fluorescence detection for measurement of ibuprofen in rat plasma: application to a long-lasting dosage form, *Drug Develop. Ind. Pharmacy*, 34, 1064 – 1070 (2008)

Hebert MF, Roberts JP, Prueksaritanont T, Benet LZ: Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampicin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction, *Clin. Pharmacol Ther.*, 52, 453 – 457 (1992)

Holtbecker N, Fromm MF, Kroemer HK, Ohmms EF, Heidermann H: The nifedipin-rifampicin interaction: Evidence for induction of gut wall metabolism, *Drug Metab. Dispos.* 24, 1121 – 1123 (1996)

Ilett^a KF: In vivo studies of gut wall metabolism, in *Clinical Pharmacology and Therapeutics: Presystemic drug elimination*, Butterworths, 26-53 (1990)

- Ilett^b KF, Tee LBG, Reeves PT, Minchin RF: Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen wall, *Pharmacol. Ther.* 46, 67 – 93 (1990)
- Itagaki S, Gopal E, Zhuang L, Fei YJ, Miyauchi S, Prasad PD, Ganapathy V: Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8), *Pharm. Res.*, 23:1209–1216 (2006)
- Jefferson LS, Liao WSL, Peavy DE, Miller TB, Appel MC, Taylor JM: Diabetes-induced alterations in liver protein synthesis. Changes in the relative abundance of mRNAs for albumin and other plasma proteins, *J. Biol. Chem.*, 258, 1369 – 1375, (1983)
- Jeffrey P, Tucker GT, Bye A, Crewe HK, Wright PA: The site of inversion of R(-)-Ibuprofen: Studies using rat in-situ isolated perfused intestine/liver preparations, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 715 – 720 (1991)
- Jung ES, Lee HS, Rho JK, Kwon KI: Simultaneous determination of ibuprofen and ibuprofen in human plasma by HPLC with column switching. *Chromatographia*, 37, 618-622, (1993)
- Kaminsky LS, Zhang QY: The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ, *Drug Metabol. Disp.*, 31, 12, 1520 – 1525 (2003)
- Kanter R, Jager MH, Draaisma Al et al: Drug-metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices, *Xenobiotica*, 32, 349 – 362 (2002)
- Kepp DR, Sidelmann UG, Hansen SH: Isolation and characterization of major phase I and II metabolites of ibuprofen. *Pharm. Res.*, 14:676 – 680 (1997)
- Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H: Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303, 534 – 539 (2002)
- Kim YC, Lee AK, Lee JH, Lee I, Lee DC, Kim SH, Kim SG, Lee MG: Pharmacokinetics of theophylline in diabetes mellitus rats: induction of CYP1A2 and CYP2E1 on 3-dimethyluric acid formation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26, 114 – 123 (2005)
- Kim YC, Lee JH, Kim SH, Lee MG: Effect of CYP3A1(23) induction on clarithromycin pharmacokinetics in rats with diabetes mellitus, *Antimicrob Agents Chemother.*, 49, 2528 – 2532 (2005)

- King C, Tang V, Ngui J, Tephly T, Braun M: Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac, *Toxicol. Sci.*, 61, 49-53 (2001)
- Klaassen, CD. Bile flow and bile composition during bile acid depletion and administration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52, 334-348 (1973)
- Knadler MP, Hall SD: Stereoselective arylpropionyl-CoA thioester formation in vitro, *Chirality*, 2, 67-73 (1990)
- Knihinicki RD, Williams KM és Day RO: Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs -1, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 4389 – 4395 (1989)
- Kothare AP, Zimmermann CL: Intestinal metabolism: the role of enzyme localization in phenol metabolite kinetics, *Drug Metab. Dispos.*, 30, 586 -594 (2002)
- Kot-Wasik A, Debska J, Wasik A, Namiesnik J: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in natural waters using off-line and on-line SPE followed by LC coupled with DAD-MS, *Chromatographia*, 64, 13-21 (2006)
- Krijghsheld KR, Scholtens E, Mulder GJ: An evaluation of methods to decrease the availability of inorganic sulphate for sulphate conjugation in the rat in vivo, *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1973–1979 (1981)
- Krishna DR, Klotz U: Extrahepatic metabolism of drugs in humans, *Clin. Pharmacokinet.* 26, 144 – 160 (1994)
- Kudo T, Toda T, Ushiki T, Ohi K, Ikarashi N, Ochiai W, Sugiyama K: Differences in the pharmacokinetics of Cyp3a substrates in TSOD and streptozotocin-induced diabetic mice, *Xenobiotica*, 40, 282 – 290 (2010)
- Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J: Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, 33, 1027–1035 (2005)
- Kuhn MD, Rost M, Müller D: Para-nitrophenol glucuronidation and sulphation in rat and human slices, *Exp. Toxic. Pathol.*, 53, 81 – 87 (2001)
- Lee U, Lee I, Lee BK, Kang HE: Faster non-renal clearance of metoprolol in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50, 447 – 453 (2013)
- Li Y, Wei Y, Zhang F, Wang D, Wu X: Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Acta Pharm. Sinica B*, 2, 198 – 204 (2012)

- Lin JH, Chiba M, Baillie TA: Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?, *Pharm. Rev.* 51, 135 – 157 (1999)
- Liudmila L. Mazaleuskaya, Katherine N. Theken, Li Gong, Caroline F. Thorn, Garret A. FitzGerald, Russ B. Altman, Teri E. Klein: PharmGKB summary: ibuprofen pathways, *Pharmacogenet. Genomics*, 25(2), 96 – 106 (2015)
- Miles KK, Kessler FK, Smith PC, és Ritter JK: Characterization of rat intestinal microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity toward mycophenolic acid, *Drug. Metab. Dispos.*, 34, 1632-1639 (2006)
- Miners JO, Mackenzie PI: Drug glucuronidation in humans, *Pharmacol. Ther.*, 51, 347 – 69 (1991)
- Mouly S, Paine MF: P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine, *Pharm. Res.*, 20, 1595 – 1599 (2003)
- Nawa A, Fujita Hamabe W, Tokuyama S: Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions, *Life Sci.*, 86, 402 – 409 (2010)
- Omkvist DH, Brodin B, Nielsen CU: Ibuprofen is a non-competitive inhibitor of the peptide transporter hPEPT1 (SLC15A1): possible interactions between hPEPT1 substrates and ibuprofen, *Br. J. Pharmacol.*, 161, 1793 – 1805 (2010)
- Pain VM, Lanoix J, Bergeron JJM, Clemens MJ: Effect of diabetes on the ultrastructure of the hepatocyte and on the distribution and activity of ribosomes in the free and membrane-bound populations, *Biochem. Biophys. Acta.*, 353, 487 – 498 (1974)
- Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS, Thummel KE: First –pass metabolism of midazolam by the human intestine, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60, 14 – 24 (1996)
- Palmgren JJ, Monkkonen J, Jukkola E, Niva S, Auriola S: Characteriyation of Caco-2 cell monolayer drug transport properties by cassette dosing using Uv/fluorescence HPLC, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57, 319 – 328 (2004)
- Parkinson A, Ogilvie BW, Buckley DB, Kazmi F, Czerwinski M, Parkinson O: Biotransformation of Xenobiotics. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 8th Edition (Klassen, CD, Ed.). McGraw-Hill Education, New York, N.Y., 6. Fejezet, 185-366 (2013)
- Pietrè D, Grandi M: Rapid determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 170, 278 – 281 (1979)

- Plumb RS, Rainville PD, Potts WB 3rd, Castro-Perez JM, Johnson KA, Wilson ID: High-temperature ultra-performance liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry applied to ibuprofen metabolites in human urine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 4079-4085 (2007)
- Renwick AG, George CF: Metabolism of xenobiotics in the gastro-intestinal tract, in *Intermediary Xenobiotic Metabolism in Animals: methodology, mechanisms and significance*, Taylor and Francis, 13 – 40 (1989)
- Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI: The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45, 1121-1132. (2013)
- Sakaguchi K, Green M, Stock N, Reger TS, Zunic J, King C: Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms, *Arch. Biochem. Biophys.*, 424, 219–225 (2004)
- Santos JL, Aparicio I, Alonso EE, Callejon M: Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, *Anal. Chim. Acta.*, 550, 116 – 122 (2005)
- Shipkova M, Wieland E: Glucuronidation in therapeutic drug monitoring, *Clin. Chim. Acta*, 358, 2– 23 (2005)
- Sochor J, Klimes J, Sedlacek J, Zahradnicek M: Determination of ibuprofen in erythrocytes and plasma by high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13, 899 – 903 (1995)
- Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Sai Y, Ogihara T, Higashida H, Tsuji A: Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 482–489 (1995)
- Teng XW, Wang SWJ, Davies NM: Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of ibuprofen in rat serum, *J. Chromatogr. B.*, 796, 225 – 231 (2003)
- Toda A, Shimeno H, Nagamatsu A, Shigematsu H: Effect of experimental diabetes on aminopyrine metabolism in rats, *Xenobiotica*, 17, 1075 – 1083 (1987)
- Turgeon D, Carrier JS, Chouinard S, Bélanger A: Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics, *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 670–676 (2003)
- Vargas M, Franklin MR: Intestinal UDP-glucuronosyltransferase activities in rat and rabbit, *Xenobiotica*, 27, 413 – 421, (1997)

- Vega P, Gaule C, Mancilla J, Del Villar E: Comparison of alloxan and streptozotocin induce diabetes in rats: differential effects on microsomal drug metabolism, *Gen. Pharmac.*, 2, 489 – 495 (1993)
- Vega P, Gaule C, Sanchez E, Del Villar E: Inhibition and activation of UDP-glucuronyltransferase in alloxanic-diabetic rats, *Gen. Pharmac.*, 6, 641 – 645 (1986)
- Wang J, Hughes TP, Kok CH, Saunders VA, Frede A, Groot-Obbink K, Osborn M, Somogyi AA, D'Andrea RJ, White DL: Contrasting effects of diclofenac and ibuprofen on active imatinib uptake into leukaemic cells, *Br. J. Cancer.*, 106, 1772–1778 (2012)
- Wang P, Qi M, Liu L, Fang L: Determination of ibuprofen in dog plasma by liquid chromatography and application in pharmacokinetics studies of an ibuprofen prodrug in dogs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38, 714 – 719 (2005)
- Watkins III JB, Dykstra T: Alterations in biliary excretory function by streptozotocin-induced diabetes, *Drug. Metab. Dispos.*, 15, 177 – 183 (1987)
- Watkins III JB, Sanders RA, Beck LV: The effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on the hepatotoxicity of bromobenzene and carbon tetrachloride and hepatic biotransformation in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 93, 329 – 338 (1988)
- Wu B, Kulkarni K, Basu Zhang S, Hu M: First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics, *J. Pharm. Sci.*, 100, 3655–3681 (2011)
- Wu CY, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomey DY, Wacher VJ: Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine, *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 492 – 497 (1995)
- Yamazoe Y, Nagata K, Ozawa S, Kato R: Structural similarity and diversity of sulfotransferases, *Chem.-Biol. Interact.*, 92, 107 – 117 (1994)
- Zhang L, Lu L, Jin S, Jing X, Yao D, Hu N, Liu L, Duan R, Liu X, Wang G, Xie L: Tissue-specific alterations in expression and function of P-glycoprotein in streptozotocin-induced diabetic rats, *Acta Pharmacol. Sinica*, 32, 956 - 966 (2011)
- Zhao WH, Abraham MH, Le J, Hersey A, Luscombe CN, Beck G, Sherborne B, Cooper I: Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption, *Eur. J. Med. Chem.*, 38, 233 – 243 (2003)
- Zhao X, Chen D, Li K, Wang D: Sensitive liquid chromatographic assay for simultaneous determination of ibuprofen and its prodrug, ibuprofen eugenol ester, in rat plasma, *Yakugaku Zasshi*, 125, 733 – 737 (2005)

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Perjési Pál** professzor úrnak, program- és korábbi témavezetőmnek, aki mindvégig támogatót és bátorított, lehetőséget biztosított a tudományos munka elvégzéséhez és mindvégig stimulált a Ph.D. munkám során.

Köszönettel tartozom **Dr. Fischer Emil** professzor úrnak, korábbi témavezetőmnek, akinek segítőkészsége, útmutatásai és türelme hozzájárult ahhoz, hogy a kísérleteket eredményesen elvégezhettem és az adatokat a tézisben összefoglalva bemutathattam.

Köszönettel tartozom jelenlegi témavezetőmnek, **Dr. Almási Attila** egyetemi adjunktusnak, akinek segítőkészsége, tanácsai és lelki támogatása alapvetően hozzájárult ahhoz, hogy a kísérletes munkám megvalósulhasson és a kapott adatokat sikerrel bemutathassam dolgozatom keretében.

Köszönettel tartozom **Dr. Pintér Erika** egyetemi tanárnőnek, a Gyógyszertudományi Doktori Iskola vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a Ph.D. tevékenységhez a Doktori Iskola keretein belül.

Köszönettel tartozom **Dr. Sipos Emese** a Marosvásárhely-i Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem professzorának, aki elindított ezen az úton és otthonról mindvégig támogatót a munkám során.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Reiszné Horváth Mária** asszisztensnőnek, akitől az állatkísérletek kivitelezésében értékes információkat és segítséget kaptam munkám során.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Vancea Szende** egyetemi adjunktusnak, aki a Marosvásárhelyen végzett munkámban segítségemre volt

Köszönettel tartozom az **Erdélyi Múzeum Egyesület vezetőségének**, akik anyagi támogatással hozzájárultak a tudományos munkám véghezviteléhez.

Végül de nem utolsó sorban köszönettel tartozom **családomnak, férjemnek** aki mindvégig türelemmel viselte az utazásokat és támogatót a munkám során.

9. A dolgozat alpjául szolgáló közlemények

I. Fischer, Emil, Almási, Attila, Bojcssev, Sztojan, Fischer, Tamás, Kovács, Noémi Piroska, Perjési, Pál: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on intestinal metabolism and excretion of 4-nitrophenol in rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 93, 459–464 (2015).

Q-besorolás: Q2

IF (2015): 1,704

II. Almási, Attila, Pinto, ÉILN, Kovács, Noémi Piroska, Fischer, Tamás, Markovics, Zoltán, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Changes in hepatic metabolic enzyme activities and biliary excretion of 4-nitrophenol in streptozotocin induced diabetic rats, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 54, e17347 (2018).

Q-besorolás: Q2

IF (2018): 0,512

III. Kovács, Noémi Piroska, Almási, Attila, Garai, Kitti, Kuzma, Mónika, Vancea, Szende, Fischer, Emil, Perjési, Pál: Investigation of intestinal elimination and biliary excretion of ibuprofen in control and hyperglycemic rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 97, 1080-1089 (2019).

Q-besorolás: Q2

IF (2019): 1,946