A kísérletes hiperglikémia hatása endogén és exogén vegyületek oxidatív transzformációira patkányban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Hawsar Othman Mohammed

Farmakológiai és Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Programvezető: **Prof. Dr. Pál Perjési**

Témavezető: **Prof. Dr. Pál Perjési**

Gyógyszerészi Kémiai Intézet,

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Pécs 2022

1. Bevezetés

A cukorbetegség (DM) gyakori betegség, amelynek összetett anyagcsere- és endokrin rendszere a világ népességének nagy részét befolyásolja. A cukorbetegséget magas vércukorszint (hiperglikémia) jellemzi, ami a hasnyálmirigy béta-sejtjeiből származó inzulin elégtelen hatásának és kiválasztódásának az eredménye. A hiperglikémia, a különböző jelátviteli útvonalak megváltoztatásának, reaktív oxigén részek (ROS) generálásának, eredményeképpen oxidatív stresszhez és sejthalálhoz vezethet. Az oxidatív stressz eredményeképpen keletkező reaktív oxigén részek (ROS) hozzájárulnak a cukorbetegségre jellemző szövődmények kialakulásához.

Gyakran előfordul, hogy az inzulin injekció és/vagy az antidiabetikus gyógyszerek mellett a betegeknek számos más gyógyszert is alkalmazniuk kell. Az azonban, hogy a cukorbetegség milyen mértékben befolyásolja a gyógyszerek sorsát a szervezetben, ma még nem teljesen ismert. A cukorbetegség során bekövetkező patofiziológiai változások befolyásolhatják a gyógyszerek felszívódását, eloszlását, metabolizmusát és kiválasztását. A korábbi tanulmányok azonban több gyógyszerre vonatkozóan is gyakran egymásnak ellentmondó adatokat szolgáltattak; valószínűleg a betegek jellemzőinek vagy hiperglikémiás állapotuk kontrolljának az adatgyűjtéskor rögzített különbözőségei miatt.

Ezért kísérleti állatok alkalmazásával folytatott kutatások nagy jelentőséggel bírnak a gyógyszerek sorsában bekövetkező, hiperglikémia okozta változások jobb megértésében. A streptozoticin (STZ) által patkányban kiváltott hiperglikémia gyakran alkalmazott állatmodell az ilyen vizsgálatokhoz. A Gyógyszerészi Kémiai Intézetben korábban több olyan vizsgálat is történt, amelyek során a kísérletes hiperglikémia hatását vizsgálták a különböző testidegen anyagok (közöttük gyógyszerek) farmakokinetikájára. E korábbi vizsgálatok folytatásaként a jelenlegi munka célja az ibuprofén, egy széles körben alkalmazott nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer, farmakokinetikájának (metabolizmus és elimináció) vizsgálata hiperglikémiás patkány modellen. Ezen kívül, célkitűzésink között szerepelt a lipidek, fehérjék, valamint a kiválasztott peptidek (glutation) és aminosavak (fenilalanin) oxidatív károsodásának kémiai jellemzése rendszeresen használt állatmodellünk kiválasztott szerveiben. A kutatás arra is információt keresett, hogy oxidált

ibuprofén metabolitok képződése, lehet-e a hiperglikémia-indukált oxidatív stressz egyik indikátora a vékonybélben és a májban.

1.1. Oxidatív stressz és hiperglikémia

Korábbi vizsgálatok igazolták a hiperglikémia és az oxidatív stressz közötti kapcsolat létezését. A hiperglikémia növeli a reaktív oxigén részek (ROS) számát és gyengíti az antioxidáns védelmi tevékenységeket. A ROS képződés enzimatikus forrásai a mitokondriális légzési lánc enzimjei, a xantin-oxidázok, ciklooxigenázok, lipoxigenázok, peroxidázok és a nitrogén-oxid-szintázok. A hiperglikémia és az oxidatív stressz együttes eredménye a cukorbetegség kialakulása, és mindkettő a diabéteszes szövődmények patogenézise forrásának tekinthető. A hiperglikémia metabolikus rendellenességek eredményeként felborít számos mitokondriális és nem-mitokondriális folyamatot, melyek eredményeképpen extra szuperoxid termelődik. Ez a lépés számos oxidatív stressz útvonalat nyit meg, amelyek diabéteszes szövődményeket okoznak.

Számos metabolikus és jelátviteli útvonalról igazolták, hogy részt vesz a diabetest kísérő oxidatív stressz, oxidatív károsodások és szövődmények kialakulásában, amelyek általában kapcsolódnak a szénhidrátok és a lipidek metabolizmusához. Ezenkívül, az extra-mitokondriális szuperoxid-termelés központi szerepet játszik ezekben az anyagcsere-mechanizmusokban és a betegség szövődményeinek kialakulásában. Az eddigi feltételezett útvonalak a következők: glükóz oxidáció, glicerinaldehid-3-P dehidrogenáz (GAPDH) vagy (PARP) útvonal, poliol útvonal, hexózamin útvonal, diacilglicerin (DAG) képződés, a protein-kináz C (PKC) aktiválása, a glicerinaldehid autooxidációja, az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) képződése és a stresszérzékeny jelátviteli útvonalak.

1.2. Az ibuprofén biotranszformációja

Az ibuprofén ($C_{13}H_{18}O_2$) a 2-arilpropionsav-származékok csoportjába tartozó nem-szteroid gyulladáscsökkentő szer (NSAID). A 2-arilpropionsav oldalának fő szerkezeti jellemzője egy sp^3-hibrid állapotú királis szénatom. Az ibuprofén szokásos alkalmazási módja a szájon át történő bevitel. A szervezetbe kerülő ibuprofén nagy hányada biotranszformációs utakon metabolizálódik, egy része változatlan formában ürül a szervezetből. Az ibuprofén első metabolikus átalakulása a CYP enzimek által katalizált, a vegyület

inaktiválódását okozó oxidáció. Emberben, az ibuprofén hidroxilezésében részt vevő legfontosabb CYP izoforma a CYP2C9. Kisebb jelentőségűek a CYP2C8, CYP3A4 és CYP2C19 izoformák. Orális (*per os*) alkalmazás esetén, a 2-hidroxiibuprofén (2-HO-IBP) és a karboxiibuprofén (HOOC-IBP) az ibuprofén főbb metabolitjai. Az ibuprofén anyavegyület és hidroxilált metabolitjai glükuronsavval konjugálódnak, acil-glükuronidokat képezve. Kismértékben, az ibuprofén taurinnal is képez konjugátumot, ibuprofén-taurátot (IBP-TAU) képezve.

Az ibuprofén az egy királis szénatomot hordozó 2-arilpropionsav-származékok egyike. A forgalomban lévő ibuprofén készítmények a hatóanyagot racém formában tartalmazzák. Kísérletek igazolták, hogy az *S*(+)-enantiomer a hatékonyabb forma, míg az *R*(−)-izomer inaktív formának tűnik. A szervezetben a racém ibuprofén (R)-enantiomerje egyirányú (*R*)→(*S*) inverzió eredményeképpen az *S*(+)-enantiomerré alakul. Az *S*(+)-enantiomer aránya abnormális fiziológiai körülmények között, például hiperglikémia esetén, nem minden tekintetben tisztázott.

2. Célkitűzések

- Kiválasztott endogén vegyületek – lipidek, fehérjék, peptidek (glutation) és aminosavak (fenilalanin) - oxidatív átalakulásainak vizsgálata vékonybélben, májban és vesében, STZ által kiváltott hiperglikémiás patkány modellen.
- *Az* ibuprofén oxidációjának *in vitro* vizsgálata két (Fenton és Udenfriend) nem enzim-katalizált reakcióban a fő oxidatív termékek szerkezetének megismerése céljából.
- Az ibuprofén *in vivo* oxidatív átalakulásainak tanulmányozása a vékonybélben és a májban STZ által kiváltott hiperglikémiás patkány modellen.

(a) Az ibuprofén ismert oxidatív és konjugált metabolitjainak vizsgálata kontroll és hiperglikémiás patkány vékonybél-perfúzióiban és epében.

(b) Az ibuprofén és ismert oxidált metabolitjai vékonybélből történő felszívódásának és epéből történő kiválasztásának vizsgálata kontroll és hiperglikémiás patkányokban.

(c) Az *R*(-) és *az S*(+)-ibuprofén arányának vizsgálata a kontroll és hiperglikémiás patkány vékonybél-perfúzióban és epében.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Állatok és kísérleti eljárás

Hím Wistar patkányokat (9-11 hetesek; súlyuk 250-300 g; TOXI-COOP, Magyarország, Budapest) négy csoportba osztottunk. Az I. csoport volt a kontroll, a II., III. és IV. csoportok pedig hiperglikémiás kezelt állatok (n = 4 minden csoport esetén). Utóbbi csoportok vizsgálata egy héttel (II. csoport), két héttel (III. csoport) illetve négy héttel (IV. csoport) az STZ-kezelést követően történt. A kísérletes diabéteszt (hiperglikémiát) streptozotocin (STZ) intravénás injekciójával (65 mg/testtömeg kilogramm) indukáltuk. A kísérleti állatok standard tápot (Safe D40, Scientific Diets, Rosenberg, Németország) és ad libitumot vizet kaptak. A tápot a kísérletek előtti napon (16 órakor) megvontuk az állatoktól. A hiperglikémia ellenőrzése céljából a vércukorszintet a kísérletek napján (reggel 8 órakor) teszteltük. Az állatokat intraperitoneális uretán injekcióval (1,2 g/testtömeg kilogramm) érzéstelenítettük. A hasat egy középvonali bemetszéssel megnyitottuk, a kiválasztott szerveket összegyűjtöttük. Az összegyűjtött mintákat az elemzés idejéig mélyhűtőben (-70 ^{o}C) tároltuk.

3.2. A minták előkészítése

A szervminta ismert tömegét kimértük, majd pH 7,4 homogenizáló pufferrel 1:3 arányban. homogenizáltuk. A puffer összetétele a következő volt 0,154 M KCl, 50 mM Trizma és 5 mM EDTA·Na_2. Az elegyhez 1 ml, MeOH-ban oldott 50 mg/ml BHT-t adtunk, majd jéghűtés mellett 90 másodpercig (50 sebességes sebesség) Witeg® homogenizátorral (HG-15A) homogenizáltuk. A homogenizátumot a pufferrel hígítottuk, hogy elérjük a végső 1:4 tömeg/térfogat arányt (25%-os homogenizátum). Az elkészített homogenizátumokat Eppendorf csövekbe adagoltuk és azokat a kísérletek idejéig mélyhűtőben (-70 ^{o}C) tároltuk.

3.3. A fehérjetartalom UV-Vis meghatározása (Biuret módszer)

10 ml-es kémcsőben 0,1 ml szerv-homogenizátumhoz (25%) 1,0 ml SDS-t (8,1%), 0,9 ml NaCl-t (0,9%) és 8,0 ml biuret reagenst ($CuSO_4$•$5H_2O$, $KNaC_4H_{4O\ 6}$•$4H_2O$, KI és NaOH desztillált vízben) adtunk. Az elegyet szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Ezután a minta 1,0 ml-ét 550 nm-en, vakpróbával szemben UV-spektrofotométerrel (Jasco® V-750) mértük. A minták

fehérjekoncentrációját a szarvasmarha szérum albumin (BSA) kalibrációs görbéjének egyenletével határoztuk meg ($y = 0,2583x + 0,1124$, $R^2 = 0,9997$). A kalibrációs görbét különböző koncentrációjú BSA oldatok hasonló eljárással kapott oldatainak mérésével kaptuk.

3.4. A fehérje karbonil-tartalom UV-Vis-meghatározása (DNPH-fehérje adduktok)

0,2 ml szerv-homogenizátumhoz (25%), 1,0 ml 0,1 M pH 7,2 foszfát puffert, 0,8 ml desztillált vizet és 2,0 ml 5 mM 2,4-DNPH 2 M sósavas oldatát adtuk. A keveréket sötétben tartva, 15 percenként vortexelve, egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután az elegyhez 2,0 ml 50 %-os triklór-ecetsavat adtunk, majd az elegyet további egy órán át sötétben, szobahőmérsékleten tartottuk. Ezt követően 15 percig 5000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, a felülúszót elválasztottuk és a maradékot 1,0 ml EtOH/EtOAc (1:1) keverékkel elegyítettük. A mintát vortexeltük, 15 percig centrifugáltuk (5000 fordulat/perc), a felülúszót elválasztottuk. Ezt a mosási lépést háromszor megismételtük, és a végső maradékot 1.0 ml 8 M guanidin-hidroklorid oldatban oldottuk. Miután a minta teljesen feloldódott, az oldat 0,1 ml-ét 0,9 ml 8 M guanidin-hidroklorid oldattal hígítottunk. Az abszorbanciát Jasco® V-750 UV-spektrofotométeren, 375 nm hullámhosszon, 8 M guanidin-hidroklorid oldattal szemben mértük.

3.5. A dién konjugátumok UV-Vis meghatározása

1,0 ml szerv-homogenizátumhoz (25%) egy csiszolt dugós Erlenmeyer-lombikban 20 ml kloroform:metanol (2:1 v/v) elegyet adtunk. Az elegyet mechanikus rázás közben 20 percig vízfürdőben (50 °C) inkubáltuk. Ezt követően 10 ml kloroform:metanol (2:1 v/v) keverékkel és 5 ml desztillált vízzel választótölcsérbe mostuk. A keveréket 20 percig állni hagytuk, majd az alsó fázist egy Erlenmeyer-lombikba szűrtük és vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk. Az extraktumot egy kitárált gömblombikba szűrtük, és rotációs bepárlóval (Heidolph Hei-VAP) 30°C-on (20 perc) elpárologtattuk. A bepárlás után a lombik tömegét megmértük, és a maradékot akkora térfogatú MeOH-ban oldottuk, hogy 1 mg/ml oldatot kapjunk. A kapott oldat abszorbanciáját UV-spektrofotométerrel (VWR® U-1600PC) 400-200 nm tartományban MeOH-val szemben mértük. Ezután az oldatot MeOH-val tízszeresére hígítottuk, és a mérést megismételtük.

3.6. A malondialdehid (MDA) UV-Vis meghatározása (TBARS-vizsgálat)

0,1 ml szerv-homogenizátumhoz (25%), jól lezárt, csiszolt üvegdugós kémcsőben 0,2 ml SDS-oldatot (8,1%) és 1,5 ml 20%-os ecetsavat (pH 3,5) adtunk. Ezt követően a keverékbe 1,5 ml 0,8%-os tiobarbitursav oldatot és 0,7 ml desztillált vizet pipettáztunk. A színreakció (TBARS) elérése érdekében az elegyet forró vízben (95°C) egy órán át inkubáltuk. A mintát jeges vízben lehűtöttük (5 perc), majd centrifugáltuk (5 perc, 3000 fordulat/perc). A tiszta felülúszó 1 ml-ének abszorbanciáját UV-spektrofotométerrel (Jasco® V-750) 532 nm hullámhosszon desztillált vízzel szemben mértük.

3.7. Nem fehérje tiolok (NPSH) UV-Vis meghatározása

1,0 ml szerv-homogenizátumhoz (25%), 0,25 ml BHT-oldatot (50 mg/ml, MeOH-ban) és 0,25 ml triklórecetsavat (25%) adtunk. Az elegyet vortexeltük, majd 5000 fordulat/perc fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk. Az elválasztott felülúszó 0,1 ml-ét 2,8 ml Trizma pufferrel (pH 8,9) elegyítettük. Az oldathoz 0,1 ml Ellman-reagenst (DTNB) (0,01 M, MeOH-ban) adtunk és a mintát 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az oldat 1 ml-ének abszorbanciáját UV-spektrofotométerrel (Jasco® V-750) 412 nm hullámhosszon vakpróbával szemben mértük.

3.8. A tirozin izomerek HPLC-meghatározása

50 mg szerv-mintához 400 µl 6 N sósavat, 40 µl 500 mM metanolos BHT oldatot és 4 µl 400 mM deszferrioxamin oldatot adtunk. A mintát 1 percig vortexeltük, majd 120 °C-on 18 órán át hidrolizáltuk. Ezután az elegyet hagytuk lehűlni, majd 3000-es percenkénti fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A tiszta felülúszót fecskendőszűrőn (0,2 µm) szűrtük, majd HPLC-FLD módszerrel vizsgáltuk.

3.9. Ibuprofén (IBP)

3.9.1. Ibuprofén kísérletek *in vitro*

3.9.1.1. Fenton teszt

100 µL 30 mM koncentrációjú vas(II)-szulfát oldathoz (pH 3,0 kénsavban) 700 µl kénsavat (pH 3,0) adtunk és az elegyet 30 másodpercig vortexeltük. Ezután hozzáadtunk 100 µL, foszfátpufferrel (pH 7,2) készült, 10 mM IBP oldatot, majd a teljes

térfogatot 100 µL 10 mM hidrogén-peroxid hozzáadásával 1,0 ml-re egészítettük ki. Az elegyet vortexeltük, és 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük. A mintákat 0, 10, 60, 80 és 120 perc inkubálás után elemeztük. Az "vak" minták nem tartalmaztak IBP-t. Minden inkubációs periódus végén az elegyeket 20 µl 2 M kénsavval savanyítottuk és belső standardként 50 µL 10 mM szalicilsavat adtunk hozzá (végső koncentráció 0,467 mM). A mintákat vortexeltük, és kétszer 2 ml dietil-éterrel extraháltuk. Az egyesített éteres kivonatokat N_2 gáz segítségével bepároltuk. HPLC és HPLC-MS elemzés előtt a száraz maradékot 100 µl acetonitrilben oldottuk.

3.9.1.2. Udenfriend teszt

Egy kémcsőbe a felsorolás sorrendjében 3,0 ml desztillált vizet, 4,0 ml 2,5 mM 0,1 M foszfátpufferben (pH 7,2) oldott IBP oldatot, 1,0 ml 10 mM aszkorbinsavat, 1,0 ml 2,4 mM EDTA oldatot és 1,0 ml 2,0 ml $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ oldatot mértünk. Az elegyet az egyes komponensek hozzáadása után vortexeltük, majd óvatosan mechanikus rázással, 37 °C-os vízfürdőben 2 órán át inkubáltuk. Az inkubátumból 0, 10, 60, 80 és 120 perc időpontokban 1,0 ml-es mintákat vettünk, melyekhez 1 ml 0,4 M jéghideg perklórsavat és 100 µL 10 mM szalicilsavat (belső standardként) adtunk (végső koncentráció 0,476 mM). A savas oldatot jeges vízben lehűtöttük, és kétszer 3,0 ml dietil-éterrel extraháltuk. Az egyesített éteres extraktumokat N_2 gáz segítségével bepároltuk. HPLC és HPLC-MS elemzés előtt a száraz maradékot 100 µl acetonitrilben oldottuk.

3.9.2. Ibuprofén kísérletek *in vivo*

3.9.2.1. Vékonybél perfúzió

Hím Wistar patkányokat (9-11 hetes, 250-300 súlyú) két csoportra osztottunk. Az I. csoport volt a kontroll, a II. csoport pedig a hiperglikémiás állatok (n = 5 csoportonként) csoportja. A kísérletes hiperglikémiát a vékonybél perfúziós kísérletek megkezdése előtt egy héttel beadott sztreptozotocin (STZ) injekcióval indukáltuk (lásd 3.1. pont). A tápot a kísérletek előtti napon (16 órakor) megvontuk az állatoktól. Az állatokat intraperitoneális uretán injekcióval (1,2 g/testtömeg kilogramm) érzéstelenítettük. A hasat egy középvonali bemetszéssel megnyitottuk, a kiválasztott szerveket összegyűjtöttük. A jejunális hurkot (a jejunális hurok hossza kb. 10 cm) "*in vivo*" izoláltuk és mind a proximális és disztális végeken kannuláltuk. A

testhőmérsékletet infralámpával 37 °C-on tartottuk. A jejunális hurok lumenén keresztül 250 µM ibuprofént tartalmazó izotóniás oldatot recirkulációs üzemmódban 13 ml/perc sebességgel perfundáltunk. Meghatározott időpontokban (15, 30, 45, 60, 75 és 90 perc) a perfundált oldatból 250 µL térfogatú mintákat vettünk. A perfuzátum kezdeti térfogata 15,0 ml volt; hőmérsékletét 37 °C-on termosztáltuk. Az epekiválasztás párhuzamos vizsgálatához az epevezetéket PE-10 csövekkel kannuláltuk. Az kiáramló epét 15 perces időközönként jégbe helyezett, Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Az összegyűjtött mintákat az elemzés időpontjáig mélyhűtőben (-70 ºC) tároltuk.

3.9.2.2. A minta előkészítése

0,1 ml perfúziós mintához, vagy 50 µl epe mintához 20 µl 2 M kénsavat és 10 µl 10 mM szalicilsavat (belső standardként) adtunk. (A szalicilsav végső koncentrációja a perfúzióban és az epemintákban 0,77 mM, illetve 1,25 mM volt). Ezután a mintákat vortexeltük, és kétszer 0,5 ml dietil-éterrel extraháltuk. A vortexelés (30 mp) és a centrifugálás (5 perc, 5000 fordulat/perc) után az éteres fázisokat elválasztottuk, és az egyesített éteres extraktumokat N_2 gáz segítségével bepároltuk. HPLC és HPLC-MS elemzés előtt a száraz maradékot 100 µl acetonitrilben oldottuk.

3.9.3. Racém ibuprofén minták elemzése (3.9.1. és 3.9.2. pontok)

3.9.3.1. HPLC-UV

A Fenton és az Udenfriend minták HPLC-UV analízisét (I. módszer) egy kvaterner HPLC pumpával, gázmentesítővel, automata mintaadagolóval, termosztálható oszloptartó rekesszel és diódasoros detektorral felszerelt integrált Agilent 1100 HPLC rendszeren végeztük. Az adatokat Agilent ChemStation szoftver (Rev.B.03.02-SR2) alkalmazásával rögzítettük és értékeltük.

A perfúziós minták és epe kivonatok HPLC-UV analízisét (II. módszer) egy kvaterner HPLC pumpával, gázmentesítővel, automata mintaadagolóval, termosztálható oszloptartó rekesszel és PDA-detektorral felszerelt integrált Jasco HPLC (LC-4000) rendszeren végeztük. Az adatokat a ChromNAV Data System (Ver.2) alkalmazásával rögzítettük és értékeltük.

I. módszer Az analízist egy 40 ºC-on termosztált Teknokroma (ODS patron, 1 cm x 0,32 cm) előtét oszlop és egy Teknokroma

NUCLEOSIL C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) analitikai oszlop alkalmazásával végeztük. A mozgó fázis 0,02 M foszfátpuffer pH 2,5 (A) és acetonitril (B) elegyéből állt. Az áramlási sebesség 1,5 ml/perc volt. Az elemzéseket (220 nm-en történő detektálással) a következő gradiensprofil alkalmazásával végeztük: 20 % B 15 percig, majd 5 perces lineáris gradiens 60% B-ig, 4 perces izokratikus elúció, majd egy 2 perces lineáris gradiens 20% B-ig és 4 perces ekvilibráció. A befecskendezett térfogat 10 µL volt.

II. módszer. Az analízist egy 40 ºC-on termosztált Teknokroma (ODS patron, 1 cm x 0,32 cm) előtét oszlop és egy Zorbax SB C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5µm) alkalmazásával végeztük. A mozgó fázis 0,02 M foszforsav pH 2,5 (A) és acetonitril (B) elegyéből állt. Az áramlási sebesség 1,6 ml/perc volt. Az elemzéseket (220 nm-en történő detektálással) a következő gradiensprofil alkalmazásával végeztük: 20% B 5 percig, majd 0,5 perces lineáris gradiens 30% B-ig, 4,5 perces izokratikus elúció, majd 0,1 perces lineáris gradiens 60% B-ig, 4,9 perces izokratikus elúció, majd 0,1 perces lineáris gradiens 20 % B-ig, és 4,9 perces ekvilibráció. A befecskendezett térfogat 10 µL volt.

3.9.3.2. HPLC-MS

A metabolitok azonosításához egy Thermo Q Exactive Focus kvadrupól-Orbitrap hibrid tömegspektrométerhez (Thermo Scientific) kapcsolt Thermo Dionex UltiMate 3000 folyadékkromatográfiás rendszert (Dionex, Sunnyvale, USA) használtunk. Az adatgyűjtést és -elemzést Q Exactive Focus 2.1, Xcalibur 4.2. és FreeStyle 1.8 szoftverek (Thermo Scientific) segítségével végeztük. A HPLC elválasztást egy 40 ºC-on termosztált XTerra MS C18 (5 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) előtét oszlop és egy XTerra MS C18 oszlop (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) alkalmazásával végeztük. Az áramlási sebesség 0,4 ml/perc, az injektált minta térfogata 5 µl volt. A mozgófázis 5 mM ammónium-acetát/5 mM ecetsav vizes oldata (A) és metanol (B) elegyéből állt. Az elemzéseket a következő gradiensprofil alkalmazásával végeztük: 10 % B 1 percig, majd 9 perces lineáris gradiens 90 % B-ig, 2 perces izokratikus elúció, majd 0,5 perces lineáris gradiens 10 % B-ig, majd 2,5 perces ekvilibráció.

A vegyületek elemzését HESI negatív ionizációs üzemmódban végeztük a következő paraméterekkel: porlasztó feszültség 3 kV; ionforrás hőmérséklet 300 °C; kapilláris hőmérséklet

350 °C; porlasztó és segéd N_2 gázáramok nyomása 20 és 5, tetszőleges egység; S-Lens RF szint 50 %; automatikus erősítés vezérlés 1e6. Felbontás 70000 (200 *m/z*). Adatgyűjtési tartomány *m/z* 100-1000, teljes szkennelési módban.

3.9.4. Királis elemzés

3.9.4.1. A minta előkészítése

Az állatkísérlet és a vékonybél perfúzió részletei megegyeztek a 3.9.2. szakaszban leírtakkal. A mélyhűtőben tárolt perfúziós és epemintákat megolvadásig szobahőmérsékleten tartottuk. A kivett mintát (50 µL) egy Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 10 µl naproxén-nátrium oldatot (250 µM) adtunk hozzá belső standardként. Az elegyet 40 µl sósavval (2 M) savanyítottuk, és 3-szor 0,5 ml *n*-hexán:etil acetát (8:2 v/v) elegyével extraháltuk. Az elegyet 30 másodpercig vortexeltük, 5 percig 3500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd a tiszta felső réteget elválasztottuk. Az egyesített extraktumokat N_2 gáz segítségével 40 ^{o}C-on bepároltuk. HPLC és elemzés előtt a száraz maradékot 50 µl mozgó fázisban oldottuk.

3.9.4.2. HPLC-UV analízis

A perfúziós és epeminták HPLC-UV analízisét egy kvaterner HPLC pumpával, gázmentesítővel, automata mintaadagolóval, termosztálható oszloptartó rekesszel és PDA detektorral felszerelt integrált Jasco HPLC (LC-4000) rendszeren végeztük. Az adatokat a ChromNAV Data System (Ver.2) szoftver segítségével rögzítettük és értékeltük.

Az ibuprofén enantiomerek analízisét Teknokroma (ODS patron, 1 cm x 0,32 cm) előtét oszlop és Kromasil 3-amylCoat RP (4,6 mm x 150 mm, 3 µm) királis analitikai oszlop alkalmazásával végeztük. A mozgó fázis metanol/víz/ecetsav (70/30/0,1) elegyéből állt. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt. Az oszloptartó rekesz hőmérsékletét 22 °C-on termosztáltuk. A detektálás 220 nm hullámhosszon történt, a befecskendezett térfogat 10 µL volt. Az analitikai módszer a Kromasil alkalmazási leírásán alapult. Az elválasztott csúcsok azonosítása az (*S*)-(+)-ibuprofén retenciós idejének meghatározásával történt.

3.9.4.3. HPLC-UV analízis – Validálási adatok

Az analitikai módszert számos validálási paraméter (specificitás, rendszer alkalmasság, pontosság, ismételhetőség és

intermedier pontosság, kimutatási határ, mennyiségi meghatározási határ és kalibrációs tartomány) meghatározásával jellemeztük. A mennyiségi határt (LOQ) a recém ibuprofén alkalmazásával meghatározott kalibrációs görbe legalacsonyabb koncentrációjának (50 μM) tekintettük. A vizsgált mintában lévő két enantiomer pontos koncentrációját figyelembe véve (*R*-IBP: 49,81%; *S*-IBP: 50,019%), az *R*-IBP LOQ értéke 24,91 μM, az *S*-IBP LOQ értéke 25,09 μM volt.

4. Eredmények

4.1. Kiválasztott endogén vegyületek oxidatív transzformációi STZ által kiváltott kísérleti hiperglikémia hatására

4.1.1. Fehérjetartalom meghatározása

Az eredmények azt mutatták, hogy minden vizsgált szerv fehérjetartalmát befolyásolja a hiperglikémiás állapotok. A vékonybél fehérjetartalma minden csoportban csökkent, hasonló értékeket mutatva a négyhetes időszak alatt. A vesében az értékeket folyamatosan csökkentek. A máj fehérjetartalma mutatta a legkisebb csökkenést; a kéthetes STZ-kezelt mintáknak volt a legalacsonyabb az értéke.

4.1.2. Fehérje karbonil-tartalom (Prot-DNPH) meghatározása

Az oxidált fehérjék karbonil-tartalmát a 2,4-dinitrofenilhidrazinnal (DNPH) történő származékképzéssel határoztuk meg. Az STZ-vel kezelt minták fehérje-DNPH-tartalma az egyes szövet homogenizátumok kontrolljaihoz képest egyértelműen folyamatos növekedést mutatott. Minden kéthetes STZ-vel kezelt szerv Prot-DNPH szintje jelentősen különbözött a kontrolltól. A négyhetes STZ-vel kezelt májminták Prot-DNPH szintje csökkent. A vesében a fehérje karbonil-tartalma mérsékelt, folyamatos növekedést mutatott a négy hét alatt.

4.1.3. A dién-konjugátumok meghatározása

A májban a konjugált diének szint minden időpontban kissé megemelkedett a hiperglikémiás patkányokban. A vékonybélben a konjugált dién szint minden időpontban jelentősen nőtt. A relatív növekedés azonban, különösen a kéthetes és a négyhetes hiperglikémiás mintákban, sokkal magasabb volt, mint a májban. A vesében a konjugált diének szintje szignifikánsan magasabb volt a négyhetes STZ-vel kezelt mintákban. Az egyhetes és kéthetes STZ-

kezelés nem befolyásolta jelentősen a konjugált diének szintjét. A négyhetes minták statisztikailag magasabb értéket mutattak, mint a kontroll.

4.1.4. A TBARS meghatározása

Az MDA-t gyakran indikatív endogén metabolitként írják le, ami lipidek reaktív oxigén származékokkal történő oxidációjának eredményeként keletkezik. Ez egy reaktív karbonilvegyület, amely könnyen reagál a fehérjék és más celluláris makromolekulák nukleofil centrumaival. Ennek megfelelően az MDA vizsgálati eredmények az azoknak a lipid-peroxidoknak az egyensúlyi szintjét jelzik, amelyek a vizsgálati körülmények között MDA-vá alakulhatnak át. Eredményeink az MDA (TBARS) szint folyamatos enyhe növekedését mutatták minden szervben. A négyhetes STZ-vel kezelt vékonybél- és veseminták TBARS-szintje jelentősen eltért a kontrolltól.

4.1.5. A nem fehérjetartalmú tiolok (NPSH) meghatározása

A kísérleti állatok STZ-kezelése csökkentette a máj NPSH-szintjét az egyhetes és a négyhetes időpontokban. Ezzel szemben, a kéthetes STZ májmintáknak némileg megemelkedett az értéke a kontrollhoz képest. A vesében az NPSH-tartalom minden időpontban kis mértékben megemelkedett. A vékonybélben az STZ-vel kezelt minták NPSH-szintje minden időpontban nőtt a kontrollhoz képest. A legalacsonyabb értékeket a kéthetes STZ-vel kezelt mintákban lehetett mérni.

4.1.6. Hidroxilált fenilalanin származékok meghatározása

A fenilalanin (Phe) egy esszenciális aminosav, amely a *para*-tirozin (*p*-Tyr), a dioxifenilalanin (DOPA), a katekolaminok, a melanin és a pajzsmirigyhormonok fiziológiai prekurzora. Ezeken az enzim-katalizált reakciókon túlmenően, a Phe aromás gyűrűjének nukleofil jellege miatt, nem enzim-katalizált oxidációs folyamatok, pl. ROS támadás tárgya lehet. Ilyen reakciókban mindhárom hidroxil-szubsztituált Phe izomer (*p*-Tyr, *m*-Tyr és *o*-Tyr) képződik. Kísérleti körülményeink között a nem enzim-katalizált hidroxilezési reakciókban képződött *m*-Tyr és *o*-Tyr izomerek relatív mennyisége minden vizsgált szervben a két- és négyhetes időpontokban megnőtt.

4.2. Az ibuprofén nem enzim-katalizált (Fenton és Udenfriend) oxidációjának *in vitro* vizsgálata

4.2.1. Fenton teszt

A Fenton-kivonatok HPLC-UV analízise (I. módszer) 1-HO-IBP (**2**), 2-OH-IBP (**3**) és számos más termék képződését jelezte. A **2** és **3** szerkezetek igazolásához és más oxidációs termékek azonosításához elvégeztük az extraktumok tömegspektrometriás detektálással kapcsolt HPLC (HPLC-MS) analízisét. Az extraktumok HPLC-MS vizsgálatai megerősítették a **2** (*m/z* 221,1176), **3** (*m/z* 221,1176) és a HOOC-IBP (**5**) (*m/z* 235,0969) jelenlétét. A legmagasabb HPLC-UV integrált csúcsterülettel (t_R =22,05 perc) rendelkező X-OH-IBP (**8**) származékot nem lehetett egyértelműen azonosítani. A képződött termék (X-OH-IBP) tömege *m/z* 221,1175 és fragmentációja nem tesz különbséget a 2'-OH-IBP és az OH(Ar)-IBP szerkezetek között. Egy másik, IBP-ből származó, HPLC-UV csúcsot (t_R=21,09 perc) dihidroxiibuprofén (**10**) (OH-IBP-OH) származékként azonosítottunk (*m/z* 237,1125). A pontos struktúrák meghatározása további vizsgálatot igényel.

4.2.2. Udenfriend-teszt

Az Udenfriend és munkatársai által kifejlesztett *in vitro* nem enzim-katalizált hidroxilezési teszt alkalmazásával, az ibuprofén hasonló oxidatív metabolikus mintázata volt megfigyelhető. A Fenton-inkubációkhoz hasonlóan, itt is a 22,03 perc (**8**) és 21,07 perc (**10**) t_R-értékekkel rendelkező származékok rendelkeztek a legmagasabb HPLC-UV csúcsterületekkel. A minták HPLC-MS vizsgálatai megerősítették a **2**, **3**, **5, 8** és **10** származék jelenlétét.

4.3. Az ibuprofén fő oxidatív és konjugált metabolitjainak vizsgálata vékonybél-perfuzátumokban valamint kontroll- és hiperglikémiás patkányok epéjében

A kontroll és a hiperglikémiás állatok vékonybél-perfúziós mintái éteres extraktumainak HPLC-UV-analízise nem utalt sem hidroxi-, sem karboxiibuprofén metabolitokra. Az ibuprofén-β-D-glükuronidot (**6**) (m/z 381,1549) azonban HPLC-MS módszerrel azonosítani lehetett mind a kontroll, mind az STZ-vel kezelt állatok perfúziójában. Az epeminták éter-extraktumainak HPLC-UV analízise IBP (**1**), IBP-GLU (**6**) és 2-OH-IBP (**3**) jelenlétét mutatta. A HPLC-MS analízis megerősítette az **1** (m/z 205,1229), a **6** (m/z

381,1549) és a **3** (m/z 221,1178) jelenlétét mind a kontroll, mind a hiperglikémiás mintákban. A csúcsterületek az STZ-vel kezelt állatok epe mintáiban minden vizsgált időpontban alacsonyabbak voltak. Figyelembe véve a mért epefolyás értékeket, kiszámítottuk az IBP (**1**), az IBP-GLU (**6**) és a 2-HO-IBP (**3**) kumulatív kiválasztódásainak relatív mennyiségét. Az eredmény mindhárom vegyület epével történő kiválasztásának csökkenését mutatta az STZ-vel kezelt állatokban. Emellett számos más csúcs is megjelent a kivonatokban. A minták HPLC-MS analízise alapján ezek a csúcsok epesavak és konjugált epesav származékok voltak. Továbbá, az epeminták HPLC-MS analízise megerősítette egy hidroxilált ibuprofén (**9**) glükuronid konjugátumának (m/z=397,1501) (X-HO-IBP-GLU) és az ibuprofén (**7**) taurin konjugátumának (m/z=312,1274) (IBP-TAU) jelenlétét. A kiválasztott X-OH-IBP-GLU és IBP-TAU mennyisége csökkent a hiperglikémiás állatokban.

4.4. *Az R*(-) és *az S*(+)-ibuprofén arányának vizsgálata vékonybél-perfuzátumokban valamint kontroll- és hiperglikémiás patkányok epéjében

Az ibuprofén enantiomerek HPLC azonosítását *S*(+)-IBP standard alkalmazásával végeztük. Az R(-)- és az S(+)-ibuprofén kumulatív csúcsterületei a hiperglikémiás patkányok vékonybél perfuzátaiban csökkenést mutattak. Az (*S*) enantiomer relatív mennyisége a kontroll állatokban valamivel magasabb volt, de a különbség nem volt szignifikáns. Hasonló változás nem volt megfigyelhető a hiperglikémiás patkányok mintáiban. A racém ibuprofén vékonybél perfúziója során gyűjtött epemintákban csak az (*S*)-IBP enantiomer volt kimutatható. A kromatogramokon két ismeretlen csúcs is megjelent. Relatív retenciós idejük alapján egyik sem volt azonosítható a rendelkezésre álló standardok (IBP, 1-, 2-, 3-OH-IBP és IBP-GLU) alapján. A kiválasztott (*S*)-IBP mennyisége statisztikailag alacsonyabb volt a hiperglikémiás (STZ-kezelt) állatokban.

5. Összefoglalás

Jelen munka során a lipidek, fehérjék, nem fehérje tiolok (NPSH) és a fenilalanin (Phe) oxidatív átalakulását vizsgáltuk a májban, a vékonybélben és a vesében, kontrol és STZ-kezelt hiperglikémiás patkányokban. A méréseket az STZ-beadását követő

egy-, két- és négyhetes időpontokban végeztük. Az MDA, Prot-DNPH és az *o*-Tyr+*m*-Tyr szintek változásai hasonló mintát követtek: a legmagasabb értékeket az STZ kezelést követő második héten voltak megfigyelhetők. Az oxidatív stressz kompenzálása párhuzamosan zajlott a szervek NPSH-tartalmának változásával. A kompenzáció a legkevésbé hatékony a vesében, ahol a fenti három paraméter folyamatosan növekszik a vizsgálatok ideje alatt. Ennek megfelelően ez a szerv a legsebezhetőbb a hiperglikémia által kiváltott oxidatív stresszre.

Az eredmények azt mutatják, hogy a hidroxilgyökök (ROS) reakciói a Phe aromás gyűrűjével kevésbé preferált, mint az érzékeny aminosav/fehérje és lipid molekulákkal lejátszódó reakciói. Ez a megfigyelés lehet az egyik oka annak, hogy a jelen kísérleti körülmények között csak kevés adat került eddig publikálásra nem enzim-katalizált reakciókban keletkező oxidált aromás xenobiotikumok megnövekedett szintjéről. Az enzimek és a transzporterek aktivitásának megváltozása (többnyire csökkenése) (a fehérjék/lipidek oxidatív stressz által kiváltott károsodása) azonban jól dokumentált a szakirodalomban.

Eredményeink azt mutatják, hogy a nem enzim-katalizált oxidációs reakciókban (Fenton-teszt és Udenfriend-teszt) képződő egyik fő IBP-származék egy hidroxált IBP (**8**). Mivel sem a 2'-OH-IBP, sem az OH(Ar)-IBP (**8)** – a termék lehetséges szerkezetei – kialakulását korábban nem írták le CYP-katalizált reakciókban, e származék képződése az élő szervezetek oxidatív stressz szintjének egy biomarkereként használható.

A 4-nitrofenollal és a kapszaicinnel ellentétben - mindkettő fenolos származék - az ibuprofén glükuronsav konjugátuma csak nyomokban mutatható ki a vékonybél perfúziókban. Másrészt, az IBP (**1**), az IBP-GLU (**6**) és az IBP-TAU (**7**) epébe történő kiválasztása volt megfigyelhető. Specifikus, nem enzim-katalizált reakcióban képződő oxidációs terméket azonban nem lehetett kimutatni. Az eredmények összhangban vannak a korábbi kísérleti eredményekkel, amelyek azt mutatták, hogy a P-gp (MDR1), MRP2 és BCRP szerves anion transzporterek expressziója csökkent az STZ-vel kezelt (hiperglikémiás) állatok májában. Az ilyen változások befolyásolják a hiperglikémiás egyénekben beadott gyógyszerek farmakokinetikáját.

A királis oszloppal végzett kromatográfiás vizsgálatok kísérleti adatokat szolgáltattattak az IBP enantiomerek intesztinális

eliminációjáról és epébe történő kiválasztásáról kontrol és hiperglikémiás kísérleti állatokban. Az eredmények azt mutatták, hogy az IBP eliminációja a vékonybélből nem enantioszelektív. Az epe vizsgálata csak a farmakológiailag aktívabb (*S*)-IBP enantiomer jelenlétét mutatta ki. Mivel az (*S*)-IBP farmakológiai aktivitása egy nagyságrenddel nagyobb, mint az (*R*)-IBP hatása, az enantiomerek aszimmetrikus megjelenése az epében meghatározhatja a gyógyszer farmakokinetikai és farmakodinámiás hatását.

6. Publikációk és poszter bemutatások

A dolgozat tárgyához kapcsolódó publikációk száma: 4
A dolgozat tárgyához nem kapcsolódó publikációk száma: 3
A témához kapcsolódó szóbeli előadások és poszter bemutatások száma: 3
A Ph.D. disszertáció témájához kapcsolódó publikációk impakt faktorainak összege: 4.927.

A Ph.D. értekezés témájához kapcsolódó publikációk:

- Perjési, P. Perez, C. Napolitano, H. **Mohammed, HO**. 2019. Physiochemical Characterization of Glutathione (GSH). In: Perjési, P. (ed.) Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications. New York: Nova Science Publisher. pp 3-53.
- **Mohammed, HO**. Almási, A. Molnár, S. Perjési, P. The intestinal and biliary metabolites of ibuprofen in the rat with experimental hyperglycemia. Molecules. 27 (13), 4000 (2022). doi: 10.3390/molecules27134000.
- **Mohammed, HO**. Almási, A. Perjési, P. Effect of experimental hyperglycemia on intestinal elimination and biliary excretion of ibuprofen enantiomers in hyperglycemic rats. (Submitted, under review).
- **Mohammed, HO**. Almási, A. Kun, Sz., Wittmann I., Perjési, P. Study on oxidative transformations of endogenous lipids, proteins, and amino acids in hyperglycemic rats. Preference of oxidation of non-aromatic sites. (Submitted, under review).

A Ph.D. dolgozat tárgyához nem kapcsolódó publikációk

- Ali, KN. Marif, HF. Kakarash, NA. **Mohammed, HO**. Liverfluke Coprological Cross-Sectional Survey in Cattle, Sheep and Goats in Sharazur District Kurdistan-Iraq. Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences 14 (1), (2021).

- Hardi FM, Rashid ZM, **Mohammed HO**, Dyary HO. Resistance of Fasciola hepatica to triclabendazole, closantel, and rafoxanide in a sheep farm in Sharazor district, Kurdistan-Iraq. Basrah Journal of Veterinary Research.18 (2), 16-26 **(**2019**).**
- Rahman HS, **Mohammed HO**, Fattah H, Othman HH, Amin KM and Abdullah R (2019). Phytochemical analysis and augmentation of pulmonary adenocarcinoma in BALB/c mice model treated with flaxseed oil. Front. Pharmacol. Conference Abstract: International Conference on Drug Discovery and Translational Medicine 2018 (ICDDTM '18) "Seizing Opportunities and Addressing Challenges of Precision Medicine." doi: 10.3389/conf.fphar.2018.63.00110. (Conference paper).

Szóbeli előadások és poszter bemutatások:

- **Mohammed, HO**. Almási, A. Molnár, S. Perjési, P. Oxidative transformations of lipids and ibuprofen in hyperglycemic rats. XVI Congress Pharmaceuticus Hungaricus (CPH 2020) at the University of Debrecen (2020). "Poster"
- **Mohammed, HO**. Almási, A. Molnár, S. Perjési, P. Oxidative transformations of lipids and ibuprofen in hyperglycemic rats. 9th Medical Conference for Ph.D. Students and Experts of Clinical Sciences (MEDPE CS2019) at the University of Pecs (2019). "Poster"
- **Mohammed, HO**. Almási, A. Molnár, S. Perjési, P. A study of the incidence of lipid peroxidation in liver and small intestine of hyperglycemic rats by HPLC, LC-MS, and UV-VIS analysis. 8th International Doctoral Conference (IDK 2019) at the University of Pecs (2019). "Oral presentation"

7. Köszönetnyilvánítás

Dicséret legyen Istennek, aki elkísért engem a mai napig, hogy befejezzem Ph.D. értekezésemet.

Mindenekelőtt szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Perjési Pálnak, az útmutatásaiért, a tanácsaiért, a támogatásáért és a tanulmányaim során tett erőfeszítéseiért, hogy munkám sikeres legyen.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Almási Attilának a támogatásáért és a segítségéért, különösen az állatkísérletekben. Ugyan csak szeretnék köszönetet mondani Molnár Szilárdnak a vizsgálatok során

nyert minták HPLC-MS módszerrel történő vizsgálatainak elvégzéséért és az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségéért.
Szeretnék köszönetet mondani Dr. Rozmer Zsuzsanna docensnek, a Gyógyszerkémiai Intézet vezetőjének, a folyamatos támogatásért. Külön köszönetem fejezem ki a Gyógyszerészi Kémiai Intézet minden munkatársának a támogatásukért, kedvességükért és a velem kialakított barátságukért.
Köszönöm a Tempus Közalapítvány "Stipendium Hungaricum Ösztöndíj program"-nak, hogy ösztöndíj odaítélésével lehetővé tette Ph.D. tanulmányaimat.
Köszönöm a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának, különösen Dr. Horváth Györgyi dékánhelyettesnek, hogy a „Ph.D. Plusz" ösztöndíj odaítélésével támogatta a Ph.D. tanulmányaim befejezését.
Köszönöm az iraki Kurdisztáni Régió Felsőoktatási és Tudományos Kutatási Minisztériumának és a Szulimani Egyetem Állatorvostudományi Karának a támogatást és a lehetőséget, hogy külföldön Ph.D. tanulmányokat folytathassak.
Nem lehetek elég hálás feleségemnek, "Banw"-nak és lányomnak, "Shanar"-nak, szeretetükért, támogatásukért és hogy mellettem álltak magyarországi tartózkodásom alatt.
Végezetül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, fivéreimnek és lánytestvéreimnek folyamatos támogatásukért.