

Kísérletes diabétesz hatása a paracetamol intesztinális eliminációjára

Tézisfüzet



Dr. Mészáros Petra

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Gyógyszerészi Kémiai Program

Témavezető: **Dr. Almási Attila**

Korábbi témavezetők: **Prof. Dr. Perjési Pál, Prof. Dr. Fischer Emil**

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

Doktori Iskola Vezető: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerészi Kémiai Intézet

Pécs, 2024

BEVEZETÉS

Vékonybél szerepe a xenobiotikumok eliminációjában

A vékonybél funkcionálisan alkalmas a tápanyagok, víz és különböző xenobiotikumok felvételére, metabolizmusára és exkréciójára. Orális gyógyszerbevétel esetén a gyógyszerek először a gyomor-bél traktusba, a *vena portae*-n keresztül a májba, majd a *vena hepatica*-n keresztül a hatás helyére jutnak vagy kiválasztódhatnak az epébe, illetve a bélbe, ahonnan ismét felszívódhatnak vagy eliminálódhatnak. Előbbi folyamatot nevezzük enterohepatikus körforgásnak. A folyamat során az adott xenobiotikum átalakulhat, csökkentve így egy adott gyógyszer orális biohasznosulását. Ugyan a májat tekintjük a fő metabolizáló szervnek, azonban a vékonybél felületét alkotó enterocitákban is számos fázis I., fázis II. enzim és transzporter expresszálódik. Az expresszálódó enzimcsaládok közül a legfontosabbak: citokróm P450, UDP-glükuronil-transzferáz, szulfotranszferáz, glutation-S-transzferáz, acetiltranszferáz, valamint különböző peptidázok is expresszálódnak. Transzporterek szempontjából az enterociták apikális (béllumen felőli) oldalán expresszálódó P-gp, BCPR, és az MRP2 transzporterek vesznek részt az enterocitákban keletkező vagy a véráram útján odajutó metabolitok vékonybélbe történő exkréciójában.

Paracetamol

Az általunk vizsgált paracetamol egy mérsékelten vízdékony gyenge sav ($pK_a = 9,3-9,7$), passzív diffúzióval szívódik fel a vékonybélből - leginkább a duodenumból és a jejunumból. A felszívódott paracetamol hepatikusan és extrahepatikusan is metabolizálódik. Legnagyobb részben kapcsolódik UDP-glükuronsavval és paracetamol β -D-glükuronid keletkezik (50-70%). Kisebb részben (25-35%) szulfatálódik 3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát (PAPS) segítségével, amely reakció a szulfotranszferáz enzimcsalád által katalizált reakció. A paracetamol metabolizmusának másik lehetséges iránya (5-15%) a CYP 450 enzimek által katalizált oxidatív átalakulás, amely során reaktív N-acetil-para-benzokinon-imin (NAPQI) képződik. Kimutatták, hogy a CYP enzimek mellett a paracetamol oxidációjában peroxidázok, például COX enzim is részt vesz. Amennyiben elegendő mennyiségű glutation van jelen a szervezetben, a NAPQI a glutationnal való konjugációja során detoxikálódik. A glutation-konjugátum a vesébe kerül és degradálódik cisztein-konjugátummá a γ -glutamil-transzferáz (γ GT) és a ciszteinil-glicin-dipeptidáz enzimek segítségével. Ezt követően acetilálódik az N-acetil-transzferáz enzim (NAT) által és a vizelettel ürül.

A vesében keletkezett paracetamol-cisztein-konjugátum visszaszívódhat a vese tubuláris lumenéből a keringésbe, eljuthat a májba, ahol egy részét az N-acetil-transzferáz acetilálja, így paracetamol-merkapturát keletkezik. Az így keletkező két metabolit az epébe választódik ki és így a bélbe jut, de visszakerülhet a keringésbe, bekerülhet a vesébe, így a vizelettel ürülhet ki. A γ GT és a dipeptidázok (DP) az epevezetékben és a béllumenben is előfordulnak, így a cisztein-konjugátum ezeken a helyeken is kialakulhat.

Kísérletes diabétesz és az oxidatív stressz

Számos faktor befolyásolhatja a gyógyszervegyületek metabolizmusát, például a vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai vagy a szervezet patológiás állapota (hormonális tényezők, diabétesz mellitusz). A diabétesz mellitusz olyan endokrin anyagcserezavar, amely a világ lakosságának jelentős hányadát érinti és napjainkban egyre növekvő tendenciát mutat. A diabétesz fő jellemzője a hiperglikémia és a glükózuria, amit az inzulin szekréciójának hiánya vagy károsodása és a sejtek csökkent érzékenysége okoz. Ezen felül egyéb élettani és metabolikus funkciók is megváltoznak, amelyekben a szénhidrát-, a fehérje- és a zsírsanyagcsere is érintett, valamint változik a xenobiotikumok farmakokinetikája és farmakodinámiája is.

A diabétesz kutatásában a számos in vitro módszer ellenére a rágszálómodellek alkalmazása a legelterjedtebb kísérleti módszer. Doktori munkám során a kísérletes diabétesz kémiai indukálva, streptozotocin (STZ) alkalmazásával lett kiváltva. A streptozotocin glükózamin nitrózurea típusú antibiotikum, amely szelektíven a hasnyálmirigy β -sejtjeinek pusztulását okozza, amely tulajdonsága alkalmassá teszi különböző kezelési protokollok alkalmazásával kísérletes diabétesz más-más formáinak kiváltására.

Kóros állapotok, például az elhúzódó hiperglikémia és a kialakuló diabétesz mellitusz befolyásolhatják a xenobiotikumok anyagcseréjét és képesek a reaktív oxigéngyökök (ROS) és ezáltal a szabad gyökök szintjének emelkedését okozni, amely oxidatív stresszhez vezet. Ezek a reaktív oxigéngyökök, szabad gyökök és endogén vegyületek a glutationnal való konjugációval is eliminálódnak, ami spontán és enzimatikusan is előfordulhat a glutation-S-transzferáz enzim által, hozzájárulva a glutation és a sejtekben lévő cisztein-szint csökkenéséhez, tovább gyengítve a szervezet védekező antioxidáns rendszerét. Az oxidatív stressz pedig jelentős szerepet játszik a diabétesz mellitusz mindkét típusának és a kapcsolódó mikro- és makrovaszkuláris szövődmenyeknek, mint például a retinopátiának, a nefropátiának, a neuropátiának és az endothel diszfunkcióknak a kialakulásában.

CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munkám célja a paracetamol metabolizmusának és exkréciójának vizsgálata a vékonybélben kontroll és diabéteszes állatokon. A vékonybél metabolizmusban betöltött szerepére különösen patológiás állapotokban, esetünkben diabéteszben, kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Ezért fontosnak tartjuk azokat a vizsgálatokat, amelyek a betegség hatására vonatkoznak a xenobiotikumok megváltozott biotranszformációjával kapcsolatban.

Összefoglalva, az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Fordított fázisú HPLC UV-Vis analitikai módszer fejlesztése a paracetamol és metabolitjainak azonosítására és mennyiségi meghatározására patkány vékonybél-perfuzátumban.
2. A vékonybél first-pass effektusban betöltött szerepének, valamint a vékonybél falon keresztül történő abszorpció kapacitásának vizsgálata *in vivo* állatkísérletekben 250 és 500 μ M paracetamol intesztinális perfúzió során.
3. A kísérletes diabétesz hatásának vizsgálata a vékonybél abszorpciós és eliminációs tevékenységére *in vivo* állatkísérletekben.
4. Paracetamol metabolizmusában résztvevő enzimek (CYP3A4, CYP2E1, COX) aktivitásának meghatározása kontroll és kísérletes diabéteszes patkány vékonybél-homogenizátumban.
5. Oxidált és redukált glutation, valamint cisztein mennyiségének meghatározása kontroll és kísérletes diabéteszes vékonybél-homogenizátumban fordított fázisú HPLC UV-Vis módszerrel.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Kísérleti elrendezés

Az állatkísérleteinket 240-300 g súlyú, hím Wistar patkányokon (Toxi-Coop Zrt, Budapest) végeztük. Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt uretánnal (izotóniás sóoldatban oldva) narkotizáltuk (1,2 g/kg, i.p.). A hasfalat a középvonal mentén felnyitottuk, majd a jejunális szegmentum kb. 10 cm hosszú szakasza lett kanülálva. A vékonybél metabolizmusban betöltött szerepének vizsgálata érdekében az epevezeték is kanülálásra került. Ezt követően a vékonybél kanülált szakasza 37 °C-ra melegített izotóniás sóoldattal lett átöblítve, hogy megtisztítsuk a táplálék maradványoktól. Az izotóniás oldat maradékát 4-5 ml levegő befúvásával távolítottuk el.

A behelyezett kanülökön keresztül, recirkulációs módszert alkalmazva, a béllumenen átáramoltattuk az izotóniás perfúziós oldatot, ami 250 μM , illetve 500 μM paracetamolt tartalmazott. Az oldat áramlási sebessége 12 ml/perc volt. A kezdeti perfúziós volumen 16,5 ml, a vizsgálat időtartama 90 perc volt. Az izolált bélszakaszból kiáramló perfúziós médiumból meghatározott időpontokban 250 μl mintát gyűjtöttünk. A kísérlet alatt biztosítottuk a normál élettani funkcióhoz szükséges körülményeket, az állatok és a perfúziós médium hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Csoportonként 5 állatot vizsgáltunk.

A kísérletes diabéteszt 0,1 M citrát pufferben (pH 4,0) frissen oldott STZ 65 mg/kg i.v. beadásával váltottuk ki. A kísérleteket az STZ-vel kezelt csoportban a beadását követő 7. napon végeztük, 12 órás éheztetést követően. A vércukorszintet, illetve a hiperglikémia (>20 mmol/l patkányban) kialakulását Accu-Chek® (Roche) digitális vércukorszintmérővel ellenőriztük.

A kísérlet befejeztével az állatokat túlaltattuk uretánnal és további vizsgálatok elvégzése céljából egyes szerveket eltávolítottuk (máj, vese, vékonybél). A mintákat ezután ultramélyhűtőben (-70 °C) tároltuk.

Az állatkísérleteket a 40/2013. (II. 14.) számú kormányrendeletben leírtak betartásával, a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottság által kiadott engedélyek (BA02/2000-10/2016 és BAI/35/51-61/2019) alapján végeztük.

Módszerfejlesztés paracetamolt tartalmazó vékonybél-perfuzátum HPLC UV-Vis vizsgálatára

A paracetamol és képződött metabolitjainak kromatográfiás elválasztása és mennyiségi meghatározása Agilent 1100 Series HPLC készülékkel történt. Az analitikai vizsgálat során PerfectSIL 120 ODS C18-as (4,6 mm $\times$ 100 mm, 5 μm) kromatográfiás oszlopot használtunk. Az elválasztás izokratikus elúciós módszerrel történt, a mozgófázis víz:acetonitril:triethyl-amin (92,95:7,00:0,05 v/v%) elegyből állt (pH 2,25, a pontos pH értéket HCOOH hozzáadásával állítottuk be). Az eluens áramlási sebessége 1 ml/perc volt. Az injektált minták térfogata 20 μl volt, a méréseket szobahőmérsékleten (21 ± 1 °C) végeztük. A detektálás hullámhossza 245 nm volt.

A paracetamol és a megjelenő metabolitok szerkezetének azonosítása Thermo Dionex UltiMate 3000 folyadékkromatográfiás rendszerrel történt, amely egy Thermo Q Exactive Focus kvadrupol-Orbitrap hibrid tömegspektrométerhez volt csatlakoztatva.

Enzimaktivitások meghatározása vékonybél-homogenizátumban

A paracetamol fázis I metabolizmusában öt citokróm P450 izoenzim játszik szerepet: CYP 1A2, 2E1, 2A6, 2D6 és 3A4 és a ciklooxygenáz-enzim (COX). Az öt CYP enzim közül többek között a CYP3A4 és a CYP2E1, továbbá a COX aktivitásának meghatározását tűztük ki célul kontroll és STZ-vel kezelt állatok esetében. Ehhez vékonybél-homogenizátumból készítettünk mikroszómákat, amelyeknek fehérjetartalmát biuret reagens segítségével UV-Vis spektroszkóppal határoztunk meg.

1. CYP3A4 enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Az előkészített mikroszómákat inkubáltuk eritromicin-esztolát oldattal, foszfát pufferrel és NADPH oldattal. Ezt követően Nash reagens hozzáadása után UV-Vis spektrofotométerrel 412 nm-en abszorbanciát mértünk. A mennyiségi meghatározáshoz kalibrációs egyenest készítettünk (100-1000 μM formaldehid, pufferben oldva). A CYP3A4 enzim aktivitását μmol formaldehid mennyiségben fejeztük ki, percenként 1 mg fehérjére vonatkoztatva. A kísérletet a CYP3A4 enzimgátló ketokonazol (10 μM) hozzáadásával is elvégeztük.

2. CYP2E1 enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Az előkészített mikroszómákat inkubáltuk 4-nitrofenollal és NADPH oldattal. A reakció acetone és 1 M sósav hozzáadásával lett leállítva. Ezt követően a minta 0,1 ml-hez belső standardként alkalmazott szalicilamid oldatot (10 μl , Krebs-Tris pufferben oldva) adtunk, sósavval megsavanyítottuk és dietil-éterrel elválasztottuk. Az éteres fázis bepárlása nitrogén gázzal történt, majd a bepárolt maradék a HPLC UV-Vis meghatározáshoz használt eluensben lett feloldva.

Az analitikai elválasztáshoz fordított fázisú Knauer C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) kromatográfiás oszlopot használtunk. Az elválasztás izokratikus elúciós módszerrel történt, a mozgófázis acetonitril:víz:jégecet (22:77:1 v/v%) összetételű elegyből állt, amelyhez 3,035 g/l trietil-amin lett hozzáadva (pH 3,0, H_3PO_4 -val lett beállítva). Az eluens áramlási sebessége 1 ml/perc volt. A méréseket 25 °C-on végeztük, a detektálás hullámhossza 250 nm volt. A CYP2E1 enzim aktivitását átalakult 4-nitrokatekol mennyiségben (nmol) fejeztük ki, percenként 1 mg fehérjére vonatkoztatva.

3. COX enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Az előkészített mikroszómákat inkubáltuk Tris-hidrogén-klorid pufferrel és N,N,N',N'-tetrametil-p-feniléndiaminnal (TMPD). Ezt követően UV-Vis spektrofotométerrel abszorbanciaváltozást regisztráltunk arachidonsav hozzáadása után.

A mennyiségi meghatározáshoz kalibrációs egyenest készítettünk (100-1000 μM TMPD, pufferben oldva). A COX enzim aktivitása μmol TMPD-ben lett kifejezve 30 másodpercenként 1 mg fehérjére vonatkoztatva.

Glutation és cisztein mennyiségének meghatározása vékonybél-homogenizátumban

A vékonybélben mért paracetamol metabolitokat figyelembe véve HPLC UV-Vis módszert kerestünk a cisztein és a glutation mennyiségének meghatározásához. A vizsgálat 4 különböző csoportba eső patkány vékonybélmintákból történt: paracetamol mentes kontroll-, paracetamol mentes STZ-vel kezelt-, 250 μM paracetamol perfundált kontroll-, 250 μM paracetamol perfundált STZ-vel kezelt minták. A meghatározás alapját a cisztein és a glutation 5,5'-ditiobisz-(2-nitro-benzoessavval) való reakció adta, amelyet mintaelőkészítés során adtunk a vékonybél mintákhoz.

Az előkészített minták elválasztása fordított fázisú Teknokroma NUCLEOSIL 100 C18 (4,6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) oszlop alkalmazásával, gradiens elúcióval történt. Az „A” eluens 10 mM KH_2PO_4 oldat volt (pH 6,0 KOH), a „B” eluens 40% „A” és 60% acetonitril volt. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt.

Az analízis 25 °C-on történt, a detektálás hullámhossza 330 nm volt. A cisztein és a glutation mennyiségét a homogenizáló közegben előállított standardokból (10-100 μM cisztein és 50-500 μM glutation) kalibrációs egyenes segítségével számítottuk.

Oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Az oxidált és a redukált glutation mennyiségének meghatározása 4 különböző csoportba eső patkány vékonybélmintákból történt: paracetamol mentes kontroll, paracetamol mentes STZ-vel kezelt, 500 μM paracetamol perfundált kontroll, 500 μM paracetamol perfundált STZ-vel kezelt minták.

A vékonybél mintákat homogenizáló oldattal elegyítettük (szacharóz, DL-ditiotreitol, Hepes-Tris), savval, majd lúggal történő kezelés és centrifugálást követően injektáltuk a mintákat.

Az analitikai elválasztáshoz fordított fázisú Kinetex Hypersil C18 (4,6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm) kromatográfiás oszlopot használtunk.

Az izokratikus elválasztás során az eluens 0,1% TFA oldat volt (pH 2,0, NaOH). Az eluens áramlási sebessége 1 ml/perc volt. A minták térfogata 10 µl volt, a mérések 25 °C-on történtek. A detektálás 215 nm-en történt.

SZÁMÍTÁSOK, STATISZTIKAI ANALÍZIS

A paracetamol és metabolitjainak koncentrációjának meghatározása módszervalidálást követően fordított fázisú HPLC UV-Vis módszerrel történt.

A kísérlet kezdetén a perfúziós 250 µM és 500 µM paracetamolt tartalmazó perfúziós médium kezdeti térfogata 16,5 ml volt, amely a 90 perces perfúzió időtartama alatt a mintavételek, valamint a vékonybél folyadékot felszívó és exkretáló tevékenysége közben változott. A perfúziós médium térfogata a kísérlet végén tizedes pontossággal meg lett határozva, így a két tényező figyelembevételével került kiszámításra az aktuális perfúziós térfogat egy adott időpillanatra vonatkozóan. A korrigált térfogat és a meghatározott koncentráció szorzatával lett kiszámolva az adott metabolit mennyisége. A kumulatív lúminális megjelenés a 90 perces teljes kísérleti időtartamra vonatkozó összesített metabolit mennyiségi adatokat jelenti.

Az enzimaktivitások meghatározásának módszerét a „Vizsgálati módszerek” című fejezetben írtam le. A homogenizátumok fehérjetartalmának meghatározása biuret reagens segítségével abszorbancia méréssel lett meghatározva 545 nm-en UV-Vis spektrofotométerrel. Ehhez előzetesen kalibrációs egyenest készítettünk ismert koncentrációjú BSA oldatok segítségével. Így az enzimaktivitásokat az átalakított szubsztrátok mennyiségében fejeztük ki 1 mg fehérjére és a CYP2E1, a CYP3A4 enzimek esetében 1 percre, míg a COX esetében fél percre vonatkoztatva.

A szignifikanciát a Student-féle egymintás t-próbával számítottuk ki, míg a redukált glutation szintjének meghatározása során kontroll és STZ előkezelt állatok, valamint különböző koncentrációjú paracetamol perfúzió esetén ANOVA tesztet végeztünk a különböző kísérleti csoportok közötti szignifikáns eltérések meghatározására.

EREDMÉNYEK

Módszerfejlesztés paracetamolt tartalmazó vékonybél-perfuzátum HPLC UV-Vis vizsgálatára

A vékonybél perfúziója során gyűjtött minták analízisére egy fordított fázisú HPLC UV-Vis kromatográfiás módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas volt a paracetamol és konjugációs metabolitjainak azonosítására és mennyiségi meghatározására. A kromatográfiás módszer validálásához a következő paramétereket vizsgáltuk: linearitás, szelektivitás, pontosság, a legkisebb kimutatható határ és a legkisebb mennyiségileg meghatározható értékek.

A linearitás vizsgálathoz ismert koncentrációjú paracetamol és metabolit oldatsorozatot készítettünk, ahol a vegyületeket a kontroll bélperfuzátumban oldottuk paracetamol esetén 10-100 μM , paracetamol β -D-glükuronid esetén 2-100 μM , míg a többi metabolitnál 2-10 μM koncentrációs tartományban.

Szelektivitás vizsgálata során a várt komponensek retenciók régiójában a kromatográfiás meghatározást – az alapvonalat – zavaró jel nem volt látható. A retenciók idők a következők voltak: az 1. csúcs a paracetamol β -D-glükuronid ($t_R=2,305$ perc), a 2. csúcs a paracetamol-cisztein ($t_R=2,776$ perc), a 3. csúcs paracetamol-szulfát ($t_R=3,904$ perc), a 4. csúcs paracetamol ($t_R=4,354$ perc), az 5. csúcs teofillin (belső standard) ($t_R=5,701$ perc), a 6. csúcs pedig paracetamol-merkapturát ($t_R=10,271$ perc) volt.

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

A legkisebb kimutatható értéket, $\text{LOD}= 3 \times \text{RMSE}/m$, valamint a legkisebb mennyiségileg meghatározható határt, $\text{LOQ}= 10 \times \text{RMSE}/m$ (ahol m a kalibrációs görbe meredeksége) képletek segítségével határoztuk meg. A koncentráció négyzetes hibájának (RMSE) számítása alapján a paracetamol kimutatási határa 10-100 μM koncentráció tartományban 5,84 μM . A paracetamol β -D-glükuronid kimutatási határa 2-10 μM koncentráció tartományban (minden további metabolitnál ezt az intervallumot használtuk) 0,61 μM , a paracetamol-szulfát kimutatási határa 0,29 μM , míg a paracetamol-ciszteinnél 0,35 μM , a paracetamol-merkapturátnál pedig 0,13 μM volt. A koncentráció négyzetes hibájának (RMSE) számítása alapján a paracetamol β -D-glükuronid mennyiségi meghatározhatósági határa 2-10 μM koncentráció tartományban (minden további metabolitnál ezt az intervallumot használtuk) 2,02 μM volt. A paracetamol-szulfát mennyiségi meghatározhatósági határa 0,96 μM volt, míg a paracetamol-cisztein esetében 1,17 μM , a paracetamol-merkapturátnál pedig 0,42 μM volt.

250 és 500 μ M paracetamol felszívódásának követése a vékonybél lumenből kontroll és kísérletes diabéteszes állatok esetében

A paracetamol mennyisége a keringetett bélperfúzáumban folyamatosan, egyenletesen csökken 250 és 500 μ M paracetamol perfúzió esetében is. A kontroll és az STZ-vel kezelt csoportok között nem észleltünk szignifikáns különbséget egyik koncentráció esetében sem. 250 μ M paracetamol perfúzió esetében a paracetamol felszívódásának sebessége konzekvensen kisebb volt a kontroll állatoknál, mint a kísérletes diabéteszben szenvedő állatcsoport esetében, míg 500 μ M paracetamol perfúziónál ez a tendencia megfordult.

250 és 500 μ M paracetamol metabolizmusának követése a vékonybél lumenben kontroll és kísérletes diabéteszes állatok esetében

A két különböző koncentrációban perfundált paracetamol a kísérleti idő intervallum alatt (90 perc) nagy mennyiségben metabolizálódott. A vékonybél lumenbe legnagyobb mennyiségben paracetamol β -D-glükuronid, kisebb mennyiségben paracetamol-szulfát, paracetamol-cisztein, paracetamol-merkapturát választódott ki. 250 μ M paracetamol perfúzió esetében a kísérletes diabéteszben szenvedő állatcsoport szignifikánsan nagyobb mennyiségű paracetamol β -D-glükuronidot, paracetamol-szulfátot és paracetamol-merkapturátot ürített, mint a kezeletlen állatcsoport. 500 μ M paracetamol perfúzió esetében az STZ-vel kezelt állatcsoport szignifikánsan nagyobb mennyiségű paracetamol β -D-glükuronidot, paracetamol-ciszteint és paracetamol-merkapturátot választott ki.

Enzimaktivitások meghatározása vékonybél-homogenizátumban

1. CYP3A4 enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

A paracetamol oxidatív metabolizmusában résztvevő CYP3A4 enzimaktivitását határoztam meg vékonybél-homogenizátumban paracetamol mentes kontroll és diabéteszes patkányokban. Pozitív kontrollként az CYP3A4 enziminhibitor ketokonazolt használtam.

A CYP3A4 aktivitása a vékonybél proximális szegmensében az enzim hatására a vékonybélben képződött oxidatív metabolit mennyiségében (μ mol) lett kifejezve, 1 mg proteinre és 1 percre vonatkoztatva. A CYP3A4 aktivitása szignifikánsan csökkent STZ-vel kiváltott diabéteszes patkányokban.

2. CYP2E1 enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

A paracetamol oxidatív metabolizmusában résztvevő másik enzim, a CYP2E1 enzimaktivitását határoztam meg vékonybél-homogenizátumban paracetamol mentes kontroll és diabéteszes patkányokban HPLC UV-Vis módszerrel.

A görbe alatti területek felhasználásával, kalibrációs egyenes segítségével meghatároztuk az átalakult szubsztrát mennyiségét és az enzim aktivitását: 4-nitrokatekol metabolit mennyiségében (nmol) kifejezve, 1 mg proteinre és 1 percre vonatkoztatva.

Az STZ-vel kezelt és a kontroll csoport CYP2E1 enzim aktivitása között nincs szignifikáns különbség.

3. COX enzimaktivitás meghatározása vékonybél-homogenizátumban

A COX aktivitását is meghatároztuk a vékonybél proximális szegmensében az enzim hatására a vékonybélben képződött oxidatív metabolit (TMPD) mennyiségében (μmol) kifejezve, 1 mg proteinre és fél percre vonatkoztatva. A COX aktivitása szignifikánsan nőtt STZ-vel kiváltott diabéteszes patkányokban. Ezek a minták olyan állatokból származnak, amelyek nem vettek részt a paracetamol perfúziós kísérletben.

Glutation és cisztein mennyiségének meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Paracetamol perfúzió nélkül a vékonybélben streptozotocinnal kezelt állatok esetében szignifikánsan kisebb volt a glutation és a cisztein koncentrációja is.

Paracetamol perfúzió ($250 \mu\text{M}$) esetében az STZ-vel kezelt csoportban a glutation koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt; a cisztein koncentrációja a kontroll és az STZ-vel kezelt csoportnál is szignifikáns eltérést mutatott az üres kontroll csoportéhoz viszonyítva. A paracetamol perfúziós kontroll eredményeket összehasonlítva a STZ-vel kezelt patkányok esetében, a glutation koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a ciszteinnél nem mutatkozott szignifikáns eltérés a két csoport között.

Oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása vékonybél-homogenizátumban

Streptozotocinnal történő előkezelés, valamint a paracetamol perfúzió ($500 \mu\text{M}$) nem mutatott ezzel a módszerrel szignifikáns eltérést a glutation mennyiségében vékonybél-homogenizátumokban.

Az oxidált glutation STZ előkezelt állatokban ($0,1539 \pm 0,06 \mu\text{M}$), valamint $500 \mu\text{M}$ paracetamol perfúzió és STZ előkezelés esetén ($0,6686 \pm 0,12 \mu\text{M}$) volt kimutatható. A két csoport között szignifikáns eltérés volt, tehát a paracetamol perfúzió tovább növelte az oxidált glutation szintet.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A paracetamol és metabolitjainak vékonybél-perfuzátumból történő meghatározására fejlesztett fordított fázisú HPLC UV-Vis analitikai módszer szelektív, pontos, gyors és egyidejű minőségi és mennyiségi meghatározást tesz lehetővé nagy számú biológiai minta mérése során.
2. A streptozotocinnal előidézett kísérletes diabétesz és a paracetamol perfúzió is hatással van a vékonybél permeabilitására, amely így jelentősen befolyásolja a paracetamol és metabolitjainak felszívódását és vékonybélumenbe való visszajutását.
3. $250 \mu\text{M}$ és $500 \mu\text{M}$ paracetamol perfúzió esetén a fejlesztett fordított fázisú HPLC módszerrel négy metabolitot lehetett azonosítani: paracetamol β -D-glükuronidot, paracetamol-szulfátot, paracetamol-ciszteint, és paracetamol-merkapturátot. Összességében elmondható, hogy streptozotocinnal előidézett kísérletes diabétesz növeli a vékonybélbe kiválasztott paracetamol metabolitok mennyiségét $250 \mu\text{M}$ és $500 \mu\text{M}$ paracetamol perfúzió esetében is: a paracetamol β -D-glükuronid és a paracetamol-merkapturát szignifikánsan növekedett mindkét alkalmazott paracetamol koncentráció esetében, a paracetamol-szulfát szignifikánsan $250 \mu\text{M}$, míg a paracetamol-cisztein $500 \mu\text{M}$ paracetamol perfúziót követően mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest.
4. A paracetamol metabolizmusában részvevő, doktori munkám során vizsgált enzimek esetében a kísérletes diabétesz a CYP3A4 esetében csökkenti, a COX enzim esetében növeli az enzimaktivitást, míg a CYP2E1 esetében nem volt kimutatható szignifikáns eltérés.
5. Az STZ előkezelés hatására fokozott oxidatív stressz lép fel a metabolizáló sejtekben, ami a xenobiotikum átalakulására is hatással van. Mind a kísérletes diabétesz, mind a paracetamol perfúzió jelentősen befolyásolja a szervezet exogén vegyületekkel szembeni védekezőképességét, tehát az oxidált és a redukált glutation, valamint a cisztein szintjét is.

KÖZLEMÉNYEK

Közlemények jegyzéke

1. **Mészáros P.**, Kovács S., Kulcsár Gy., Páskuj M., Almási A. (2022). Investigation of Intestinal Absorption and Excretion of Paracetamol in Streptozotocin-Induced Hyperglycemia. International Journal of Molecular Sciences. 23(19), 11913.
Impakt faktor (2022): 5,6
2. **Mészáros P.**, Kovács S., Almási A. (2024). Effect of Streptozotocin- provoked diabetes for the intestinal absorption and transformation of the increased dose of paracetamol. Journal of Endocrinology & Metabolism. 14(4), 174.183.
Impakt faktor (2024): 0,6

Előadások jegyzéke

1. **Mészáros P.**, Almási A., Fischer E., Perjési P. A vékonybél szerepének vizsgálata a paracetamol felszívódásában és metabolizmusában fizioiógiás és diabéteszes körülmények között (2021). XIV. Clauder Ottó Emlékverseny (2021). Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, Gyógyszeripari Szervezete és Gyógyszertechnológiai Szakosztálya, 2021. november 11-12.
2. **Mészáros P.**, Kovács S., Kulcsár Gy., Almási A. Diabétesz hatása a paracetamol felszívódására és metabolikus átalakulására a vékonybélben. (2022). Fialal Kutatók Fóruma, 2022. november 25., Budapest, MGYT székház.

Posztterek jegyzéke

1. **Mészáros P.**, Perjési P., Fischer E., Almási A. A paracetamol intesztinális felszívódásának és metabolizmusának vizsgálata fizioiógiás és patológiás körülmények között (2021). Gyógyszerkutatás, Innováció és Farmakokinetika Konferencia (Annual Congress of Pharmacology Research and Innovation), 2022. június 7-9.

2. **Mészáros P.**, Kovács S., Almási A. Investigation of paracetamol metabolism related enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced hyperglycemia in rat. (2023). Bali, C; Puskás, T; Kajos, L F; Horváth-Polgár, P I; Kovács, E (szerk.) MedPECS - Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science: Book of Abstracts, Pécs, Magyarország: University of Pécs, Doctoral Student Association (2023) 74 p. pp. 57-57., 1 p.
3. **Mészáros P.**, Kovács S., Kulcsár Gy., Almási A. Effect of Experimental Diabetes on the Intestinal Elimination of Paracetamol. (2024). Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság; EUFEPS - Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság; EUFEPS (szerk.) Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVII. and EUFEPS Annual Meeting 2024: Abstracts Budapest, Magyarország: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság (MGYT) (2024) 451 p. pp. 337-337., 1 p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom Dr. Almási Attilának, témavezetőmnek, aki a szakmai munkámban nyújtott segítsége mellett mosolyogva hallgatta minden nap a csiripelésem és mindent megtett azért, hogy sikeresen vegyem az előttem álló akadályokat.

Köszönöm Prof. Dr. Perjési Pálnak, hogy ötleteivel és tudásával segítette a munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Rozmer Zsuzsanna egyetemi docensnek, aki a Gyógyszerészi Kémiai Intézet vezetőjeként lehetőséget biztosított az Intézetben a tudományos munka végzésére.

Rendkívül hálás vagyok minden kollégámnak a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben, különösen az egyes iroda lakóinak: Fülöpné Dr. Kiss Editnek, Dr. Kovács-Rozmer Katalinnak és Dr. Harmath Lillának, akik mindig barátként álltak mellettem jóban-rosszban. Szeretnék még kitartásáért és barátságáért köszönetet mondani Dr. Tyukodi Leventének és Dr. Kulcsár Győzőnek, aki idejét nem sajnálva segített az azonosításokban és hasznos meglátásaival egyengette a PhD hallgatói mindennapjaim.

Végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom családomnak, páromnak és a barátaimnak azért a sok szeretetért és türelemért, amellyel mindvégig mellettem álltak és támogattak, eltűrték az összes nehéz pillanatom és velem örültek a boldog percekben.