

**A KÍSÉRLETES DIABÉTESZ HATÁSA A VÉKONYBÉL ÉS A MÁJ
ELIMINÁCIÓS TEVÉKENYSÉGÉRE**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Almási Attila
okleveles gyógyszerész

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és
Farmakoterápiai Intézet**
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Gyógyszerészi Kémiai Intézet

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Iskolavezető: Prof. Dr. Barthó Loránd
Programvezető: Prof. Dr. Fischer Emil

Témavezető:
Prof. Dr. Fischer Emil és Prof. Dr. Perjési Pál

Pécs, 2013.

1. Bevezetés – Célkitűzés

1.1. Bevezetés

A gyógyszerek a szájon keresztül történő bevételt követően először a gyomor –béltraktusba jutnak, majd a felszívódást követően a *vena portae* – n keresztül a májba kerülnek és csak ezek után érik el a szisztémás keringést, illetve a vérárammal a hatás helyét (különböző szervek, szövetek, receptorok, enzimek stb.). Ezen folyamatok során a gyógyszermolekulák kémiaiag átalakulhatnak (metabolizmus, biotranszformáció) és kiválasztódhatnak (exkréción) mind a bélben, mind a májban. A biológiai hasznosíthatóságot illetően tehát ezeknek a szerveknek döntő szerepük van. A bélnek mindenesetre az említett tényezőkhöz kívül különleges és kitüntetett szerepet biztosít az a tény, hogy a *per os* adott gyógyszermolekulák először a béltraktust érik el, a májba és a szisztémás keringésbe csak az alkalmazott dózisonak az a része juthat, amelyik a bélben nem metabolizálódik, illetve nem választódik ki a széklettel.

A xenobiotikumok biotranszformációjában különböző enzimreakciók (I. fázisú vagy funkcionálizáló, II. fázisú vagy konjugációs) vesznek részt. A fenolos típusú vegyületek jelentős részben a II. fázisú, tehát a konjugációs reakciókkal metabolizálódnak.

A glükuronidképzésben az UDP – glükuroniltranszferáz (UDPGT) vesz részt, a szulfátképződést pedig a szulfotranszferáz (SULT) katalizálja. A konjugátumokat bontó enzimek (β – glükuronidáz, arilszulfatáz) a metabolitok hidrolíziséért felelősek. Az említett enzimek mind a májban, mind a béltraktus nyálkahártyájában megtalálhatók.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatokban a *p* – nitrofenolt (PNP) alkalmaztuk modellvegyületként, mert ismert, hogy a PNP szinte kizárólag konjugációs reakciókkal alakul át: glükuronidáció révén PNP – glükuronidot (PNP – G), szulfatáció során pedig PNP – szulfátot (PNP – S) képez.

A máj- és vékonybélsejtekbe került vegyületeknek a sejtekből történő eltávolításában a multidrog rezisztens transzporterek (MDR), valamint a multidrog rezisztens proteinek (MRP) vesznek részt. A hepatocitákból a metabolizálódott vegyület a kanalikuláris membránon át az epébe és onnan a béltraktusba, míg az entrocitákból közvetlenül a béllumenbe kerül. A különböző transzporterek aktivitása, vagy annak a változása jelentős mértékben befolyásolhatja az exkréción mértékét.

A xenobiotikumok eliminációját számos tényező befolyásolhatja, pl. interakciók, a táplálékfelvétel zavarai, patológiás változások, betegségek, köztük például a diabétesz is.

Diabétesz során számos fontos változás következik be az anyagcsere és hormonális folyamatokban, eltérő lehet a különböző szervek és szövetek glükózfelvétele és felhasználása, változások következhetnek be a fehérjeszintézisben, az enzimek és transzportfehérjék mennyiségében és működésében is.

Tekintettel arra, hogy a diabéteszben a két legkarakterisztikusabb változás az inzulinhiány és a hiperglikémia, a diabéteszrel kapcsolatos vizsgálatok során gyakran kerül sor az inzulinhiány megszüntetésére, azaz inzulin adására. Különböző megfontolások alapján az inzulin adásának a stratégiája, illetve metodikája eltérő lehet. Egyik esetben például a kísérletes diabétesz teljes időtartama alatt folyamatosan történik az inzulin adása annak a vizsgálatára érdekében, hogy a diabétesz során lassan kifejlődő és tartósan fennálló hatásokat a folyamatosan adagolt inzulin tudja – e gátolni. A másik megközelítési módnál az inzulin egyszeri adásával annak elsősorban az akut hatásait kívánják vizsgálni.

1.2. Célkritizálás

Az értekezésben összefoglalt kísérletek alapvető célja a vékonybél és a máj eliminációs tevékenységének a vizsgálata volt kontroll állatokban és kísérletes diabéteszben. A vékonybéltre és a májra azért esett a választásunk, mert ez a két szerv az eliminációs folyamatokban általában is alapvetően fontos szerepet játszik, a xenobiotikumot metabolizáló és exkretáló funkciójuk pedig különleges jelentőségű a gyógyszerek *per os* adása esetén.

Kísérleteink során ezért elsősorban az intesztinális és a hepatikus exkrécióra és a II – es típusú biotranszformációs reakciókra koncentráltunk, ezek közül is a glükuronsavval és a szulfáttal történő konjugációt tanulmányoztuk.

Nem tisztázott az a kérdés, hogy milyen a kapcsolat, illetve hogy van – e direkt összefüggés az említett folyamatokat katalizáló enzimek aktivitása és az exkréciós folyamatok, illetve azok változása között. Ezért a kísérleteink során párhuzamosan vizsgálni kívántuk az enzimaktivitásokat a bélben és a májban, valamint az intesztinális és biliáris exkréciót, illetve ezek összefüggéseit először kontroll állatokban, majd kísérletes diabéteszben, illetve gyors hatású inzulin adása esetén. A kísérletes diabéteszt streptozotocinnal (STZ) hoztuk létre, a kísérleteket az STZ beadása után egy héttel végeztük.

Kísérletes diabéteszes állatoknál a xenobiotikumok eliminációjával kapcsolatban egyes szerzők változásokat, esetenként jelentős eltéréseket írtak le a biliáris exkréciót illetően. Az extrahepatikus metabolizmust, (pl. a bél eliminációs tevékenységét) kontroll állatoknál jóval kevésbé vizsgálták, még kevésbé ismert az intesztinális elimináció változása diabéteszben. Ezért a kísérleteinket ebbe az irányba is kiterjesztettük annak érdekében, hogy egyrészt össze

tudjuk hasonlítani a máj és a vékonybél eliminációs tevékenységét, másrészt azoknak a változását kísérletes diabéteszben.

Az inzulin hatásának a vizsgálatával az volt a célunk, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy képes-e az inzulin a diabéteszben létrejött változásokat az enzimaktivitásokat és az exkréciót illetően kompenzálni, hiszen a kísérletes diabéteszt az inzulinhiány hozza létre. Elsősorban az inzulin akut hatását kívántuk tanulmányozni, ezért gyors hatású inzulint adtunk az állatoknak egyszeri dózisban közvetlenül a bélperfúziós kísérletek előtt, az STZ beadását követő egy hét múlva.

Adekvát következtetések levonásának egyik alapvető feltétele a metabolitoknak a pontos, megbízható, reprodukálható, nagy számú minta esetén is viszonylag gyorsan elvégezhető meghatározása, esetünkben a PNP – G – nek és a PNP – S – nek a perfúziós folyadékból és az epéből származó mintákban történő analízise. Ezért a kísérleteink egy részében a PNP – nek és metabolitjainak a meghatározására a leginkább alkalmas HPLC mérési módszer kifejlesztését is célul tűztük ki.

Célkitűzéseinket röviden összefoglalva azt mondhatjuk, hogy vizsgálataink elsősorban az alábbi három kérdés tanulmányozására irányultak:

1. A PNP – nek és a metabolitjainak (PNP – G , PNP – S) a HPLC – vel történő mérése biológiai mintákban (bélperfuzátum, epe), a mérési módszer továbbfejlesztése;
2. A metabolikus enzimek aktivitása és a metabolitok intesztinális és hepatikus exkréciója közötti összefüggés vizsgálata kontroll állatokban;
3. A kísérletes diabétesz hatása a bél és a máj eliminációs tevékenységére.

2. Módszerek: anyagok, állatkísérletek, analitikai eljárások

Kísérleteink során olyan elrendezést, illetve módszert alkalmaztunk, amely nagymértékben megfelel a *per os* gyógyszerbevitelnek. Az *in vivo* izolált jejunális bélkacs keringését és kapcsolatát megtartotta a bélcsatornával, illetve a szervezettel. A vizsgálatokat 220-250 g – os hím patkányokon végeztük. Az állatokat uretánnal (1,2 g/kg i.p.) narkotizáltuk. A hasfalat a középvonalban hosszanti irányú metszéssel felnyitottuk és a duodenum utáni jejunális szegmentumot kb. 10 cm – es hosszban kanuláltuk *in vivo*. A béllument átöblítettük meleg (37°C – os) izotóniás oldattal a bélben lévő táplálék maradványok eltávolítása céljából, majd 4 – 5 ml levegő átfújásával üressé tettük. A béllument ezt követően az izolált szegmentum

mindkét végébe helyezett kanül, illetve a hozzájuk csatlakozó műanyagcső segítségével 13 ml/perc sebességű izotóniás médiummal perfundáltuk recirkulációs módszerrel, az oldat meghatározott koncentrációjú (általában 500 μM) PNP – t tartalmazott. Egyéb kísérleteinkben különböző koncentrációjú (20 – 1000 μM) PNP lüminális perfúziójára is sor került, jelen vizsgálataink során azért választottuk az 500 μM – os koncentrációt, mert ilyen kísérleti körülmények között tudtuk megbízhatóan analizálni és összehasonlítani a PNP metabolitjainak az intesztinális és biliáris eliminációját. Az izolált bélszakasz disztális végén kifolyó oldatot egy rezervoárba vezettük, amelyből egy perfúziós pumpa segítségével azt folyamatosan juttattuk vissza a bélumenbe. A kezdeti perfúziós volumen 15,0 ml volt, a perfúzió 90 percig tartott. A kanülált szegmentumból kifolyó perfúziós folyadékból 250 μl – es mennyiségű mintát vettünk különböző időpontokban. Az állatokat és a perfúziós folyadék hőmérsékletét 37°C – on tartottuk.

A biliáris exkréció vizsgálatához az epevezeték egy vékony műanyagcsővel (PE – 10) kanüláltuk és az epét folyamatosan, 15 perces időperiódusokban gyűjtöttük. A mintákat az analízis előtt hűtőszekrényben (– 20 °C) tartottuk.

A kísérletes diabéteszt STZ intravénás beadásával (65 mg/kg i.v.) hoztuk létre, a kísérleteket az STZ beadása után egy héttel végeztük. A gyors hatású inzulint (1 NE / kg i.v.) közvetlenül a kísérletek megkezdése előtt kapták az állatok.

A nagyszámú mintában lévő alapvegyület és konjugációs metabolitok mennyiségi meghatározására új HPLC módszer kifejlesztésére került sor. Az eltérő sav-bázis karakterrel rendelkező PNP ($\text{pK}_s = 7,19$), PNP – G ($\text{pK}_s \approx 3,0-3,4$), PNP – S ($\text{pK}_s \leq 4$) elválasztásához fordított fázisú HPLC oszlopot használtunk (Nucleosil 100, RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 10 μm)). A két savas karakterű metabolit retenciós idejét tetrabutil – ammónium – bromid ionpároképző alkalmazásával növeltük meg. A vékonybélperfúziókat analízisének eluensként 0,01 M tetrabutil – ammónium – bromid ionpároképzőt tartalmazó 50 : 50 (v/v/%) metanol : víz elegyet használtunk.

Az egy napon belüli, illetve a napok közötti mérési reprodukálhatóságot a retenciós idők értékeivel és a görbe alatti területek relatív standard deviációival (RSD) jellemeztük.

Az epeminták mérésekor belső standard (4 – etilfenol) és előtétoszlop alkalmazásra is sor került. Az epeminták komplex összetétele miatt az eluens is módosítottuk: az eluens 0,03 M tetrabutil – ammónium – bromidot tartalmazó 53:47 (v/v/%) metanol: 0,01 M citrátbuffer pH 6,2 volt.

Az UDPGT, a SULT, a β – glükuronidáz és az arilszulfatáz enzimek aktivitásának mérése egységnyi fehérjekoncentrációjú vékonybél- és májhomogenizátumból történt specifikus szubsztrát hozzáadását követően spektrofotometriás módszerrel.

A vércukorszintet Accu – Chek[®] digitális vércukor mérővel mértük.

3. Számítások, statisztikai analízis

Az értekezésben az adatok az átlagértékeket és a standard errorrt (S.E.) vagy a standard deviációt (S.D.) jelölik ($S.E. = \frac{S.D.}{\sqrt{n}}$). Az n a kísérletek vagy mérések számát jelenti.

A szignifikanciát az egymintás Student – féle t – teszttel számítottuk ki, a kontrolltól való szignifikáns eltérés jelölése: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Ha nem csak a kontrolltól való eltérést akartuk jelölni, mint pl. a diabéteszes állatoknál az inzulinnal kezelt és nem kezelt csoportok közti különbségek esetén, akkor más szimbólumot is használtunk: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, ezekben az esetekben kapoccsal jelöltük azokat az adatokat, amelyek közti különbségnek a szignifikanciáját kívántuk megadni.

4. Eredmények

4.1. A HPLC-vel történő mérési módszer kifejlesztése

A vékonybél perfúziója során a perfuzátumból nyert minták analízisére kidolgoztunk egy UV – detektálással összekapcsolt izokratikus ionpár képzésen alapuló, fordított fázisú HPLC (RP – HPLC) eljárást, amely alkalmas a PNP, PNP – G és a PNP – S egyidejű meghatározására. A vékonybél és a máj eliminációs tevékenységének a vizsgálata és összehasonlítása során a bélperfuzátumok mellett az epeminták vizsgálata is szükséges volt. Az epeminták analízise céljából módosítottuk a perfuzátumok mérésére optimalizált HPLC módszert, melynek során előtétoszlopot alkalmaztunk és ETP – t használtunk belső standardként az epemintákban lévő PNP, PNP – G és PNP – S detektálására és mennyiségi meghatározására. Az általunk kifejlesztett és módosított eljárások lehetővé teszik a PNP – nek és metabolitjainak precíz, megbízható és reprodukálható azonosítását és mennyiségi meghatározását nagyszámú biológiai minta esetén is.

Az optimalizált RP – HPLC módszert alkalmazva kb. 6 – 15 perces kromatográfiás időtartamon belül jól szeparálhatók az említett vegyületek, ez az időtartam rövidebb, mint a

korábban alkalmazott és mások által is használt eljárásokhoz szükséges 15 – 20 perces időperiódus.

4.2. A konjugációs reakciókban résztvevő enzimek aktivitása, valamint a metabolitok intesztinális és biliáris exkréciója kontroll állatokban

Kísérleti adataink szerint az UDP – glükuroniltranszferáz aktivitása 2,5 – 3 – szor magasabb volt a májban, mint a vékonybélben. A β – glükuronidáz aktivitás is magasabb volt a májban, sőt a különbség ebben az esetben mintegy hatszoros volt a bélhez viszonyítva. Ez az eredmény, legalábbis részben, magyarázhatja azt a megfigyelésünket, hogy a máj magasabb UDP – glükuroniltranszferáz aktivitása ellenére sem volt szignifikáns különbség a PNP – G – nek a bélumenben történő megjelenése és a biliáris szekréciója között.

A szulfátképzéssel kapcsolatos enzimeknek a bélben és a májban mért aktivitás némiképp hasonlóságot mutatott a glükuronidációnál említettekkel. A szulfotranszferáz aktivitása a májban kb. háromszor magasabb volt, mint a vékonybélben, a máj arilszulfatáz aktivitása pedig kb. hétszer nagyobb volt a bélben mért értékeknél. Ellentétben a PNP – glükuronid intesztinális és biliáris exkréciós értékével, a szulfát – konjugátum (PNP – S) epével történő kiválasztása konzekvensen és szignifikánsan magasabb volt, mint annak a megjelenése a perfundált bélkacsban. A különböző aktivitások összehasonlításakor érdemes felhívni a figyelmet arra is, hogy az UDP – glükuroniltranszferáz és β – glükuronidáz aktivitás lényegesen, mintegy két, illetve három nagyságrenddel magasabb volt mind a májban, mind a vékonybélben, mint a szulfát konjugátum mennyiségét meghatározó enzimeké (szulfotranszferáz, arilszulfatáz).

4.3. A vékonybél és a máj eliminációs tevékenységének a változása kísérletes diabéteszben

Kísérleteinkben vizsgáltuk a STZ beadását követően 1 hét múlva történtek, ez az időtartam a rövid lefolyású (short term) diabétesz kategóriába tartozik. A gyors hatású inzulin közvetlenül a vizsgálatok előtt kapták az állatok.

4.3.1. A kísérletes diabétesz hatása a vékonybél eliminációs tevékenységére

A PNP – G megjelenése a vékonybélben a PNP luminális perfúziója során magasabb volt a diabéteszes állatokban, mint a kontrollokban, ez a növekedés a hiperglikémiával mutatott párhuzamot és a magas vércukorszinthez hasonlóan teljes mértékben kompenzálható volt inzulinnal. Az UDP – glükuroniltranszferáz és β – glükuronidáz enzimek aktivitása fokozódott a kísérletes diabéteszben, ami hasonló irányú változás a PNP – G luminális megjelenésekor észlelt eltérésekhez. Azonban az enzimaktivitások növekedésében és mértékében eltérés van, nevezetesen a konjugátum szintéziséért felelős UDP – glükuroniltranszferáz aktivitása mintegy kétszeresére, a hidrolíziséért felelős β – glükuronidáz aktivitása kb. négyszeresére nőtt diabétesz hatására, amely már nincs összhangban a PNP – G nagyobb mértékű luminális megjelenésével. Az inzulin teljesen antagonizálta diabéteszben a PNP – G intesztinális exkréciójának a növekedését, de csak részlegesen kompenzálta az enzimaktivitások fokozódását.

A PNP – szulfát metabolitnak a vékonybélben történő megjelenése nem különbözött szignifikánsan a diabéteszes állatokban a kontrollokétól, de lényegében ugyanaz mondható el a szulfatációban résztvevő enzimekről (szulfotranszferáz, arilszulfatáz) is. A PNP – S – nél mért metabolikus enzimaktivitási adatok, valamint az intesztinális exkréciós értékek a PNP – G – nél észlelt változásoktól eltérően tehát nem módosultak diabétesz hatására. Az inzulin sem a PNP – S keletkezésében és hidrolízisében érintett enzimek aktivitását, sem a szulfát metabolit intesztinális exkrécióját nem befolyásolta a diabéteszes állatokban.

4.3.2. A kísérletes diabétesz hatása a máj eliminációs tevékenységére

A PNP – G biliáris exkréciója csökkent a diabéteszes állatokban a kontrollhoz viszonyítva. Ez a változás ellentétes a bél vizsgálatánál tapasztaltakkal. Érdekes, hogy az inzulin a két ellentétes irányú változást, azaz mind az epével történő kiválasztás csökkenését, mind a bélben létrehozott exkréció növekedést kompenzálni tudta. Az UDP – glükuroniltranszferáz és a β – glükuronidáz enzimek aktivitása a májban csökkent az STZ beadást követően, ezek a változások is ellentétes irányúak diabéteszben a bélnél észleltekkel. Az UDP – glükuroniltranszferáz aktivitásnak a diabétesz által létrehozott csökkenése inzulinnal antagonizálható volt, a β – glükuronidáz aktivitás csökkenését az inzulin nem befolyásolta számottevően.

A szulfát – konjugátum mennyiségét meghatározó enzimek (szulfotranszferáz, arilszulfatáz) aktivitása nem változott szignifikánsan kísérletes diabéteszben a májban, illetve az enzimaktivitások inzulin hatására sem módosultak. Csökkent azonban a diabéteszben a PNP – S biliáris exkréciója, amelyet az inzulin nem befolyásolt.

5. Megbeszélés – Konklúziók

A HPLC-vel kapcsolatos fejlesztő és módosító munkánk eredményeképpen elmondható, hogy az UV-spektrofotométerrel detektált, fordított fázisú oszlopon végzett izokratikus eljárás alkalmas a PNP, a PNP – G és a PNP – S egyidejű, megbízható és gyors meghatározására, mind az intesztinális perfúziós folyadékból, mind az epéből származó minták esetén.

A retenciós idők és a csúcsok alatti területek pontosság és a reprodukálhatóság szempontjából az elfogadható tartományba estek. A korábban leírt módszerekhez képest, a retenciós idők rövidültek, ami különösen a nagyszámú minta sorozatban történő mérésekor jelent számottevő előnyt.

A kontroll állatokon végzett kísérletek adatai arra utalnak, hogy a metabolitok lumenális megjelenésében és az epével történő kiválasztásában a metabolikus enzimek fontos, de nem kizárólagos szerepet játszanak és hogy számos egyéb faktor is befolyásolhatja ezeket a transzport folyamatokat (pl. a szubsztrát kínálat, a dózis, a membrán funkciók, stb).

A diabéteszrel kapcsolatos változások interpretációjánál és összehasonlításánál fontos lehet a kísérletes diabétesz időtartama. Hosszabb időtartamú (long term) diabéteszben változhat például a testtömeg, a máj tömege, a fehérjeszintézis, a megoszlási tér, illetve kompenzációs mechanizmusok is létrejöhetnek. Az inzulin adásánál is számos eltérés figyelhető meg, például alkalmaznak gyorshatású és tartóhatású inzulinkészítményeket, adhatnak inzulint különböző dózisokban és eltérő kezelési időtartammal.

A vékonybél eliminációs tevékenységével kapcsolatos vizsgálataink adataiból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kísérletes diabétesz különböző, viszonylag szelektív hatásokat képes kifejteni a xenobiotikumokat metabolizáló enzimek aktivitására, valamint a különböző vegyületeket transzportáló (exkretáló) folyamatokra. Jellegzetes változások elsősorban a glükóz anyagcseréjével összefüggő glükuronidációnál és az intesztinális glükuronid exkréciónál voltak megfigyelhetők. Kísérleteinkben különbséget találtunk egyrészt a glükuronidációban résztvevő enzimek aktivitásának és a PNP – G intesztinális exkréciójának a változása között, de jelentős eltérés volt a glükuronid- és a szulfátképzésben, illetve azok intesztinális megjelenésében is a diabéteszes állatokban.

Kísérleti adataink egyértelműen mutatják, hogy a kísérletes diabéteszben az eliminációt tekintve a vizsgált két szervben ellentétes irányú változások figyelhetők meg: a bélben növekedés, a májban a csökkenés a jellemző. Az inzulin érdekes módon mind a két szerv esetén kompenzáló hatást produkált. A biliáris exkrécióval kapcsolatos adatok azt mutatják, hogy a kísérletes diabétesz a glükuronid – képzésben, illetve a glükuronid transzportban pregnánsabb és viszonylag szelektív hatásokat fejt ki, amelyek nyilvánvalóan a glükóz anyagcseréjének a változásával függenek össze. Ezek az effektusok részben módosítják, vagy nem befolyásolják a szulfátképzést, illetve a PNP – S kiválasztását az epébe, valamint a szabad formájú PNP biliáris exkrécióját, ezek a folyamatok inzulinnal sem befolyásolhatók. A saját kísérleti eredmények, illetve azok interpretálása sok tekintetben összhangban van más szerzők megállapításaival. Adatainkból levonható az a következtetés, hogy a konjugációs reakciók változása nincs feltétlenül szoros korrelációban a biliáris exkrécióval, illetve annak a módosulásával a diabéteszes állatokban. Az inzulin a májban és a bélben a glükuronidációval kapcsolatos enzimek aktivitásának a változását diabéteszben ellensúlyozta, de ez nem volt mindig teljes mértékű. Ezzel szemben a glükuronid exkréciós folyamataiban észlelt különbségeket mind a májban, mind a bélben teljes mértékben kompenzálta az inzulin a diabéteszes állatokban. A szulfátkonjugátum képzésében szerepet játszó enzimek aktivitása nem változott diabéteszben, de a PNP – S biliáris exkréciója csökkent, amit az inzulin nem befolyásolt. Ezek az adatok is a glükózanyagcserével kapcsolatos specifikus változások jelentőségére utalnak, másrészt alátámasztják azt a megállapításunkat, hogy az enzimátikus változások és a transzport (exkréciós) folyamatok módosulása között nincs direkt összefüggés, vagy szoros korreláció.

6. Összefoglalás és új eredmények

1. A HPLC – vel kapcsolatos eddigi módszerek felhasználásával sikerült az UV detektálással összekapcsolt olyan izokratikus fordított fázisú ionpár eljárást (RP – HPLC) kidolgozni, amely alkalmas a PNP, PNP – G és a PNP – S egyidejű, megbízható, reprodukálható, pontos és viszonylag gyors szeparálására és meghatározására. Az általunk módosított eljárás alkalmas továbbá nagyszámú biológiai (pl. a bélperfuzátumból vagy az epéből származó) minta viszonylag gyors és sorozatban történő analízisére.

2. Kontroll patkányokban a PNP metabolizmusa során a fő metabolit a PNP – G. A PNP – S ennél lényegesen kisebb mennyiségben jelenik meg mind a vékonybélben, mind az epében.
3. A metabolizmusban szerepet játszó enzimek aktivitását összehasonlítva megállapítható, hogy a kontroll állatokban a glükuronid – képzésben résztvevő enzimek (UDP – glükuroniltranszferáz , β – glükuronidáz) aktivitása lényegesen, nagyságrendekkel magasabb volt, mint a szulfátképzésben szerepet játszóké (szulfotranszferáz, arilszulfatáz).
4. Közvetlen összefüggés a kontroll állatoknál a metabolikus enzimek aktivitása és a PNP – metabolitok lumenális és biliáris exkréciója között nem volt megállapítható.
5. Az STZ – vel kiváltott kísérletes diabétesz (hiperglikémia) jelentősen befolyásolta mind az intesztinális, mind a biliáris exkréciót a PNP-G esetében, érdekes módon azonban ellentétes irányban: a PNP-G intesztinális exkréciója nőtt, a biliáris exkréciója pedig csökkent.
6. Az UDP – glükuroniltranszferáz aktivitása a bélben fokozódott, a májban csökkent; a β -glükuronidáz aktivitása a májban csökkent, a bélben pedig nőtt a diabéteszes állatokban.
7. Inzulin akut adásával a PNP-G intesztinális és biliáris exkréciójában a diabéteszben észlelt változások teljes mértékben, a glükuronid – képzésben közreműködő enzimek aktivitásában talált eltérések csak részben voltak kompenzálhatók.
8. A PNP-S biliáris exkréciója a májban csökkent, a bélben nem változott kísérletes diabéteszben.
9. A PNP szulfát – metabolitjának a képzésében közreműködő enzimek (szulfotranszferáz, arilszulfatáz) aktivitásában nem észleltünk eltérést diabéteszben a kontrollhoz viszonyítva.
10. Inzulin akut adásával diabéteszes állatokban sem a PNP – S intesztinális , sem a biliáris exkrécióját nem tudtuk befolyásolni, de az enzimaktivitások is változatlanok maradtak inzulin adást követően.
11. A PNP változatlan, nem – konjugált formában is kiválasztódik az epébe, ezt a diabétesz gátolta, a gátló hatást az inzulin nem befolyásolta.

A kísérleti eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a kísérletes diabétesz megváltoztatja a farmakonok intesztinális és hepatikus eliminációját. A változások specifikus, szelektív jelleget mutatnak: elsősorban a cukoranyagcsere változásával összefüggő glükuronid – képzésben és exkrécióban nyilvánulnak meg. Az enzimaktivitások változása és az exkréció módosulása között szoros korrelációt nem találtunk. A diabéteszben megfigyelt változások az intesztinális és hepatikus eliminációban részben kompenzálhatók inzulin akut adásával.

7. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönettel tartozom **Dr. Perjési Pál** egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, a Gyógyszerészi Kémiai Intézet vezetőjének, aki a szakmai munkámban nyújtott segítsége mellett lehetőséget biztosított a Gyógyszerészi Kémiai intézetben a tudományos munka végzésére.

Köszönettel tartozom **Dr. Barthó Loránd** egyetemi tanárnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, valamint a Gyógyszerésztudományi Doktori Iskola vezetőjének, aki lehetővé tette számomra a kísérletes munka elvégzését az általa vezetett Intézetben, valamint a PhD tevékenységet a Gyógyszertudományi Doktori Iskola keretein belül.

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

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

Végül, de nem utolsósorban megköszönöm **családomnak**, elsősorban **szüleimnek**, hogy mindvégig kitaró erkölcsi és anyagi támogatásban részesítettek.

8. Közlemények

1. 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) (IF: 1,403)
2. Almási A, Fischer E, Perjési P: Isocratic ion-pair HPLC method for quantification of 4-nitrophenol and its conjugated metabolites from bile. *Sci. Pharm.* 79, 837-847 (2011)
3. Bojcsev S, Almási A, Simon H, Perjési P, Fischer E: Investigation of drug metabolism in various segments of small intestine in the rat. *Acta Physiol. Hung.*100, 115-123 (2013) (IF: 0,821)
4. Almási A, Bojcsev S, Fischer T, Simon H, Perjési P, Fischer E: Metabolic enzyme activities and drug excretion in the small intestine and in the liver in the rat. *Acta Physiol. Hung.* Accepted for publication. (IF: 0,821)
5. Almási A, Bojcsev S, Fischer T, Simon H, Perjési P, Fischer E: Effect of experimental diabetes and insulin replacement on the intestinal metabolism and excretion of p-nitrophenol in the rat. Submitted for publication.
6. Fischer E, Almási A, Bojcsev S, Fischer T, Simon H, Perjési P: Changes in the metabolic enzyme activities and hepatic elimination of p-nitrophenol in streptozotocin-induced diabetes with or without insulin replacement in the rat. Submitted for publication.

9. Kongresszusi prezentációk

9.1. Angol nyelvű prezentációk:

1. A Almási, E Fischer, P Perjési: HPLC method for simultaneous determination of 4-nitrophenol and its glucuronide and sulfate conjugates (Poster). Symposium on Instrumental Analysis, Graz (Austria), 2005.
2. A Almási, P Perjési, E Fischer: Effect of streptozotocin on the intestinal metabolism and excretion of p-nitrophenol in the rat (Poster). BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Siófok, 2005.
3. A Almási, E Fischer, P Perjési: HPLC method for experimental quantitation of 4-nitrophenol and its metabolites from bile (Poster). International symposium on instrumental analysis, Pécs, 2008.

9.2. Magyar nyelvű prezentációk:

1. Almási A, Perjési P, Fischer E: Kísérletes diabetes hatása a xenobiotikumok eliminációjára (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2005.
2. Almási A, Perjési P, Fischer E: Kísérletes diabetes hatása a p-nitrofenol eliminációjára (Poszter). „Kihívások és eredmények” Gyógyszerkutató Szimpózium, Pécs, 2005.
3. Perjési P, Almási A, Fischer E: A kísérletes diabetes hatása a p-nitrofenol vékonybélben és májban történő metabolizmusára patkányban (Poszter). Farmakokinetikai és gyógyszermetabolizmus továbbképző szimpózium, Mátraháza, 2006.
4. Almási A, Fischer E, Perjési P: A kísérletes diabetes hatása a p-nitrofenol vékonybélben és májban történő metabolizmusára patkányban (Poszter). Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2006.

5. Almási A, Perjési P, Fischer E: Kísérletes diabetes hatása a xenobiotikumok eliminációjára (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006.
6. Almási A, Fischer E, Perjési P: A p-nitrofenol és metabolitjainak szimultán meghatározása epéből HPLC-s módszerrel (Poszter). „Kihívások és eredmények” Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006.
7. Almási A, Perjési P, Fischer E: Inszulin hatása a farmakonok hepatikus és intesztinális eliminációjára (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007.
8. Almási A, Perjési P, Fischer E: A streptozotocin és inzulin hatása a xenobiotikumok eliminációjára (Poszter). „Kihívások és eredmények” Gyógyszerkutató Szimpózium, Szeged, 2007.
9. Fischer E, Almási A, Perjési P: A vékonybél szerepe a xenobiotikumok eliminációjában (Előadás). MGYT Gyógyszerkutató Szimpózium, Szeged, 2007.
10. Almási A, Fischer E, Perjési P: HPLC módszer a 4-nitrofenol és metabolitjainak kísérletes meghatározására epéből (Poszter). Farmakokinetikai és Gyógyszermetabolizmus Továbbképző Szimpózium, Galyatető, 2008.
11. Perjési P, Almási A, Fischer E: Kísérletes diabétesz hatása 4-nitrofenol vékonybélben és májban lejátszódó metabolizmusára patkányban (Előadás). Farmakokinetikai és Gyógyszermetabolizmus Továbbképző Szimpózium, Galyatető, 2008.
12. Almási A, Perjési P, Fischer E: A streptozotocin és inzulin hatása a xenobiotikumok eliminációjára és az UDP-glukuroniltranszferáz és β -glukuronidáz enzimek aktivitására (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2008.

13. Almási A, Perjési P, Fischer E: Gyors és lassú hatású inzulin befolyása a farmakonok intesztinális és hepatikus eliminációjára (Poszter). Gyógyszer az ezredfordulón VII. „Szakmai kihívásaink a XXI. század elején”, A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Ipari Szervezete, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerkutató Szakosztályának Konferenciája, Sopron, 2008.
14. Fejes Á, Almási A, Perjési P, Fischer E: A glükózkínálat hatása a farmakonok intesztinális és hepatikus metabolizmusára (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009.
15. Almási A, Fischer E, Perjési P: A streptozotocin kiváltotta diabetes és inzulin hatása a 4-nitrofenol metabolizmusára és az UDP-glukuroniltranszferáz és β -glukuronidáz aktivitására (Poszter). Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2009.
16. Almási A, Markovics Z, Perjési P, Fischer E: A streptozotocin és inzulin hatása a xenobiotikumok eliminációjára, a szulfotranszferáz és arilszulfatáz enzimek aktivitására (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.
17. Almási A: Fenolos gyógyszervegyületek metabolizmusának vizsgálata a vékonybélben és a májban fiziológiás és hiperglikémiás körülmények között (Előadás). Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2011.
18. Bojcssev S, Almási A, Simon H, Perjési P, Fischer E: A metabolikus aktivitás vizsgálata a vékonybél különböző szegmentjeiben (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012.
19. Almási A, Takács Cs, Bojcssev S, Fischer T, Perjési P, Fischer E: A p – nitrofenol metabolizmusa: a p-nitrofenol metabolitok (glükuronid, szulfát) a bélben, májban és a vérben (Poszter). Membrán- Transzport Konferencia , Sümeg, 2013.