Kapszaicinoidok és szalicilátok metabolikus átalakulásainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

Dr. Kuzma Mónika

Egyetemi doktori értekezés

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerészi Kémia Program

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Perjési Pál

Témavezetők: Prof. Dr. Perjési Pál és Prof. Dr. Mózsik Gyula

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

GYÓGYSZERÉSZI KÉMIAI INTÉZET

PÉCS

2016

Tartalomjegyzék

I RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
II BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS 6

II.1 KAPSZAICINOIDOK 6

II.1.1 Kapszaicin-érzékeny idegvégződések 8
II.1.2 Kapszaicinoidok sorsa a szervezetben 9
II.1.2.1 Kapszaicinoidok felszívódása és megoszlása 9
II.1.2.2 Kapszaicinoidok metabolizmusa és eliminációja 10

II.1.3 Kapszaicin-tartalmú készítmények 12

II.2 SZALICILSAV SZÁRMAZÉKAI, A SZALICILÁTOK 14

II.2.1 A szalicilátok hatásai 15
II.2.1.1 Farmakológiai szempontból jelentős hatások 15
II.2.1.2 A szalicilátok egyéb hatásai 19

II.2.2 Szalicilátok sorsa a szervezetben 21
II.2.2.1 Szalicilátok felszívódása és megoszlása 21
II.2.2.2 Szalicilátok metabolizmusa és eliminációja 23
II.2.2.3 Szalicilátok interakciói 25

II.2.3 Acetilszalicilsav-tartalmú készítmények 25

II.3 AZ AROMÁS HIDROXILÁCIÓ NEM-ENZIMKATALIZÁLT MECHANIZMUSAI 27

II.3.1 Fenton-modell 27
II.3.2 Udenfriend-modell 28

III CÉLKITŰZÉSEK 29
IV VIZSGÁLATI MÓDSZEREK 31

IV.1 KAPSZAICINOIDOK GYÓGYSZERALAPANYAGBÓL VALÓ MEGHATÁROZÁSÁRA ALKALMAS VALIDÁLT HPLC-DAD MÓDSZER FEJLESZTÉSE 31

IV.1.1 Vizsgált anyagok, oldatok 31
IV.1.2 Kromatográfiás körülmények 32

IV.2 KAPSZAICINOIDOK PLAZMA MINTÁBÓL VALÓ MEGHATÁROZÁSÁRA ALKALMAS MINTAELŐKÉSZÍTÉSI ELJÁRÁS ÉS VALIDÁLT HPLC-FLD MÓDSZER FEJLESZTÉSE 32

IV.2.1 Vizsgált anyagok, oldatok 33
IV.2.2 Mintaelőkészítési eljárás 33
IV.2.2.1 Fehérjementesítés 34
IV.2.2.2 Szilárd fázisú extrakció 34

IV.2.3 Kromatográfiás körülmények 34

IV.3 KAPSZAICINOIDOK *IN VIVO* VÉKONYBÉL-METABOLIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY-MODELLEN 35

IV.3.1 Oldatkészítés 35
IV.3.2 Perfúziós vizsgálat 35
IV.3.3 A perfúzió során keletkező minták analízise 37
IV.3.3.1 Kapszaicinoidok vékonybélből való felszívódásának és metabolizmusának vizsgálata 37
IV.3.3.2 A keletkező metabolitok szerkezetének meghatározása 37

IV.4 SZALICILSAV ÉS HIDROXILÁLT METABOLITJAI ELVÁLASZTÁSÁRA ALKALMAS VALIDÁLT HPLC MÓDSZER FEJLESZTÉSE 38

IV.4.1 Vizsgált anyagok, oldatok 38

IV.4.2 Kromatográfiás körülmények ... 38

IV.5 SZALICILSAV VÉKONYBÉLBŐL VALÓ FELSZÍVÓDÁSÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* PATKÁNY-MODELLEN ... 38

IV.5.1 A perfúzió során keletkező minták analízise ... 39

IV.6 SZALICILSAV *IN VIVO* VÉKONYBÉL-METABOLIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY-MODELLEN, A KELETKEZŐ METABOLITOK SZERKEZETÉNEK IGAZOLÁSA ... 39

IV.6.1 Vizsgált anyagok, oldatok ... 39
IV.6.2 Mintaelőkészítés ... 40
IV.6.3 HPLC-DAD-MS körülmények ... 40

IV.7 SZALICILSAV *IN VITRO* OXIDATÍV ÁTALAKULÁSAINAK FENTON- ÉS UDENFRIEND-MODELLEKKEL VALÓ VIZSGÁLATA ... 41

IV.7.1 Fenton-inkubáció ... 41
IV.7.2 Udenfriend-inkubáció ... 41
IV.7.3 Mintaelőkészítés és mintaanalízis ... 42

V EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ... 43

V.1 KAPSZAICINOIDOK GYÓGYSZERALAPANYAGBÓL VALÓ MEGHATÁROZÁSA ... 43

V.2 KAPSZAICINOIDOK *PER OS* ALKALMAZÁST KÖVETŐ PLAZMA MINTÁBÓL VALÓ MEGHATÁROZÁSA ... 45

V.3 A KAPSZAICINOIDOK FELSZÍVÓDNAK ÉS METABOLIZÁLÓDNAK A VÉKONYBÉLBEN ... 47

V.3.1 Kapszaicinoidok vékonybélből történő felszívódása ... 47
V.3.2 A kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusa, a metabolitok szerkezetének azonosítása ... 49

V.4 SZALICILÁTOK VÉKONYBÉLBŐL TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁSÁNAK VIZSGÁLATA ... 51

V.5 SZALICILÁTOK VÉKONYBÉL-METABOLIZMUSA ... 52

V.6 SZALICILÁTOK *IN VITRO* OXIDATÍV ÁTALAKULÁSAINAK VIZSGÁLATA ... 54

V.6.1 A szalicilsav Fenton-inkubáció során történő átalakulásai ... 55
V.6.2 A szalicilsav Udenfriend-inkubáció során történő átalakulásai ... 59

VI MEGBESZÉLÉS ÉS ÖSSZEFOGLALÁS ... 61
VII IRODALOMJEGYZÉK ... 64
VIII SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS KONGRESSZUSI PREZENTÁCIÓK JEGYZÉKE ... 74
IX KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 79

I Rövidítések jegyzéke

15(*R*)-HETE - 15(*R*)-hidroxi-eikozatetraénsav

2,3-DHB - 2,3-dihidroxibenzoesav

2,4-DHB - 2,4-dihidroxibenzoesav

2,5-DHB - 2,5-dihidroxibenzoesav

AP-1 – activator protein 1

ASA - acetilszalicilsav

ASBT - apical sodium dependent bile acid transporter

ATL - aspirin triggered lipoxin

BCRP - breast cancer resistance protein

CGRP - kalcitonin gén-rokon peptid

COX - ciklooxigenáz

CYP - citokróm P450

DAD - diódasoros detektor

FLD - fluoreszcens detektor

GST - glutation-S-transzferáz

HESI - heated electrospray ionization

HPLC - nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

MCT1 - monocarboxylate transporter 1

MDR1 - multidrug resistance protein 1

MFO - mixed-function oxidase

MRP2 - multidrug resistance-associated protein 2

MS - mass spectrometry, tömegspektrometria

MS/MS - tandem mass spectrometry

NFκB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NKA - neurokinin A

OAT-1 - organikus anion transzporter-1

$OH^{\cdot}$ - hidroxilgyökök

PEG 400 - polietilén-glikol 400

PEPT1 - peptide transporter 1

PG - prosztaglandin

PL - foszfolipáz

PST - fenol-szulfotranszferáz

RET - Regionális Egyetemi Tudásközpont

ROS - reaktív oxigénszármazékok

SA - szalicilsav

SHU - Scoville Heat Units

SIM - selective ion monitoring

SOD - szuperoxid-dizmutáz

TBMÉ - *terc*-butil-metil-éter

TRP - tranziens receptor potenciál

TRPV1 - tranziens receptor potenciál vanilloid 1

TXA2 - tromboxán A2

UGT - UDP-glükuroniltranszferáz

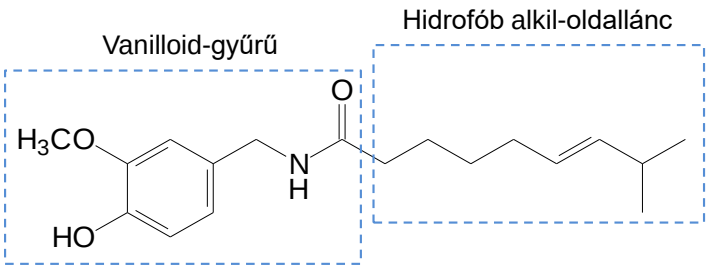
USP - U.S. Pharmacopoeia

II Bevezetés, irodalmi áttekintés

II.1 Kapszaicinoidok

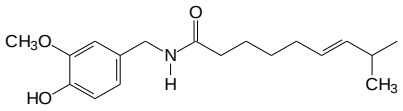
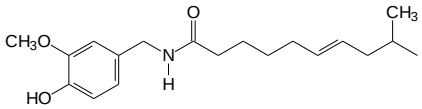
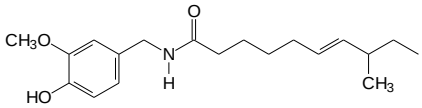
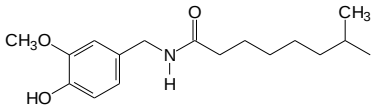
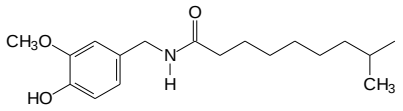
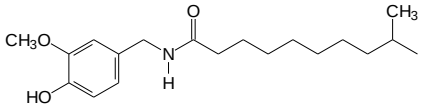
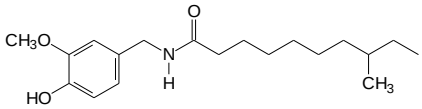
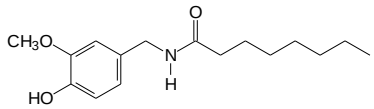
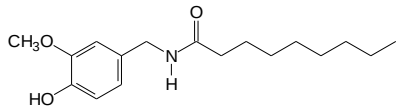
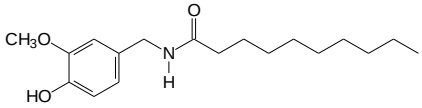
A különféle paprikák a burgonyafélék (Solanaceae) családján belül a *Capsicum* nemzetségbe tartoznak. Egyik közös tulajdonságuk, hogy egy kapszaicinoid-vegyületekből álló keveréket szintetizálnak, amely megfelelő koncentrációban csípős érzetet vált ki. Ezt az alkaloida-keveréket a paprikák bordáiban (ereiben) lévő mirigyek termelik. A paprikából nyert természetes eredetű extraktum két fő kapszaicinoid-komponenst, kapszaicint és dihidrokapszaicint tartalmaz, ezek mellett azonban további, kisebb mennyiségben jelen lévő rokon szerkezetű vegyületek (minor kapszaicinoidok) azonosíthatók (1. táblázat) (1).
A különböző *Capsicum* fajok erősség tekintetében igen nagy változatosságot mutatnak. A különbség a bennük termelődő kapszaicinoidok mennyiségében rejlik: az édespaprikában kevés (bogyónként 250-500 µg), az erősebb paprikákban arányosan több (>1000 µg) csípős vegyület található. A csípősség mértékét úgynevezett Scoville Egységekben (Scoville Heat Units, SHU) adják meg. Az édespaprika 0 Scoville Egységet képvisel, míg a tömény kapszaicin 16 millió Scoville Egységgel jellemezhető (2).
A kapszaicint tiszta formában először Micko izolálta 1898-ban (3), pontos kémiai szerkezetét 1919-ben Nelson határozta meg (4). Szintetikus úton elsőként Späth és Darling állította elő 1930-ban.

A kapszaicinoid-vegyületek közös szerkezeti eleme a 3-hidroxi-4-metoxi-benzilamid (vanilloid) molekularész (1. ábra), csak hidrofób alkil-oldalláncukban különböznek egymástól. A csípős íz és a farmakológiai szempontból lényeges hatások kialakításában a vanilloid szerkezeti elem mellett a hidrofób oldallánc is fontos szerepet játszik; ez utóbbinak hossza és szerkezete (pl.: telített vagy telítetlen) egyaránt meghatározó (5; 6; 7; 8; 9; 10). C14-izotóppal jelölt kapszaicinoid-vegyületekkel elvégzett kísérletek igazolják, hogy az egyes kapszaicinoid-vegyületek farmakodinámiás és farmakokinetikai tulajdonságai nagyfokú hasonlóságot mutatnak (11; 12; 13).
A kapszaicinoid-vegyületek legjelentősebb hatásai a következők: serkentik az emésztést, megóvják a gyomor nyálkahártyáját az alkohol, illetve a nem-szteroid gyulladáscsökkentők okozta károsodásoktól (14), csillapítják a reumás ízületi gyulladást és a szenzoros neuropátiás fájdalmat (15; 16; 17), valamint tumorellenes és antioxidáns hatással rendelkeznek (18; 19; 20; 21; 22; 23; 24).



1. ábra. *A kapszaicinoidok szerkezetének bemutatása a kapszaicin példáján.*

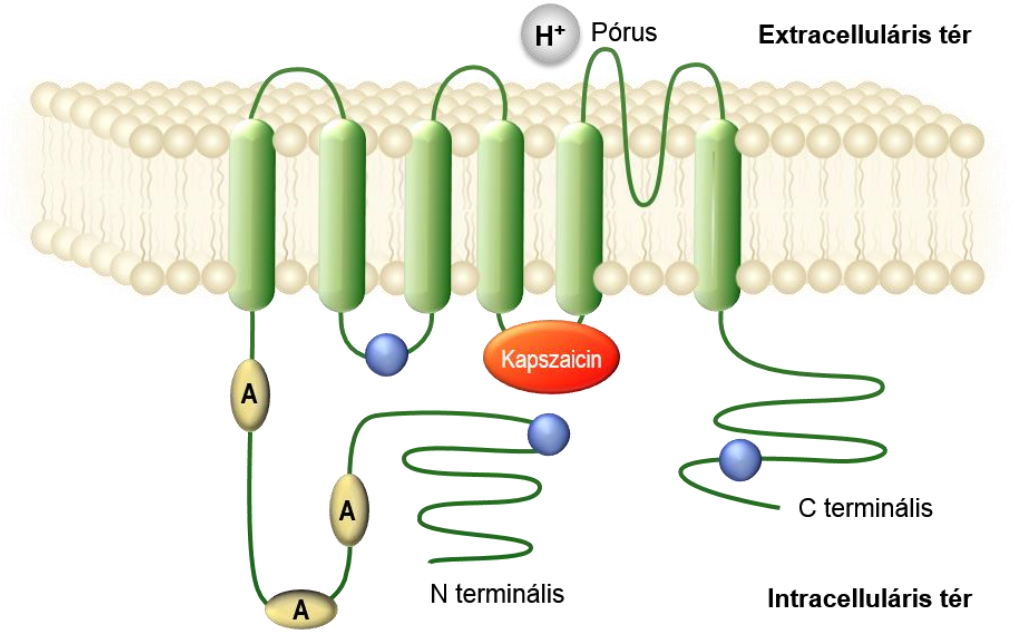
1. táblázat. *Major és minor kapszaicinoidok szerkezete.*

Név	Szerkezet
kapszaicin	
homokapszaicin I	
homokapszaicin II	
nordihidrokapszaicin	
dihidrokapszaicin	
homodihidrokapszaicin I	
homodihidrokapszaicin II	
vanillil-oktánamid	
vanillil-nonánamid	
vanillil-dekánamid	

II.1.1 Kapszaicin-érzékeny idegvégződések

A kapszaicin hatásait közvetítő farmakológiai receptor létezése már az 1980-as évek óta bizonyított. Mivel ez a receptor a Drosophilában már régen azonosított tranziens receptor potenciál (TRP) típusú kationcsatornákkal szerkezeti hasonlóságot mutat, és az elsőként leírt kémiai aktivátora, a kapszaicin vanilloid-szerkezetű vegyület, a receptort tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptornak nevezik. A TRPV1-receptor az elsőként felfedezett hővel aktiválható ioncsatorna, amely megtalálható az agyban, a húgyhólyagban, a vesékben, a bélrendszerben, a májban és a bőrben is (25). Klónozását egy amerikai kutatócsoport valósította meg 1997-ben (26).

A TRPV1-receptor hat transzmembrán-alegységből áll, amelyek közül az 5. és 6. domén ioncsatornát (pórust) képez (2. ábra). Aktivált állapotban az ioncsatorna megnyílik és nem szelektív kationcsatornaként működik. Nátrium-, kálcium-, és káliumionokat egyaránt átenged, anionok számára azonban átjárhatatlan.



2. ábra. *TRPV1-receptor szerkezete.*

A receptort szelektív agonistáján, a kapszaicinen kívül fájdalmas hőinger (43 °C-nál magasabb hőmérséklet), alacsony pH (pH<6), egyéb növényi eredetű irritáns (pl.: reziniferatoxin, piperin) és számos endogén anyag (pl.: 12-lipoxigenáz-termékek, ATP, bradikinin, anandamid) is képes igen erősen aktiválni (27).

A hő- és kémiai ingerek eltérő támadásponton hatnak. A klasszikus afferens funkció mellett (depolarizáció → akciós potenciál formájában információ közvetítése a központi idegrendszer felé) a receptor aktiválása az idegvégződésben tárolt neuropeptidek (pl.: szomatosztatin, P-anyag (substance P, SP), kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), neurokinin A (NKA) exocitózisát is előidézi. A felszabadult neuropeptidek parakrin mediátorként a környező szöveti struktúrákon efferens hatásokat (vazodilatációt, plazma-extravazációt, simaizom-kontrakciót vagy -relaxációt) közvetítve (28; 29; 30) neurogén gyulladást hoznak létre (31). A kapszaicin-érzékeny TRPV1-receptor polimodális nociceptor, amely kettős, afferens-efferens funkcióval bír.

A receptorok tartós ingerlése (magasabb dózisban vagy hosszabb ideig adagolt kapszaicinnel) a kezdeti izgató hatást követően tartós refrakter állapotot hoz létre, amely szenzoros deszenzibilizációhoz vezet (29; 32). Ilyenkor a TRPV1-receptort expresszáló nociceptív idegvégződés egészének funkciócsökkenése következik be (33; 34), ezzel magyarázható a kapszaicin fájdalomcsillapító hatása (28; 35).

A kapszaicinoidok receptoriális hatásainak ismerete új terápiás lehetőségeket nyitott meg számos olyan gyulladásos betegség kezelésében (pl.: rheumatoid arthritis, asthma bronchiale, ekzema, allergiás rhinitis és conjunctivitis), amelyek patomechanizmusában a neurogén komponens fontos szerepet játszik (30). A neurogén gyulladást a jelenleg használatos gyulladásgátlók nem képesek befolyásolni. Felismerve a TRPV1-receptor szerepét a folyamat kialakulásában, a receptor antagonistái potenciálisan nemcsak fájdalomcsillapító, hanem gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezhetnek.

II.1.2 Kapszaicinoidok sorsa a szervezetben

II.1.2.1 Kapszaicinoidok felszívódása és megoszlása

A kapszaicinoidok igen lipofil vegyületek, könnyen átjutnak a sejtmembránon. *In vivo* állatkísérletek eredményei igazolják, hogy *orális* adást követően a kapszaicin és analógjai passzív folyamat útján felszívódnak a gasztrointesztinális traktusból. A felszívódás mértéke az egyes fajokban 50-90% között változik (36; 37; 38). A vérben a beadást követő első órában mérhető a legmagasabb kapszaicinoid-koncentráció és a szövetek közötti maximális megoszlás ugyancsak az első órában figyelhető meg (39). Mivel az extrahepatikus szövetekben, köztük a vékonybélben is, jelentős a hidrolízist végző enzimek aktivitása, a kapszaicinoidok már a jejunumból és ileumból való felszívódás során metabolizálódnak (37).

Intravénás (i.v.) alkalmazás esetén *in vivo* állatkísérletek eredményei alapján a beadást követő harmadik percben az agyban és a gerincvelőben ötször, a májban háromszor magasabb kapszaicinoid-koncentráció mérhető, mint a vérben (40; 41).

A forgalomban lévő kapszaicinoid-tartalmú készítmények főként *lokális*, külsőleges felhasználásra szánt készítmények. A kapszaicinnek és analógjainak bőrön keresztül történő felszívódásaigen gyors és hatékony. 3%-os oldattal történő kezelést követően humán kísérletekben már az első percben kimutatható a kapszaicinoidok jelenléte a stratum corneumban és röviddel ezután a „steady state" állapot is kialakul (42).

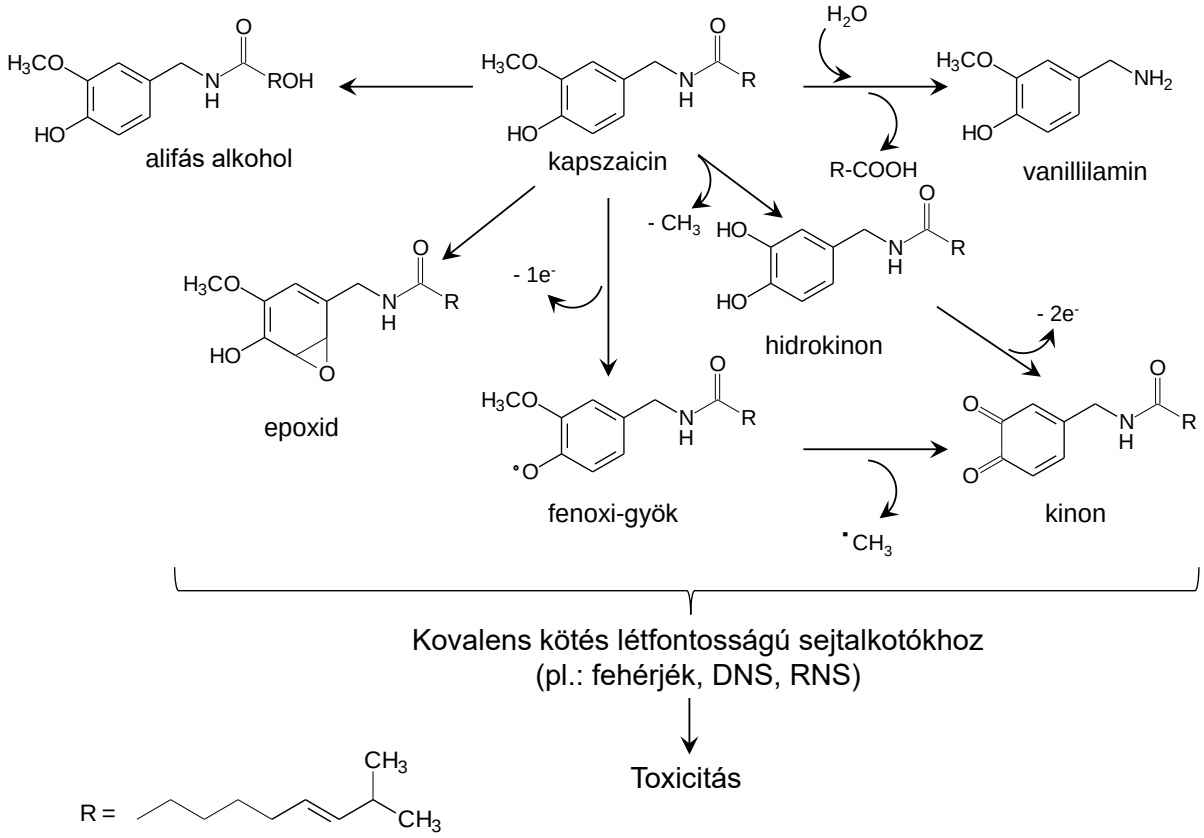
II.1.2.2 Kapszaicinoidok metabolizmusa és eliminációja

A kapszaicinoidok *in vivo* biotranszformációjáról nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Több kutatócsoport bizonyította, hogy orális alkalmazást követően a kapszaicinoid-vegyületek már a gasztrointesztinális traktusból való felszívódás során hidrolízist szenvednek (37; 38). A vegyületek első passzázs-effektusa igen jelentős, ennek eredményeként a szisztémás keringésbe kerülő kapszaicinoid mennyiség igen kicsi. A metabolitok a kapszaicinoidokra jellemző hatásokkal már nem rendelkeznek.

In vitro patkánykísérletek alapján a kapszaicinoidok főként a máj enzimrendszere által metabolizálódnak (11) (3. ábra). Az átalakulás egyik lehetséges útja a kevert funkciójú oxidáz-rendszer (mixed-function oxidase, MFO) által katalizált oxidáció. Az MFO révén a kapszaicinoidok az alifás oldallánc terminális szénatomján és a vanillil-molekularészen is képesek oxidálódni. Ez utóbbi esetben elektrofil intermedier termék, gyűrűs epoxid keletkezik. A vanillil-molekularész hidroxilcsoportjának oxidációja elektrofil fenoxigyök keletkezését is eredményezheti CYP2E1 enzim által katalizált reakcióban. A képződött gyök inaktiválhatja a keletkezését katalizáló enzimet, vagy dimert képezhet (12). A CYP2E1 enzim mellett más citokróm enzimek (pl.: CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19, stb.) is képesek katalizálni a kapszaicinoidok átalakulásait. A metabolikus utak között megemlítendő az aromás- és az alkil-hidroxiláció illetve az O-demetiláció (41). Az aromás gyűrű O-demetilációját követő oxidáció elektrofil hidrokinon- és kinonszármazékok kialakulásához vezethet. A kapszaicinoidok metabolizmusa során keletkező elektrofil termékek kovalens kötést létesítve a fehérjék, az RNS és a DNS nukleofil régióival toxikus hatás (nekrózis, karcinogenezis, mutagenezis) kialakulásához vezethetnek (11; 43).

A kapszaicinoidok átalakulásának másik lehetséges (nem oxidatív) módja a hidrolízis, amelyet *in vitro* és *in vivo* kísérletek egyaránt alátámasztanak. A kapszaicinoidokat

hidrolizáló enzim aktivitása nemcsak a májban, hanem az extrahepatikus szövetekben (pl.: a vesében, a tüdőben és a vékonybélben) is magas (44). A hidrolízis során a savamid-kötés falhasad, vanillilamin és szabad zsírsav keletkezik (3. ábra). A vanillilaminból oxidatív dezamináció során vanillil-aldehid képződik, amely a továbbiakban oxidációval vanillinsavvá, redukcióval vanillil-alkohollá alakulhat át. Az így képződött termékek szabad formában, vagy II. fázisú reakcióban glükuronsavval konjugálódva ürülhetnek a szervezetből (12).
Lokális alkalmazás mellett a kapszaicinoidok biotranszformációja igen lassú, felezési idejük közel 24 óra. Az átalakulás során két metabolit, vanillilamin és vanillinsav azonosítható (45).



3. ábra. *A kapszaicinoidok metabolizmusa.*

Állatkísérletek igazolják, hogy a kapszaicin elsősorban a vesén keresztül főként glükuronid-konjugátum formájában ürül; kis mennyiségben azonban változatlan formában a székletben is kimutatható (43; 36; 37).

II.1.3 Kapszaicin-tartalmú készítmények

A Magyarországon forgalomban lévő kapszaicinoid-tartalmú készítmények (2. táblázat) főként lokális, külsőleges felhasználásra szánt krémek, kenőcsök és tapaszok. Ezen készítmények fő indikációs területei a reumás ízületi gyulladás, valamint az izom- és végtagfájdalom csillapítása. A krémek és kenőcsök mindegyike vény nélkül hozzáférhető, csak alacsony koncentrációban (0,1-2,5%) tartalmaz kapszaicinoidokat. A készítményekben lévő vivőanyagok minősége nagyban befolyásolja a kapszaicinoidok felszívódásának mértékét (46). A tapaszok között létezik vényköteles, a hatóanyagot magasabb koncentrációban (8%) tartalmazó készítmény is, amelynek alkalmazása során a behatás időtartama meghatározó (47).

A forgalomban lévő szisztémás hatású készítmények (tabletta, kapszula, orrspray) terápiás javallata a fogyókúrás és diétás táplálkozás kiegészítése, továbbá fejfájás és migrén kezelése (32). Orális alkalmazású, gyógyszer-kategóriába tartozó kapszaicinoid-készítmény jelenleg még nincs törzskönyvezve.

Kutatási eredmények igazolják, hogy a kapszaicin gasztroprotektív hatású a nemszteroid-gyulladásgátló szerek okozta gyomornyálkahártya-károsodással szemben (14). Ezen indikációval kapszaicinoid-tartalmú gyógyszer fejlesztése a Pécsi Tudományegyetemen folyamatban van, a törzskönyvezést megelőző humán klinikai vizsgálatok jelenleg is zajlanak (48).

2. táblázat. *Magyarországon forgalomban lévő kapszaicinoid-tartalmú készítmények.*

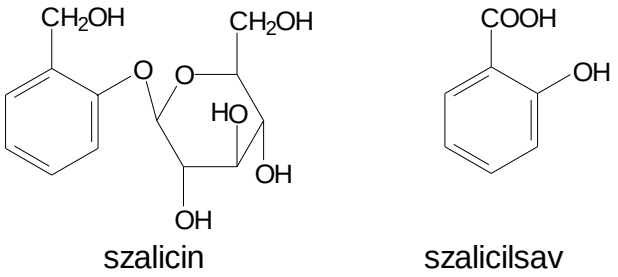
Készítmény neve	Gyártó
Inno Rheuma forte krém (1,0075 g chilipaprika kivonat 6,5% kapszaicin tartalommal/100 g krém)	Naturland Magyarország Kft.
Nicoflex kenőcs (0,15 mg kapszaicin/90 g kenőcs)	Reanal Finomvegyszergyár
Pferdebalsam Hot piros lóbalzsam (*Capsicum frutescens/500 ml lóbalzsam)	Schmees Kosmetik GmbH
Qutenza külsőleges tapasz (8% kapszaicin/tapasz)	Astellas Pharma Inc.
Dr. Chen Capsiplast Paprika hőtapasz (*Capsici extractum/tapasz)	Oriental Herbs Kft.
Salonpas-Hot rugalmas gyógytapasz (100 mg Capsici extractum/tapasz)	Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.
Sinol-M orrspray (*Capsicum annuum/10 ml orrspray)	Sinol USA Inc.
GinkoPrim Hot tabletta (2,5 mg kapszaicin/1 tabletta)	Walmark Kft.
Klimin slim TRIO kapszula (0,6 mg kapszaicin/2 kapszula)	Pharmax Kft.

* a mennyiség nincs jelölve a terméken

A kapszaicinoid-vegyületek nem kívánatos hatásaik miatt napjainkban önvédelmi és tömegoszlatási céllal is alkalmazásra kerülnek. A nyálkahártyák irritációja (a légutakban, a szemben és az orrban) égő, viszkető érzést, orrfolyást, könnyezést és köhögést indukálhat (49).

II.2 Szalicilsav származékai, a szalicilátok

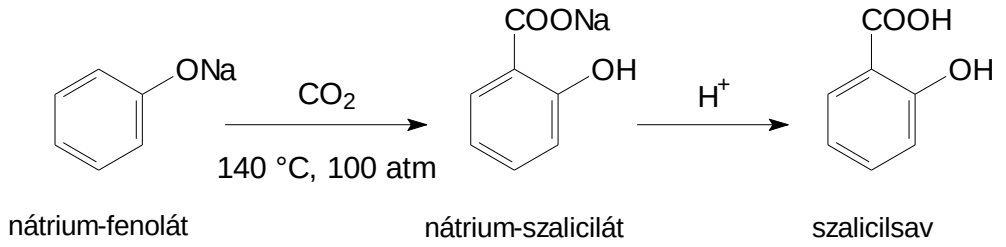
A fehér fűzfa (*Salix alba*) kérgéből és leveléből készült kivonat fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatása már az ókor óta ismert. Lázcsillapító hatására a kínafakéregből nyert kinin pótlásának céljából végzett kutatások során derült fény, amelyről először Stone tiszteletes számolt be 1763-ban (50). Kezdetben úgy vélték, hogy a porított fűzfakéregből készült extraktum hatásért felelős komponense a szalicin-glikozid (51), amelyet Leroux francia gyógyszerész izolált elsőként kristályos formában 1830-ban. Potensebb szer felfedezésének reményében 1838-ban, egy olasz vegyész, Piria a szalicint savas főzéssel glükózra és szalicil-alkoholra bontotta. A szalicil-alkoholt oxidálta, így színtelen, hosszú tűkristályokból álló anyagot kapott, amit szalicilsavnak nevezett el. A szalicilsav a szalicinnel megegyező farmakológiai hatásokat mutatott, ugyanakkor nem rendelkezett annak igen keserű ízével. Időközben, a szalicilsavat és származékait (pl.: metil-szalicilát) több olyan gyógynövény (pl.: *Spiraea ulmaria* – gyöngyvessző, *Gaultheria procumbens* – kúszó fajdbogyó) kivonatában sikerült azonosítani, amelyeket már a szalicilsav felfedezését megelőzően is alkalmaztak a fájdalommal és lázzal járó betegségek kezelésében.



4. ábra. *A szalicin (a) és a szalicilsav (b) szerkezeti képlete.*

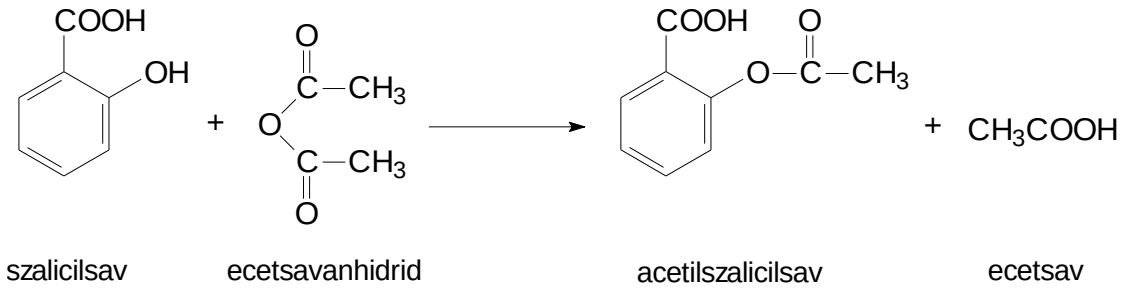
Csak jóval később került napvilágra az a tény, hogy a szalicin szalicilsavvá történő átalakulása az emberi szervezetben is lejátszódik, azaz a szalicin aktív metabolitja valójában a szalicilsav (52).

A szalicilsav szintetikus előállítására Kolbe marburgi professzor dolgozott ki módszert 1859-ben. Az eljárás lényege, hogy a fenol nátriumsóját magas nyomáson, szén-dioxid-áramban 140°C-on hevítik, ekkor a szalicilsav nátriumsója keletkezik, amelynek hideg vizes oldatából savanyításra a szalicilsav kristályosan kiválik (5. ábra). A növekvő szükséglet kielégítésére ezt a reakciót Heyden, Kolbe tanítványa ipari szintézissé fejlesztette tovább és a szalicilsav-termelésre gyárat alapított Drezdában (53).



5. ábra. *A Kolbe-féle szalicilsav-szintézis.*

Az ipari szintű gyártás elindítását követően igen nagy jelentőséggel bírt az a felfedezés, miszerint a szalicilsav a reuma kezelésében is nagyon hatékony. A XIX. század hetvenes-nyocvanas éveiben a szalicilsav volt a reuma leghatékonyabb gyógyszere (54). A krónikus reumás fájdalom kezelésében alkalmazott magas (4-6 g/nap) dózist azonban súlyos mellékhatások kísérték (pl.: gyomorhurut, fülzúgás), amelyek elkerülése érdekében kisebb adagban is effektív, jobban tolerálható szer fejlesztése vált szükségessé. A megoldást Hoffmann találta meg 1897-ben: a szalicilsav kémiai módosításával - fenolos hidroxilcsoportját acetilezve - acetilszalicilsavat állított elő (6. ábra), amely a Bayer cég gyógyszerészeti részlegéből 1899-ben Aspirin néven került forgalomba. Az Aspirin a mai napig is a legnagyobb mennyiségben előállított gyógyszerek közé tartozik, a szalicilsavhoz viszonyítva csekélyebb mértékű mellékhatásokkal rendelkezik.



6. ábra. *A Hoffmann-féle acetilszalicilsav-szintézis.*

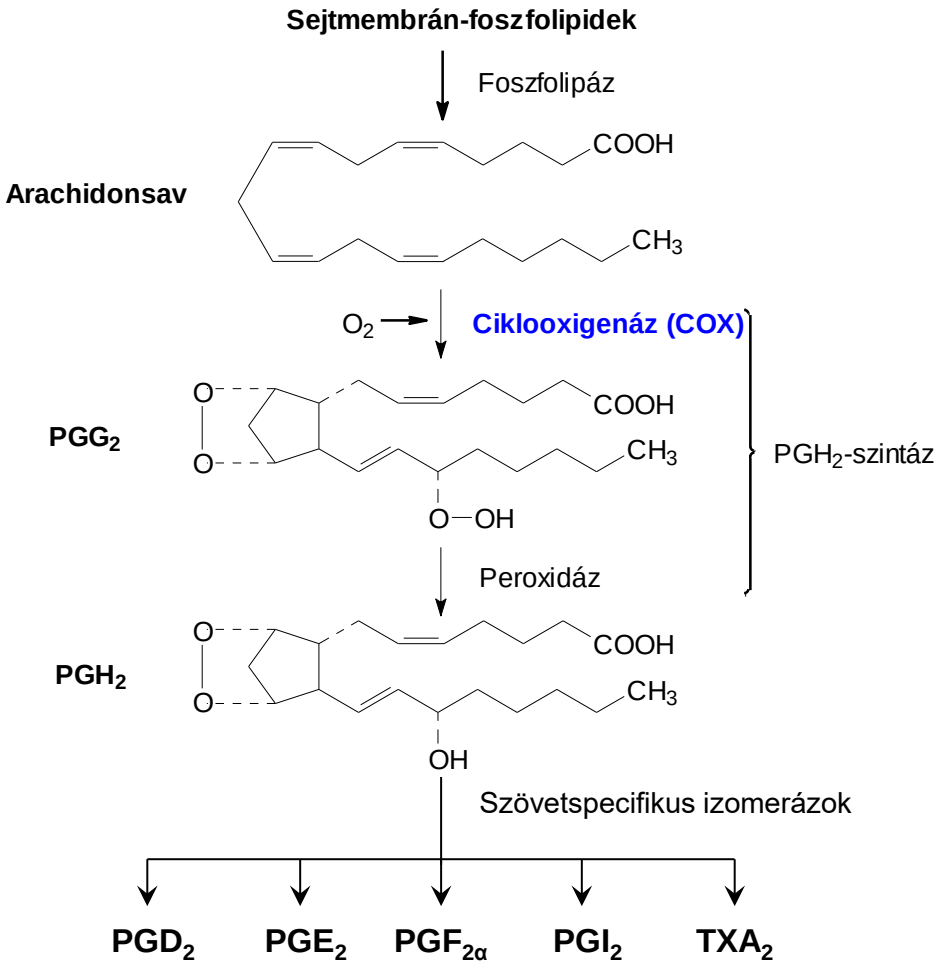
II.2.1 A szalicilátok hatásai

II.2.1.1 Farmakológiai szempontból jelentős hatások

A prosztaglandinok és a leukotriének a természetes lipidmediátorok egy olyan csoportját alkotják, amelyek az arachidonsav (5,8,11,14-eikozatetraénsav) oxidációjával keletkeznek.

Közös szerkezeti sajátosságuk, hogy húsz szénatomból álló vázzal rendelkeznek, ezért gyűjtőnéven *eikozanoidok*nak nevezzük őket. Az arachidonsav a sejtmembrán-foszfolipidek alkotóeleme, foszfolipáz (PL) enzimek hatására válik hozzáférhetővé az eikozanoidok szintézisében résztvevő ciklooxigenáz-, lipoxigenáz-, hidroxiláz- és epoxigenáz-típusú enzimek számára.

A szalicilátok a prosztaglandinok (PG-ok) bioszintézisét elindító ciklooxigenáz (COX) enzimek gátlói. A COX enzimek hatására az arachidonsavból rövid életidejű ciklikus endoperoxidokon (PGG_2, PGH_2) keresztül prosztaglandinok és tromboxánok keletkeznek (7. ábra).



7. ábra. *A prosztaglandinok bioszintézise.*

A prosztaglandinok G-proteinhez kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A szervezetben nincs még egy olyan vegyületcsalád, amelynek hasonlóan sokszínű, szerteágazó és eltérő biológiai hatásai lennének, mint a prosztaglandinoknak. Szerepet játszanak az idegsejtek ingerületátvitelében, a vérképzésben, a vérkeringés és a vérnyomás szabályozásában, a nyálkahártyák integritásának, az érfal átjárhatóságának és a simaizmok

(gyomor, méh, érfal) működésének szabályozásában, az immunrendszer működésében, a gyulladás, a láz és a fájdalom kialakulásában, valamint az alvás/ébrenlét ciklus szabályozásában (55).

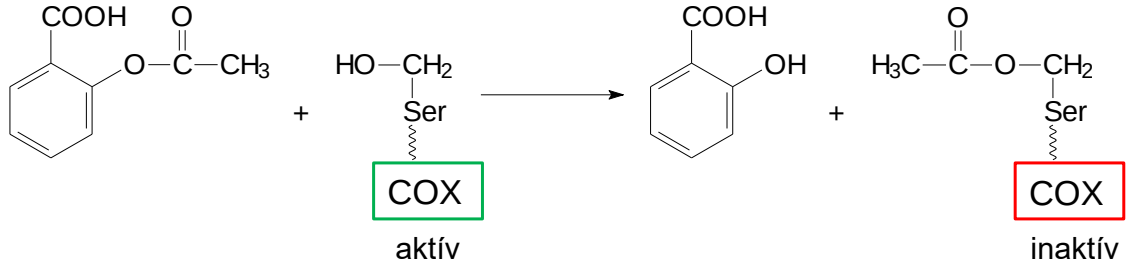
A ciklooxigenáz enzimrendszernek három izoformája ismert, a COX-1, COX-2 és COX-3 izoenzimek, amelyek közül a COX-3 a COX-1 enzim variánsa (56; 57). Az izoenzimek közötti különbséget szubsztrát- és inhibitor-szelektivitásuk adja. A szalicilátok nem rendelkeznek enzimszelektivitással, mai tudásunk szerint a COX-1 és COX-2 izoenzimeket gátolják (58). A COX-1 konstitutív enzim, amely a legtöbb szövetben (pl.: gyomor, vérlemezke, vese) expresszálódik, és az élettani funkciók szabályozásában szerepet játszó prosztaglandinok szintéziséért felelős. A COX-2 indukálható enzim, amely a gyulladásban szerepet játszó prosztaglandinokat szintetizálja és citokinek, mitogének, endotoxinok hatására aktiválódik a gyulladásos szövetekben. Az egyes izoenzimek szerepe természetesen nem határolódik el ilyen élesen egymástól, bizonyos mértékben a COX-1 is szerepet játszik a gyulladásos folyamatok kialakításában, mint ahogyan a COX-2 is betölt konstitutív funkciót (pl.: a központi idegrendszerben és a vesében). Az egyes sejttípusokban jelenlevő prosztaglandinok mennyisége és összetétele nagyon eltérő és ezt a variabilitást számtalan, a sejt alapvető funkciójával összefüggő külső és/vagy sejten belüli hatás befolyásolhatja (55).

A ciklooxigenáz rendszer gátlásával a prosztaglandin-funkciókban működészavar támad, ennek következményeként alakul ki a szalicilátok terápiás jelentőségű láz- és fájdalomcsillapító, valamint gyulladáscsökkentő hatása. Ugyanakkor ez a működészavar tehető felelőssé az olyan mellékhatások megjelenéséért is, mint például a gyomor- és bél-nyálkaháryakárosító (ulcerogén) hatás, vagy a nefrotoxicitás (59; 60).

Az arachidonsav-útvonal kaszkád-jelentőségének felismeréséért 1982-ben Vane, Bergström és Samuellson orvosi Nobel-díjban részesültek. Felfedezésük mérföldkövet jelentett a szalicilátok és az egyéb nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (pl.: indometacin, ibuprofén, diklofenák) pontos hatásmechanizmusának feltérképezésében. Kutatásuk nyomán derült fény a ciklooxigenáz enzimek gátlásának lehetséges módjaira (irreverzibilis és reverzibilis kompetitív gátlás) és arra is, hogy az egyes nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyületek eltérő mértékben hatnak a COX enzimekre (61; 62).

Az 1899 óta forgalomban lévő acetilszalicilsav fájdalomcsillapító, lázcsillapító és gyulladáscsökkentő hatása az intakt molekula acetil- és szalicilát-részének, valamint a belőle képződő aktív szalicilát-metabolitnak egyaránt köszönhető. Az acetilszalicilsav relatív szelektív COX-1 gátló, azaz erősebben gátolja a COX-1-et, mint a COX-2-t. Irreverzibilesen

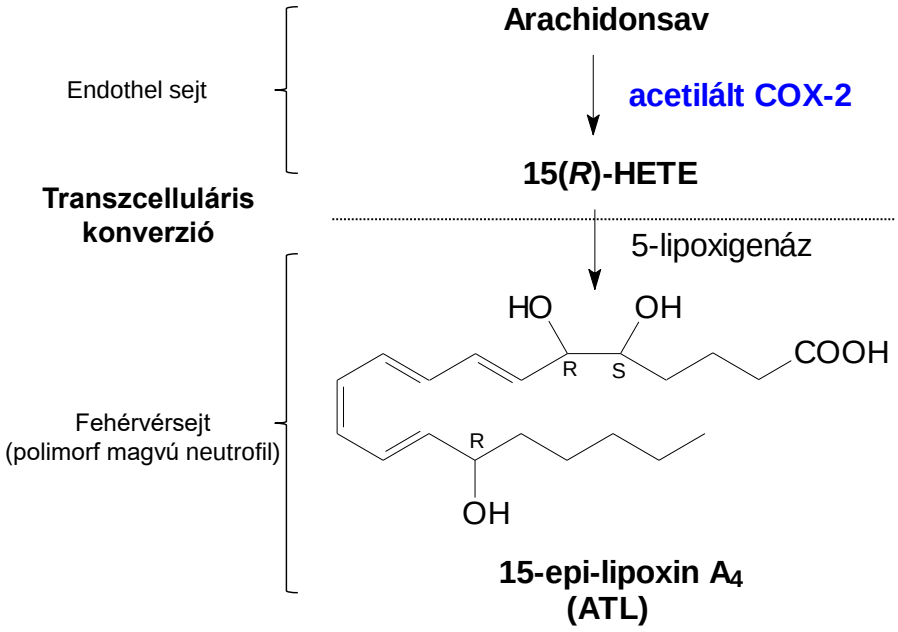
blokkolja mindkét izoenzimet azáltal, hogy szelektíven acetilálja azoknak egy meghatározott szerin oldalláncát (63; 64) (8. ábra).



8. ábra. *Az acetilszalicilsav szalicilsav képződése közben irreverzibilisen gátolja a ciklooxigenáz enzimet.*

Az acetiláció következtében az arachidonsav kötődése a COX katalitikus helyéhez sztérikusan akadályozott, így a prosztaglandin-szintézis csak új enzimmolekulák képződésével valósulhat meg a sejtben. A sejtmaggal nem rendelkező sejtek nem képesek a ciklooxigenáz enzimek regenerálására, így például vérlemezkékben az acetilszalicilsav COX-1 enzimet bénító hatásának időtartama azonos a vérlemezke élettartamával (8-11 nap). A vérlemezkékben a COX-1 enzim hatására képződő TXA2 (tromboxán A2) az ereket összehúzza és elősegíti a trombociták aggregációját. Kis dózisban adott acetilszalicilsav hatására a TXA2 képződés visszaszorul, az így kialakuló antiaggregációs hatás terápiás értékű, amit kihasználnak az embolizáció profilaxisában, azonban nem kívánt hatásként a vérzési idő megnyúlása jelentkezhet (65).

A COX-2 enzim acetilálása a prosztaglandin-szintézis gátlásán túl 15(*R*)-hidroxi-eikozatetraénsav (15(*R*)-HETE) képződését eredményezi, amely a polimorf magvú neutrofil granulocitákban az 5-lipoxigenáz enzim szubsztrátjaként 15-epi-lipoxin A_4, másnéven „aspirin triggered lipoxin” (ATL) vegyületté alakul. Ezen leukotrién-szerű mediátor prosztaciklinhez (PGI_2) hasonló gasztroprotektív hatással rendelkezik, amellyel némiképpen ellensúlyozza az acetilszalicilsav nyálkahártyakárosító hatását (66; 67; 68) (9. ábra).



9. ábra. *Az acetilált COX-2 enzim hatására az arachidonsavból gyulladáscsökkentő lipoxin („aspirin triggered lipoxin"; ATL) keletkezik.*

Nagyobb koncentrációban az acetilszalicilsav más molekulákat, például egyéb fehérjéket vagy DNS-t is képes nem-szelektíven acetilálni (69; 70; 71).

A nem acetilált szalicilátszármazékok vérlemezke-aggregációt gátló hatással nem rendelkeznek. Ezen vegyületek reverzibilisen (hidrogén-híd képzés útján) a COX enzim aktív helyének egy meghatározott arginin-oldalláncához kapcsolódva sztérikusan gátolják az arachidonsav katalitikus helyhez való kötődését (61).

II.2.1.2 A szalicilátok egyéb hatásai

Antiszeptikus hatás

A szalicilsavat antiszeptikus hatása miatt korábban befőttek és más élelmiszerek (pl.: hús, tej) tartósítására használták. Ilyen célokra ma már elterjedtebb a nátrium-benzoát használata. A szalicilsav igen nagy hatékonyságot mutat számos mikroorganizmus elpusztításában (pl.: *Microsporum gypseum, Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus intermedius, Candida albicans*), így napjainkban fültisztító oldatok és akne-ellenes készítmények hatóanyagaként kerül külsőleges felhasználásra. Nagyobb koncentrációban (10 %) keratolítikus, kisebb koncentrációban (2-3 %) keratoplasztikus hatású, ezért a kozmetikai ipar is széles körben alkalmazza.

Húgysavürítő hatás

Már a 19. században megfigyelték, hogy nagy dózisban adott szalicilát hatására fokozódik a húgysav ürítése (uricosuriás hatás). A szalicilátok gyulladáscsökkentésben alkalmazott dózisa nagyobb, mint a fájdalomcsökkentés eléréséhez szükséges dózis. A szalicilátok gyulladásgátló dózisa húgysavürítést fokozó hatású, míg fájdalomcsillapításhoz szükséges adagja húgysavretenciót okoz.

Daganatképződés megelőzése

Az acetilszalicilsav a rosszindulatú tumoros elváltozások növekedését és a tumoros sejtek proliferációját is befolyásolja. Hatékonyságát kemopreventív szerként több kutatócsoport vizsgálta és igazolta.

Vastagbéleredetű daganatokban kimutatható a COX-2 gén átíródásának szignifikáns fokozódása, amely jelentős prosztaglandinszint (PGE2)-növekedéssel jár együtt. A magas PGE2-szint a prosztanoidreceptorok szabályozásának megváltozásával társul, és a két folyamat eredményeként emelkedett cAMP-szint mutatható ki a szövetekben. Az acetilszalicilsav a PGE2-termelés csökkentése mellett a tumor promoter által indukált COX-2 expressziót is gátolja (72; 73). A COX-2 enzim aktivitása nyomán keletkezik néhány egyéb olyan termék is a szervezetben, amely direkt mutagén hatással rendelkezik (pl.: malondialdehid), vagy képes karcinogéneket aktiválni (pl.: hidroperoxil-gyök); a COX-2 gátlása révén ezen termékek képződése visszaszorul.

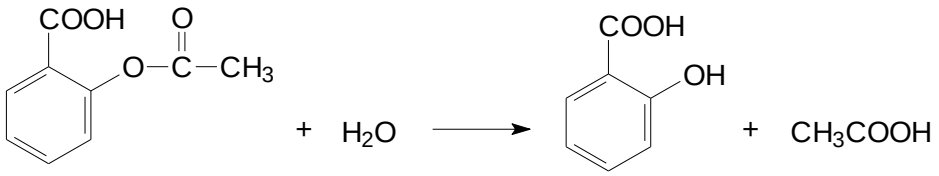
Az acetilszalicilsav egyéb, a COX enzimektől független módon is befolyásolhatja a sejtek jelátviteli folyamatait, például transzkripciós faktorok (NFκB, AP-1) módosításával, vagy a hibás nukleotidpárokat javító, úgynevezett „mismatch repair” génekkel történő interakció révén. Az utóbbi hatásokat szalicilsav használata esetén is megfigyelték *in vitro*, mM-os koncentrációtartományba eső dózisok alkalmazása esetén. Ekkora koncentrációban azonban a szalicilátok szétkapcsolják az oxidatív foszforilációt és a sejtek metabolikus zavarát okozhatják, különösen a nagy energiaforgalmú, emelkedett metabolikus aktivitással rendelkező sejtek, mint például a daganatos sejtek esetében (74).

Összességében elmondható, hogy bár az acetilszalicilsav tumorellenes hatása összetett és sok szempontból kevéssé ismert, a klinikai vizsgálatok alapján a hosszú távú acetilszalicilsav-kezelés 50%-kal csökkentette a kolorektális karcinómák kialakulásának kockázatát (75; 76; 77; 78; 79).

II.2.2 Szalicilátok sorsa a szervezetben

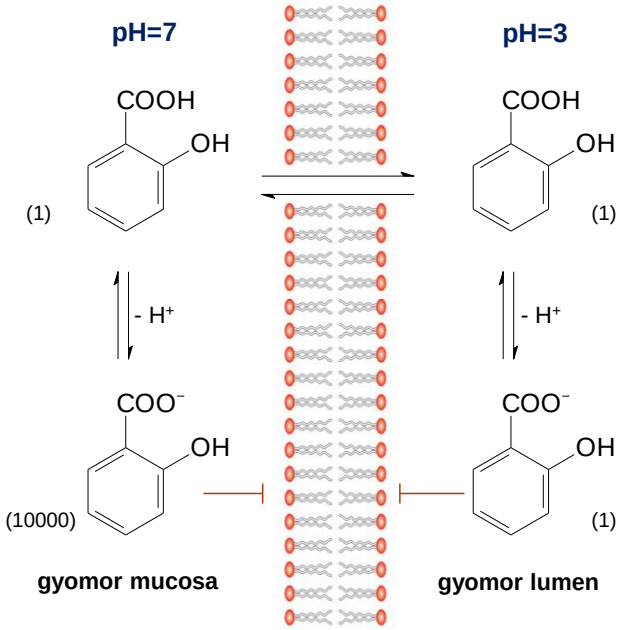
II.2.2.1 Szalicilátok felszívódása és megoszlása

A szalicilsav és az acetilszalicilsav egyaránt savas karakterű vegyületek ($pK_{a(SA)}$=3,00; $pK_{a(ASA)}$=3,50). A szalicilsavat erős ulcerogén hatása miatt orálisan ma már nem alkalmazzák, ezen hatásának enyhítése céljából állították elő kevésbé savas karakterű származékát, az acetilszalicilsavat. Az acetilszalicilsav észter típusú vegyület, hidrolitikus bomlása nem-enzimkatalizált reakcióban savas és lúgos környezetben is lejátszódik, amelynek eredményeképpen szalicilsav keletkezik (10. ábra).



10. ábra. *Az acetilszalicilsav hidrolízise során szalicilsav és ecetsav keletkezik.*

A gyomor savas környezetében (pH 1,2-2,5) a nem-ionizált molekuláris forma igen magas aránya kiváló membránátjárhatóságot biztosít, segítve ezzel a szalicilátok passzív diffúzióval történő felszívódását. A gyomor mucosa-sejtjeibe történő diffúziót követően a lumen és a mucosa (pH 7,2-7,4) között fennálló iongrádiens hatására az ionizált forma kerül túlsúlyba ($[A^-]/[HA]$=10000), majd intracellulárisan „csapdába esve” felhalmozódik és a nyálkahártya károsodását idézi elő (11. ábra). Ezen mellékhatása miatt az acetilszalicilsavat tartalmazó hatóanyag-leadó rendszereket gyakran látják el enteroszolvens (bélben oldódó) bevonattal.



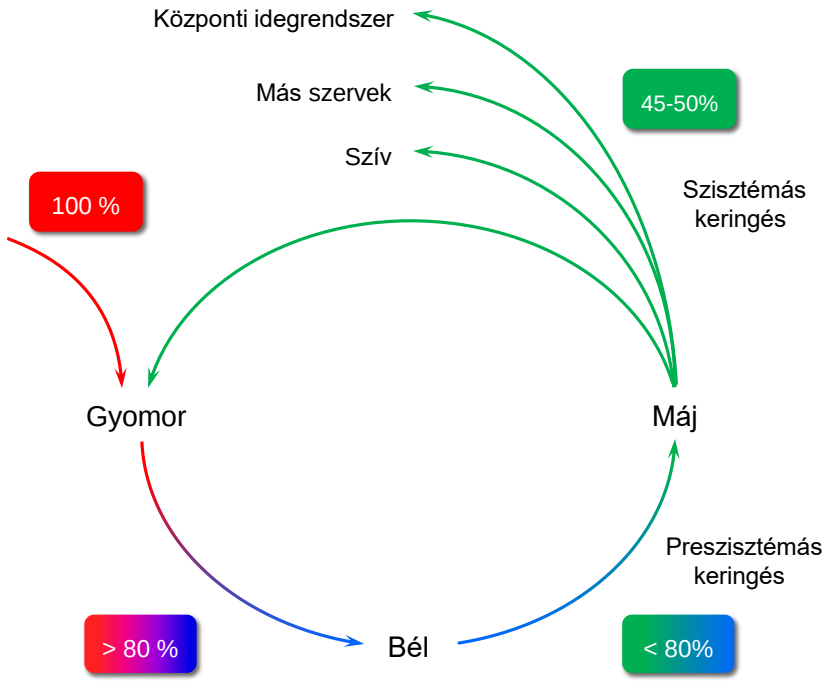
11. ábra. *A szalicilsav lokális felhalmozódása a gyomor mucosa-sejtjeiben – „csapda hipotézis”.*

A gyomrot elhagyva a gasztrointesztinális traktus pH-ja fokozatosan emelkedik. (A duodenum kezdeti szakaszán 2,0-4,0, távolabbi szakaszán 7,0 körüli a pH.) Ilyen környezetben a szalicilátok ionos, vízoldható formája válik dominánssá. Az ionos forma túlsúlya ellenére a szalicilátok vékonybélből történő felszívódása igen jelentős, ami a vegyületek jobb oldékonyságának és a vékonybél gyomornál lényegesen nagyobb felszínének (100-200 m^2) köszönhető (80; 81; 82; 83; 84; 85). A szalicilátok nem-ionizált formájának passzív diffúziója mellett specifikus carrier-mediált transzportfolyamatok (pl.: organikus anion transzporter-1; OAT-1) is fontos szerepet játszanak a savas karakterű gyógyszervegyületek vékonybélből történő felszívódásban (85).

A felszívódást követően az acetilszalicilsav hidrolízise szöveti- és plazma-észterázok által tovább folytatódik; az első májátáramlást követően az ASA mintegy 50%-a szalicilsavvá alakul. Ennek eredményeképpen egy acetilszalicilsav-tartalmú készítmény a szisztémás keringést elérve kb. 1:1 arányban tartalmazza a két farmakológiailag aktív hatóanyagot (acetilszalicilsavat és szalicilsavat) (12. ábra).

A felszívódáshoz hasonlóan, a szalicilátok szövetek közötti megoszlását főként a plazmafehérjéhez nem kötődő szalicilátfrakció pH-függő passzív diffúziója határozza meg. A plazmafehérjéhez való kötődés főként a szalicilátok fenolos hidroxilcsoportjának tulajdonítható (86; 87), így a nem-kötődő szalicilátfrakció koncentrációját az alkalmazott

acetilszalicilsav dózisa szabja meg. Alacsony (trombocita-aggregációt gátló) dózis bevétele esetén a látszólagos megoszlási térfogat 0,2 L/kg, ami megfelel a szalicilátok nagymértékű plazma-kötődésének (80-95%). Magasabb (gyulladásgátló) dózisok alkalmazása esetén a plazmafehérjéhez való kötődés illetve a metabolizáló enzimrendszerek telítődése miatt a látszólagos megoszlási térfogat 0,5 L/kg-ra nőhet (88; 89; 90).



12. ábra. *Per os alkalmazott acetilszalicilsav biohasznosulása. Orális alkalmazást követően (100%) a hatóanyag több mint 80%-a változatlan formában eléri a vékonybél felső szakaszát. A felszívódott acetilszalicilsav mintegy 50%-a hidrolízist szenved a preszisztémás keringésbe kerülve, a fennmaradó 45-50% éri csak el a szisztémás keringés révén a szerveket.*

II.2.2.2 Szalicilátok metabolizmusa és eliminációja

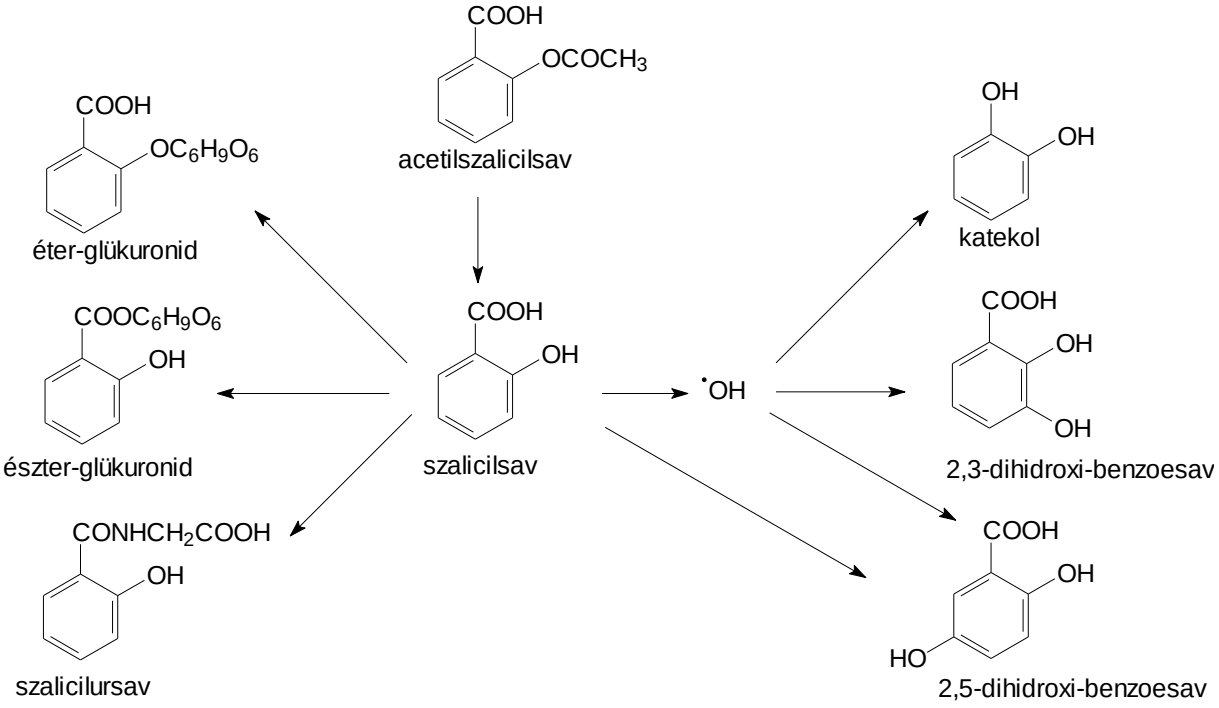
Az acetilszalicilsav nem-enzimatikus hidrolízise már a gyomorból illetve a vékonybélből történő felszívódás során elkezdődik, majd a felszívódást követően a szöveti- és plazma-észterázok által tovább folytatódik. A hidrolízis eredményeképpen keletkező szalicilsav az ASA primer metabolitja, amely főként a máj enzimrendszere által alakul tovább. A metabolizmus egyik lehetséges útja az oxidáció, amely enzimkatalizált és nem-enzimkatalizált módon egyaránt végbemehet. Mikroszómális oxidáció során a CYP2E1 enzim által katalizált reakcióban szalicilsavból 2,5-dihidroxibenzoesav (gentizinsav) keletkezik. Az

aromás gyűrű hidroxilációja nem-enzimatikus módon, hidroxilgyökök hatására is végbemehet, ilyenkor a már említett 2,5-dihidroxibenzoesav mellett 2,3-dihidroxibenzoesav és dekarboxilációt követően katekol képződése is kimutatható (91; 92).

A szalicilsav legnagyobb mennyiségben képződő metabolitjai konjugációs reakciókban keletkeznek. Glicinnel történő konjugáció eredményeképpen szalicilursav (70-75%), UDP-glükuroniltranszferázok által katalizált reakciókban éter- és észter-típusú glükuronidok (15%) keletkeznek (13. ábra). (A korábban említett, enzimkatalizált és nem-enzimkatalizált reakciókban egyaránt keletkező gentizinsav glicinnel konjugálódva gentizin-húgysavat képezhet.)

A szalicilátok teljes lebontása alacsony dózisok esetén elsőrendű, magasabb dózisok esetén nulladrendű és elsőrendű kinetikát követ. Az acetilszalicilsav eliminációs féléletideje a plazmában az érzékenynek mondható észterkötés miatt meglehetősen rövid, kb. 15-20 perc. A szalicilsav felezési ideje ennél jóval hosszabb, kb. 3-5 óra, de tartós, nagydózisú acetilszalicilsav-szedés esetén a metabolizáló folyamatok telítődése miatt akár 30 óra is lehet (26).

A szalicilsav kis mennyiségben változatlan formában ürül a vizelettel, anyagcseretermékei is nagyrészt a vizelet által választódnak ki, bár a vesén keresztüli eliminációjuk nagymértékben pH-függő (93).



13. ábra. *Az acetilszalicilsav biotranszformációjának lehetőségei.*

II.2.2.3 Szalicilátok interakciói

A szalicilsav a plazmafehérjékhez erősen kötődni tudó gyógyszereket képes leszorítani kapcsolódási helyeikről, megemelve ezzel plazmakoncentrációjukat. Ilyen gyógyszerek többek között az acetazolamid, a metotrexát, a penicillin, a feintoin, a valproesav, a szulfinpirazon és a warfarin (94).

II.2.3 Acetilszalicilsav tartalmú készítmények

Az acetilszalicilsav Magyarországon az alábbi terápiás indikációkban van forgalomban: (1) *fájdalom- és lázcsillapítóként* 500 mg hatóanyagot (vagy annak sóját) tartalmazó tabletta, bevont tabletta, belsőleges por, oldatos injekció vagy pezsgőtabletta formájában, (2) *trombocita-aggregáció gátlóként* (kombinációban is: bizoprololllal, dipiridamollal, ezomeprazollal) 75-300 mg hatóanyagot (vagy annak sóját) tartalmazó gyomornedv-ellenálló tabletta vagy kapszula illetve belsőleges por formájában, továbbá (3) *meghűléses betegségek kezelésében* aszkorbinsavval vagy pszeudoefedrinnel kombinálva 500 illetve 800 mg hatóanyagot tartalmazó belsőleges por vagy pezsgőtabletta formájában.

3. táblázat. *Magyarországon forgalomban lévő néhány acetilszalicilsav-tartalmú készítmény.*

Készítmény neve	Hatóanyag	Gyártó
Aspirin tabletta (500 mg)	acetilszalicilsav	Bayer Hungária Kft.
Kalmopyrin tabletta (500 mg)	kalcium-acetilszalicilát	Richter Gedeon Nyrt.
Aspirin Ultra bevont tabletta (500 mg)	acetilszalicilsav	Bayer Hungária Kft.
Aspirin Effect szájban diszpergálódó granulátum (500 mg)	acetilszalicilsav	Bayer Hungária Kft.
Alka-seltzer pezsgőtabletta (324 mg)	acetilszalicilsav	Bayer Hungária Kft.
Aspegic oldatos injekció (100 mg/ml)	lizin-acetilszalicilát	Sanofi-Aventis Zrt.
Aspegic por belsőleges oldathoz (500, 1000 mg)	lizin-acetilszalicilát	Sanofi-Aventis Zrt.
Astrix gyomornedv-ellenálló kemény kapszula (100 mg)	acetilszalicilsav	TEVA Gyógyszergyár Zrt.
Aspirin Protect gyomornedv-ellenálló bevont tabletta (100, 300 mg)	acetilszalicilsav	Bayer Pharma AG
ASA Protect Pharmavit gyomornedv-ellenálló filmtabletta (100 mg)	acetilszalicilsav	PharmaSwiss Ceská
Asasantin retard kapszula (100 mg)	acetilszalicilsav dipiridamol	Boehringer Ingelheim Int.
Bisoblock Plus kemény kapszula (75, 100 mg)	acetilszalicilsav	Actavis Group
Aspaxa kemény kapszula (81 mg)	acetilszalicilsav ezomeprazol	AstraZeneca Kft.
Kardegic por belsőleges oldathoz (75, 100, 160, 300 mg)	lizin-acetilszalicilát	Sanofi-Aventis Zrt.
Asactal gyomornedv-ellenálló tabletta (75, 100, 150, 160 mg)	acetilszalicilsav	Actavis Group
ASA Sandoz gyomornedv-ellenálló tabletta (100 mg)	acetilszalicilsav	Sandoz Hungária Kft.
Aspirin Komplex granulátum belsőleges szuszpenzióhoz (500 mg)	acetilszalicilsav pszeudoefedrin	Bayer Hungária Kft.

Aspirin Komplex forró ital granulátum belsőleges szuszpenzióhoz (500 mg)	acetilszalicilsav pszeudoefedrin-hidroklorid	Bayer Hungária Kft.
Aspirin Plus C pezsgőtabletta (500 mg)	acetilszalicilsav aszkorbinsav	Bayer Hungária Kft.
Aspirin Plus C Forte pezsgőtabletta (800 mg)	acetilszalicilsav aszkorbinsav	Bayer Hungária Kft.

II.3 Az aromás hidroxiláció nem-enzimkatalizált mechanizmusai

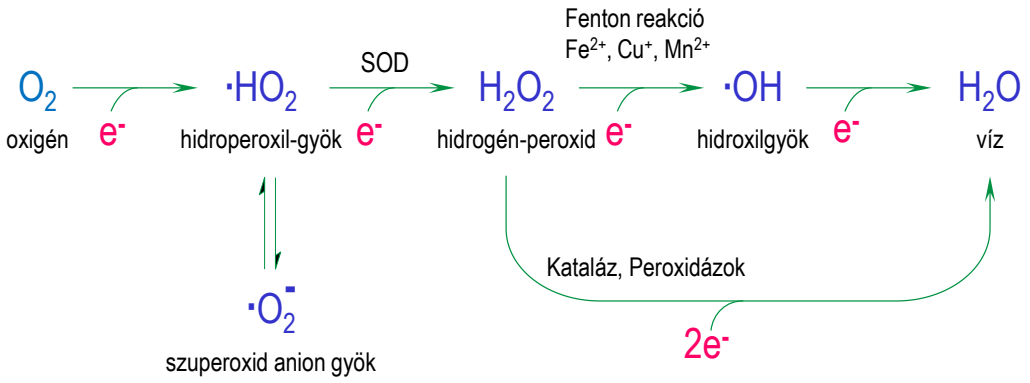
Az emberi szervezetben számos olyan enzim működik, amelyek aromás gyűrűvel rendelkező endogén és exogén vegyületek *in vivo* hidroxilációját katalizálják. Ilyenek pl.: a fenilalanin → tirozin átalakulást katalizáló fenilalanin-hidroxiláz (95) vagy a szalicilsav → 2,5-dihidroxibenzoesav átalakulásban szerepet játszó CYP2E1 enzim (92). A gyógyszeres terápiában alkalmazott legtöbb vegyület aromás elektronszerkezettel rendelkezik és ezek közül számos vegyület biotranszformációja során megfigyelhető hidroxilált metabolitok keletkezése. A gyógyszermetabolizmus során megfigyelhető nagyszámú hidroxi-származék keletkezése specifikus enzimkatalizált reakciók mellett több nemspecifikus mechanizmus (pl.: Fenton-reakció, Udenfriend-reakció) működését is feltételezi.

II.3.1 Fenton-modell

A modell alapját képező reakciót H. J. H. Fenton írta le a 19. században. A klasszikus Fenton-reakció során vas(II)-ionok hidrogén-peroxiddal való reakciójában hidroxilgyökök ($OH^{\cdot}$) képződnek (14. ábra). (A hidroxilgyökök hidrogén-peroxidból való képződését egyéb vegyértékváltó/redox-aktív fémionok pl.: réz(I) és mangán(II) is katalizálni képesek.)

A hidroxilgyök a legreaktívabb oxigénszármazék, igen rövid életideje miatt (10^{-9} s) azonosítása meglehetősen nehéz. Párosítatlan elektronja révén nemspecifikus módon képes oxidálni a celluláris molekulákat és sejtorganellumokat. A Fenton-reakció lejátszódásának pH-optimuma savas tartományban van (pH 3-4), de fiziológiás körülmények között is lejátszódik (96; 97; 98); így szerepet játszhat a gyógyszermolekulák biotranszformációjában.

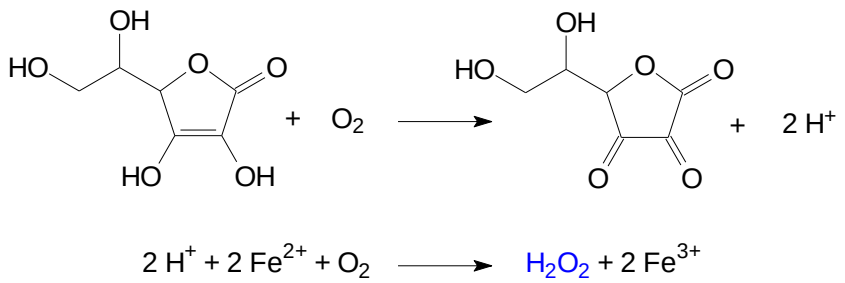
A hidroxilgyökök számára az aromás rendszerek támadáspontot jelentenek, mivel a gyökök párosítatlan elektronjukkal kötés kiépítésére törekszenek. A reakció egyszerre többféle termék képződését eredményezi.



14. ábra. *Reaktív oxigénszármazékok keletkezésének mechanizmusa.*

II.3.2 Udenfriend-modell

S. Udenfriend és munkatársai 1954-ben elvégzett kísérletei során egy, a Fenton-reakcióval nagy rokonságot mutató nem-enzimkatalizált, aromás rendszerekre kiterjedő hidroxilációs mechanizmus felfedezésére került sor (99). A rendszer fontos elemét képezi az éndiol funkcióval rendelkező aszkorbinsav, amelynek oxigénatmoszférában lejátszódó autooxidációja során, fémion (pl.: vas(II)-ion) jelenlétében hidrogén-peroxid keletkezése feltételezhető (15. ábra) (100).



15. ábra. *Hidrogén-peroxid képződésének feltételezett mechanizmusa az Udenfriend-rendszerben.*

Udenfriend és munkatársai több endogén és exogén molekula (pl.: tiramin, anilin, szalicilsav) Udenfriend-rendszerben való átalakulását megvizsgálták és bizonyították, hogy a reakció nitrogénatmoszférában nem játszódik le, továbbá, hogy az aszkorbinsav önmagában nem rendelkezik hidroxilációs képességgel. A reakció végbemenetelét igen széles pH-tartományban (pH 2,0-7,5) tanulmányozták. Az Udenfriend-rendszerben lejátszódó oxidáció a Fenton-reakcióval ellentétben régiószelektív, nukleofil szénatomokra irányítódik (101; 102). Az aszkorbinsav és a vas(II)-ionok emberi szervezetben való együttes jelenléte miatt az Udenfriend-rendszer vélhetően szerepet játszik az aromás vegyületek hidroxilációjában.

III Célkitűzések

A nemszteroid-gyulladásgátló szerek okozta gyomornyálkahártya-károsodás kivédése céljából acetilszalicilsav mellett kis dózisú kapszaicinoidot is tartalmazó gyógyszer fejlesztése indult el a Pécsi Tudományegyetemen 2006-ban, a MEDIPOLISZ Regionális Egyetemi Tudásközpont (RET) támogatásával. Orális alkalmazású, gyógyszer kategóriába tartozó kapszaicinoid-tartalmú készítmény fejlesztése kapcsán Intézetünk feladatul kapta kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok és preklinikai állatkísérletekből származó plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására alkalmas analitikai módszerek fejlesztését. Új módszer fejlesztését a következő tette indokolttá: Capsaicin névvel jelölt kapszaicinoid-tartalmú alkaloida-keverék hatóanyagként az Amerikai Gyógyszerkönyvben (U.S. Pharmacopoeia; USP) hivatalos, viszont a cikkelyben található folyadékkromatográfiás meghatározás kis érzékenysége és nagy időszükséglete miatt nem alkalmas alacsony koncentrációjú kapszaicinoid-tartalmú minták gyors analízisére (103). A preklinikai állatkísérletekből származó minták vizsgálata során nem várt eredményt tapasztaltunk, miszerint a két legnagyobb mennyiségben előforduló kapszaicinoid-komponens még nagy dózisok adását követően sem volt kimutatható a vizsgált állatok plazmájában. Ezen eredmények alapján a kapszaicinoidok preszisztémás átalakulásait feltételezve indokolttá vált a vegyületek *in vivo* felszívódásának és extrahepatikus metabolizmusának vizsgálata. (Az extrahepatikus szövetek, különösen a vékonybél, jelentős szerepet játszik a fenolos karakterű vegyületek biotranszformációjában (104; 105).)

Az acetilszalicilsav 1899-ben történt forgalomba kerülése óta az egyik legnagyobb mennyiségben előállított gyógyszervegyület. Gyulladáscsökkentő, fájdalom- és lázcsillapító, valamint trombocita-aggregációt gátló hatása mellett egyéb indikációkban (pl.: daganatmegelőzés) való alkalmazása is felmerült az utóbbi évtizedekben. Az acetilszalicilsav legfőbb mellékhatásának (nyálkahártya-károsító hatás) kivédése céljából elterjedtté vált az enteroszolvens bevonattal rendelkező gyógyszerformák fejlesztése és alkalmazása; ugyanakkor kevéssé ismert az acetilszalicilsav, illetve a belőle képződő fenolos karakterű szalicilsav sorsa a vékonybélben.

A legtöbb gyulladásos (pl.: rheumatoid arthritis) és neurodegeneratív kórkép (pl.: Alzheimer-kór, Parkinson-kór), anyagcserebetegségek (pl.: cukorbetegség), továbbá a szív- és érrendszeri betegségek patomechanizmusának hátterében egyaránt kimutatható a reaktív oxigénszármazékok (ROS) fokozott aktivitása (92; 106). A ROS tagjai szinte kivétel nélkül a molekuláris oxigén többlépéses elektronfelvétele során képződnek és igen nagy

reakciókészséggel bírva képesek az endogén és exogén molekulákat nem-specifikus, nem-enzimkatalizált reakcióban oxidálni (106). Például, acetilszalicilsavval kezelt rheumatoid arthritisben szenvedő egyéneknél megfigyelhető a kizárólag nem-enzimkatalizált reakcióban keletkező szalicilát-metabolitok (pl.: 2,3-dihidroxibenzoesav) mennyiségének szignifikáns emelkedése (92). Ilyen módon a szalicilsav gyökfogó (antioxidáns) hatással rendelkezik. Fontos azt is megemlíteni, hogy a szalicilsav nagyobb dózisban szétkapcsolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt, amelynek eredményeképpen megnöveli az oxigénfelvételt, így fokozza a reaktív oxigénszármazékok képződésének valószínűségét (80). Így tehát, a szalicilátok nem-enzimatikus átalakulásai révén képződő szalicilát-metabolitok és reaktív oxigénszármazékok jelenléte a szervezetben több kérdést is felvet, pl.: mennyiben járulnak hozzá ezek a vegyületek a szalicilátok mellékhatásaihoz, illetve szerepet játszanak-e a szalicilátok ma még nem teljesen tisztázott egyéb hatásmechanizmusaiban?

Munkánk során az alábbiakat tűztük ki célul:

1. Kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok minősítése céljából kapszaicin és dihidrokapszaicin tartalmi meghatározására alkalmas validált nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer fejlesztése és alkalmazása.
2. A kapszaicinoidok toxikokinetikai vizsgálata céljából, minősített kapszaicinoid-tartalmú készítménnyel kezelt beagle kutyák plazma mintáinak analízisére alkalmas mintaelőkészítési eljárás és validált HPLC módszer kidolgozása, a minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására.
3. Kapszaicinoidok *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a keletkező metabolitok szerkezetének igazolása.
4. Szalicilsav és hidroxilált metabolitjai (2,3-dihidroxibenzoesav és 2,5-dihidroxi-benzoesav) elválasztására alkalmas validált HPLC módszer fejlesztése.
5. Szalicilsav vékonybélből való felszívódásának vizsgálata *in vivo* patkány-modellen.
6. Szalicilsav *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a keletkező metabolitok szerkezetének igazolása.
7. Szalicilsav *in vitro* oxidatív átalakulásainak Fenton- és Udenfriend-inkubálás során való vizsgálata.

IV Vizsgálati módszerek

IV.1 Kapszaicinoidok gyógyszeralapanyagból való meghatározására alkalmas validált HPLC-DAD módszer fejlesztése

Gyógyszeralapanyagként történő felhasználás céljával előállított kapszaicinoid-extraktum kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására validált, diódasorral (DAD) kapcsolt HPLC-módszert fejlesztettünk. A módszert az Asian Herbex Ltd. által előállított kapszaicinoid-extraktum és a Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard USP szerinti minősítésére alkalmaztuk.

IV.1.1 Vizsgált anyagok, oldatok

A módszerfejlesztés során az USP 29 Capsaicin cikkelyében leírt kromatográfiás módszert optimalizáltuk, a standard oldatok elkészítésekor a cikkelyben szereplő oldószereket és referencia standardokat tekintettük irányadónak (103). Ennek megfelelően, USP capsaicin és dihydrocapsaicin referencia standardok metanollal készült 0,5 mg/mL koncentrációjú törzsoldatait használtuk fel. A törzsoldatokat és a belőlük hígítással készült validálási standard oldatokat a módszerfejlesztés és -validálás teljes időtartama alatt hűtőben (2-8 °C-on) tároltuk.

A módszervalidálás során számos teljesítményjellemzőt (úgy mint szelektivitás, linearitás, ismételhetőség, reprodukálhatóság, kimutatási és meghatározási határ, stabilitás) megvizsgáltunk és rögzítettünk. A validálás igen lényeges elemét jelentette a különböző oldószerek, oldószerelegyek (pl.: metanol, polietilén-glikol 400, acetonitril) rendszeralkalmasságra kifejtett hatásának vizsgálata.

A validált HPLC-DAD módszert sikeresen alkalmaztuk az Asian Herbex Ltd. által gyógyszeralapanyagként történő felhasználás céljával előállított kapszaicinoid-extraktum és a Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard minősítésére. A vizsgálathoz a kapszaicinoid-extraktum illetve capsaicin natural standard 0,1 mg/mL koncentrációjú PEG 400-metanol eleggyel (1:14, v/v) készült oldatait használtuk. Minősítésük (azaz kapszaicin- és dihidrokapszaicin-, valamint minor kapszaicinoid-tartalmuk meghatározása) az USP 29 követelményeinek megfelelően történt.

Az oldatkészítés során felhasznált oldószerek analitikai tisztaságúak, a Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard HPLC minőségű, a referencia standardok USP minőségűek voltak.

IV.1.2 Kromatográfiás körülmények

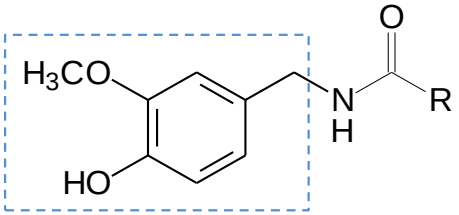
A kromatográfiás módszerfejlesztést Agilent 1100 típusú HPLC készüléken végeztük diódasoros detektálás mellett (λ= 281 nm). Kromatográfiás oszlopként fordított fázisú C8 kolonnát (ZORBAX Eclipse® XDB-C8, 4,6×150 mm, 5 µm) alkalmaztunk. A mozgófázis ortofoszforsav-oldat (1,0 ml 85%-os ortofoszforsav oldása ionmentesített vízzel 1000,0 mL-re) és acetonitril 60:40 (v/v) arányú elegyéből állt. Az áramlási sebesség 1,5 mL/perc, az oszlopra injektált mintatérfogat 20 µL volt. A komponensek elválasztásának időszükséglete izokratikus elúció mellett 20 percnek adódott. A mérések során a mintatér hőmérsékletét szobahőmérsékleten, az oszloptér hőmérsékletét 30 °C-on tartottuk. Az adatfeldolgozás Agilent ChemStation szoftver segítségével történt.

A mózgófázist HPLC minőségű oldószerek elegyítésével készítettük.

IV.2 Kapszaicinoidok plazma mintából való meghatározására alkalmas mintaelőkészítési eljárás és validált HPLC-FLD módszer fejlesztése

A kapszaicinoid-vegyületek gyógyszerfejlesztéshez szükséges preklinikai-toxikológiai vizsgálatainak kivitelezése a Veszprémi Toxikológiai Kutató Központban valósult meg. A kezeléseket beagle kutyákon végezték minősített kapszaicinoid-extraktum PEG 400 oldószerrel készült oldatával, 0-1200 µg/ttkg (0; 100; 300; 900; 1200 µg/kg) dózisban, 28 napon keresztül, napi egyszeri adagolás mellett. A különböző időpontokban (0 h; 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h) EDTA-tartalmú csövekbe gyűjtött vérminták azonnali centrifugálása után a plazmát különválasztották, lefagyasztották és Intézetünkbe szállították.

Kisdózisú kapszaicinoid-tartalmú extraktummal való orális kezelést követően a várható plazmakoncentráció még igen jó biohasznosulás esetén is igen alacsony. A plazma minták megfelelő mintaelőkészítését követően azonban a kapszaicinoidok hidroxi-(metoxibenzil) funkciós csoportjához rendelhető fluoreszcens aktivitás az UV-detektáláson alapuló módszerekhez képest jóval nagyobb érzékenységet biztosít (40) (16. ábra).



16. ábra. *A kapszaicinoidok fluoreszcens aktivitásáért felelős hidroxi-(metoxibenzil) funkciós csoportja.*

IV.2.1 Vizsgált anyagok, oldatok

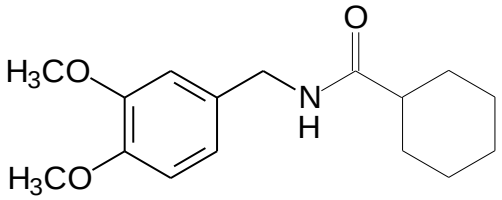
A módszerfejlesztés során USP capsaicin és dihydrocapsaicin referencia standardok 1 mg/mL koncentrációjú és ciklohexánkarbonsav-3,4-dimetoxibenzilamid (mint belső standard) 0,1 mg/mL koncentrációjú acetonitrillel készült törzsoldatait használtuk fel. (Korábbi oldószerhatás- és stabilitásvizsgálataink eredményei alapján az acetonitril bizonyult a legalkalmasabb mintaoldószernek.) A törzsoldatokat és a belőlük hígítással készített standard oldatokat a módszerfejlesztés és -validálás teljes időtartama alatt hűtőben (2-8 °C hőmérsékleten) tároltuk. A fejlesztett fluoreszcens mérésen alapuló módszert állatkísérletből származó plazma minták mintaelőkészítést követő analízisére kívántuk felhasználni, ezért a fent felsorolt standardok ismert koncentrációjú oldataival kontroll állatoktól származó plazma minták ”spike”-olását végeztük el. Belső standard alkalmazása lehetővé tette a mintaelőkészítési eljárás extrakciós hatásfokának kiszámítását.

A módszert számos teljesítményjelzőre (úgy mint specificitás, linearitás, ismételhetőség, reprodukálhatóság, kimutatási és meghatározási határ) validáltuk.

Az oldatkészítés során felhasznált ciklohexánkarbonsav-3,4-dimetoxibenzilamid és acetonitril HPLC minőségűek, a capsaicin és dihydrocapsaicin referencia standardok USP minőségűek voltak.

IV.2.2 Mintaelőkészítési eljárás

A beagle kutyákból származó, ultrafagyasztóban tárolt plazma minták kiolvasztása 10 percig 35 °C-os vízfürdőben tartva, 2 percenként 10 másodpercig vortexelve történt. A mintaelőkészítéshez 500 µL térfogatú plazmát használtunk, amelyet centrifugálható Eppendorf-csőbe pipettáztunk és a belső standard (ciklohexánkarbonsav-3,4-dimetoxibenzilamid, 17. ábra) acetonitrillel készített 1 µg/mL koncentrációjú törzsoldatának 10 µL-ével elegyítettünk (c_{plazma}= 20 ng/mL). A kezelésben nem részesült állatok plazmáit kontrollként alkalmaztuk.



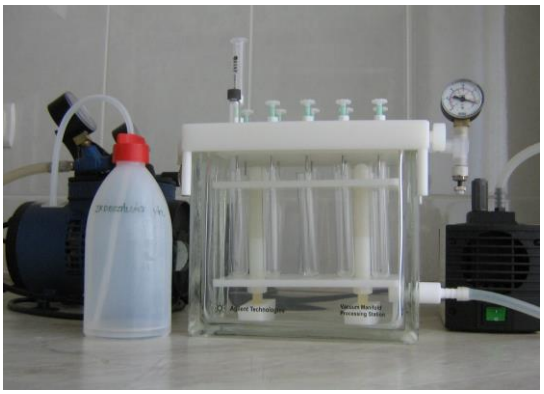
17. ábra. *Belső standardként alkalmazott ciklohexánkarbonsav-3,4-dimetoxibenzilamid szerkezete.*

IV.2.2.1 Fehérjementesítés

A belső standarddal elegyített plazmához 500 µL hideg (-30 °C-on tárolt) acetonitrilt adtunk, majd 20 másodperc vortexelve keverést követően 15.000 g-vel 10 percig centrifugáltuk.

IV.2.2.2 Szilárd fázisú extrakció

A felülúszóhoz (fehérjementes plazma-acetonitril elegy) 250 µL ionmentesített vizet adtunk és 20 másodperc vortexelve keverés után az elegyet két lépésben (2 mL metanollal + 2 mL ionmentesített vízzel) kondicionált C18 mintaelőkészítő oszlopon (AccuBond II ODS-C18, 200 mg 3 mL) vacuum manifold segítségével (18. ábra) szívtuk keresztül. Ezt követően a töltetet 1,0 mL ionmentesített vízzel mostuk, majd a visszatartott komponenseket 1,0 mL metanol segítségével oldottuk le a töltetről. Az így kapott oldatot nitrogénáram alatt szárazra fúvattuk, majd a száraz maradékot közvetlenül kromatografálás előtt 50 µL acetonitrilben 30 másodperc vortexelve keveréssel oldottuk.



18. ábra. *A szilárd fázisú extrakció során használt vacuum manifold.*

IV.2.3 Kromatográfiás körülmények

A minták analízisét Agilent 1100 típusú HPLC készüléken végeztük, fluoreszcens detektálás mellett (λ_{ex}= 230 nm; λ_{em}= 323 nm). Kromatográfiás oszlopként fordított fázisú C8 kolonnát (ZORBAX Eclipse® XDB-C8, 4,6×150 mm, 5 µm) használtunk, amely előtt előtétkolonnát (TR-C-160-K1, ABL&E-JASCO) helyeztünk el. A mozgófázis 0,05 M koncentrációjú foszfát puffer (pH 3,0) és acetonitril 60:40 (v/v) arányú elegyéből állt. Az áramlási sebesség 1,5 mL/perc, az oszlopra injektált minta térfogata 25 µL volt. Az analízis során a mintatér hőmérsékletét szobahőmérsékleten, az oszloptér hőmérsékletét 30 °C-on tartottuk. A

komponensek elválasztásának időszükséglete izokratikus elúció mellett 20 perc volt. Az adatfeldolgozás Agilent ChemStation szoftver segítségével történt.
A mozgófázis elkészítéshez HPLC minőségű oldószereket, reagenseket használtunk.

IV.3 Kapszaicinoidok *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen

IV.3.1 Oldatkészítés

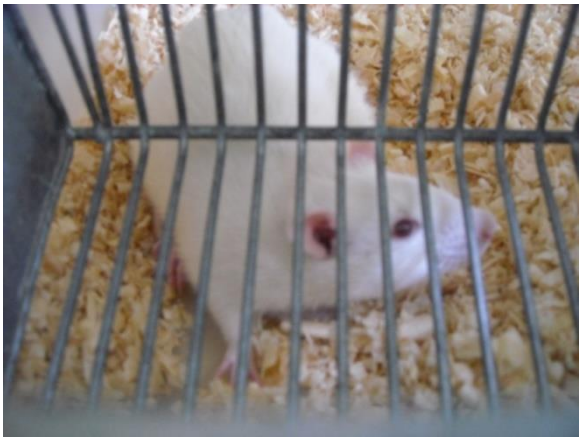
Az állatkísérletek során a vizsgált anyag (Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard) 100 μM koncentrációjú izotóniás perfúziós médiummal készült 16,5 mL térfogatú oldatát alkalmaztuk.
Az izotóniás perfúziós médium mannitot és glükózt tartalmazó Krebs-Tris puffer volt: 15 mL Krebs-Tris puffer + 0,75 mL 0,308 M mannit + 0,75 mL 0,308 M glükóz.

100 mL Krebs-Tris puffer összetétele:
69 mL 0,154 M NaCl
5 mL 0,154 M KCl
3 mL 0,110 M $CaCl_2$
1 mL 0,110 M $MgSO_4$
21 mL 0,154 M trisz-(hidroximetil)-aminometán puffer pH 7,4 (24 °C-on mérve)
1 mL 0,100 M nátrium-foszfát puffer pH 7,4 (24 °C-on mérve)
Az oldatkészítéshez analitikai tisztaságú reagenseket és HF-MX típusú kevertágyas ioncserélővel előállított ioncserélt vizet használtunk, a vizsgált capsaicin natural standard HPLC tisztaságú volt.

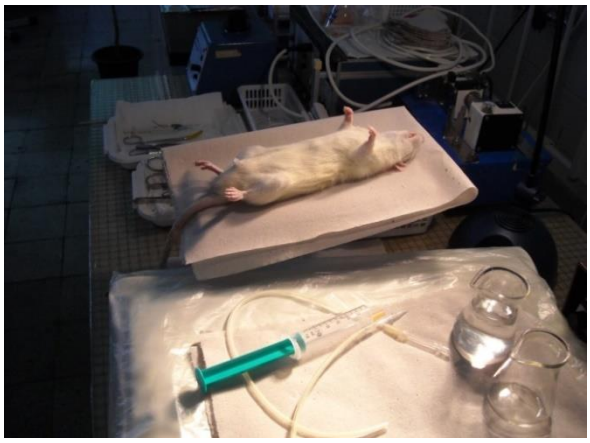
IV.3.2 Perfúziós vizsgálat

Kísérleteinket 230-260 g tömegű, 24 órán át éheztetett hím Wistar patkányon (19. ábra) végeztük (n= 7; 5 kezelt és 2 kontroll). A patkányok altatásához 1,2 g/kg intraperitoneálisan (i.p.) adott uretánt alkalmaztunk (20. ábra). A középvonal mentén hasi feltárást végeztünk, majd a vékonybél jejunális szakaszának 10 cm-ét kanüláltuk (21. ábra). A kísérlet megkezdése előtt a kanülált 10 cm-es bélszakaszt izotóniás perfúziós médiummal mostuk át, majd a béltartalom eltávolítása érdekében üres injekciós fecskendő segítségével 4-5 mL térfogatú levegőt fúvattunk át rajta. A perfundálást capsaicin natural standard izotóniás perfúziós médiummal készített 100 μM koncentrációjú oldatával végeztük, 13 mL/perc

áramlási sebesség mellett, 90 percig. A perfundált oldatból meghatározott időközönként (14 alkalommal) 250 µL térfogatú mintát vettünk. A perfundált oldat hőmérsékletét a perfúzió teljes időtartama alatt 37 °C-on tartottuk. A feltárt patkány testét a kiszáradás elkerülése érdekében perfúziós médiummal átitatott papírvattával takartuk be (22. ábra). Üres állatkísérletet is végeztünk. (Az üres állatkísérletek során a perfúziót izotóniás perfúziós médiummal végeztük.) A gyűjtött mintákat a kromatográfiás analízisig ultrafagyasztóban (-70 °C-on) tároltuk.



19. ábra. *Wistar patkány.*



20. ábra. *Altatás után.*

21. ábra. *A jejunum előkészítése.*

22. ábra. *Perfúzió.*

IV.3.3 A perfúzió során keletkező minták analízise

IV.3.3.1 Kapszaicinoidok vékonybélből való felszívódásának és metabolizmusának vizsgálata

Az *in vivo* patkánykísérletből származó ultrafagyasztóban tárolt mintákat (vékonybél-perfuzátum) szobahőmérsékleten történő kiolvasztást követően 5 percig 5000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót további előkészítés nélkül direkt módon analizáltuk. A minták kapszaicin és dihidrokapszaicin tartalmának változását, illetve a metabolitok perfuzátumban való megjelenését a **IV.2.3** pontban leírt, újravalidált HPLC-FLD módszer segítségével vizsgáltuk. A módszer újravalidálását az új biológiai mátrixból (vékonybél-perfuzátumból) való meghatározás tette szükségessé.

IV.3.3.2 A keletkező metabolitok szerkezetének meghatározása

A kapszaicinoidok *in vivo* vékonybél-metabolizmusa során keletkező bomlástermékek szerkezetének azonosítása céljából a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetével kooperációban HPLC-MS/MS módszert dolgoztunk ki.

A patkánykísérletből származó mintákat (perfuzátum) szobahőmérsékleten történő kiolvasztást követően 5 percig 5000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót további előkészítés nélkül direkt módon vizsgáltuk. A méréseket Dionex Ultimate 3000 HPLC-hez kapcsolt Q-Exactive kvadrupol-orbitrap tömegspektrométer segítségével végeztük.

Az elválasztáshoz Accucore RP-MS Zorbax C18 kolonnát (2.1 mm × 150 mm, 2.6 µm) használtunk. Grádiens elúció során a mozgófázis „A” (hangyasav ioncserélt vízzel készült 0,1%-os oldata, v/v) és „B” (hangyasav acetonitrillel készült 0,1%-os oldata, v/v) oldat elegye volt a következő grádiens-profil mellett: 0-10 percig A:B = 74:26 (v/v), majd az eluensösszetétel lineárisan változott, 10-11 percig A: 74%→55% és B: 26%→45%; 11-17 percig A: 55%→40% és B: 45%→60%; 17-20,9 percig A: 40%→55% és B: 60%→45%, végül 20,9-21 percig A: 55%→74% és B: 45%→26%. Az áramlási sebesség 0,15 mL/perc, az oszlopra injektált minta térfogata 5 µL volt. Az analízis során a mintatér hőmérsékletét 0 °C-on, az oszloptér hőmérsékletét 40 °C-on tartottuk. A mozgófázis elkészítéséhez LC-MS minőségű oldószereket használtunk.

A tömegspektrometriás mérés HESI (heated electrospray ionization) ionforrás mellett pozitív módban történt. A spektrumokat 50-650 tömeg/töltés (*m*/*z*) tartományban értékeltük. Az adatfeldolgozás Xcalibur 1.4 szoftver segítségével történt.

IV.4 Szalicilsav és hidroxilált metabolitjai elválasztására alkalmas validált HPLC módszer fejlesztése

IV.4.1 Vizsgált anyagok, oldatok

A módszerfejlesztés során szalicilsav, 2,3-dihidroxibenzoesav, 2,5-dihidroxibenzoesav, katechol, valamint 4-aminobenzoesav (belső standard) 5 mg/mL koncentrációjú acetonitrillel készült törzsoldatait használtuk fel. A törzsoldatokat és a belőlük hígítással készített standard oldatokat a módszerfejlesztés és -validálás teljes időtartama alatt hűtőben (2-8 °C hőmérsékleten) tároltuk.

A módszert számos teljesítményjelzőre (úgy mint linearitás, ismételhetőség, reprodukálhatóság, kimutatási és meghatározási határ) validáltuk. A fejlesztett UV-detektáláson alapuló módszert állatkísérletből származó vékonybél-perfuzátum minták szalicilsav-tartalmának monitorozására alkalmaztuk.

Az oldatkészítés során felhasznált valamennyi reagens és oldószer HPLC minőségű volt.

IV.4.2 Kromatográfiás körülmények

A minták analízisét Agilent 1100 típusú HPLC készüléken végeztük UV-detektálás mellett (λ= 252 nm). Kromatográfiás oszlopként fordított fázisú fenil kolonnát (Waters Spherisorb® Phenyl; 4,6 x 250 mm, 5 µm) használtunk. A mozgófázis ortofoszforsav (pH 2,60 ± 0,02), acetonitril és tetrahidrofurán 90:3,8:6,2 (v/v) arányú elegyéből állt. A komponensek elválasztása 10 percet vett igénybe, ebben az időintervallumban az elúció izokratikus volt. Az áramlási sebesség 0,9 mL/perc, az injektált minta térfogata 20 µL volt. A mérés időtartama alatt a mintatér hőmérsékletét szobahőmérsékleten, az oszloptér hőmérsékletét 40 °C-on tartottuk.

A mozgófázis elkészítéséhez HPLC minőségű oldószereket, reagenseket használtunk.

IV.5 Szalicilsav vékonybélből való felszívódásának vizsgálata *in vivo* patkány-modellen

Az állatkísérletek (n= 7; 5 kezelt és 2 kontroll) során nátrium-szalicilát 250 µM koncentrációjú izotóniás perfúziós médiummal készült 16,5 mL térfogatú oldatát alkalmaztuk. Az *oldatkészítés* és a *perfúziós vizsgálat* a **IV.3** pontban leírtak szerint történt.

IV.5.1 A perfúzió során keletkező minták analízise

Az *in vivo* patkánykísérletből származó ultrafagyasztóban tárolt mintákat (vékonybél-perfuzátum) szobahőmérsékleten történő kiolvasztást követően 5 percig 5000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszó 245 µL-ét 4-aminobenzoesav 250 µg/mL koncentrációjú acetonitrillel készített oldatának 5 µL-ével elegyítettük (így a perfuzátum 5 µg/mL koncentrációjú a belső standardra nézve). A minták szalicilsav-tartalmának változását a **IV.4.2** pontban leírt HPLC-UV módszer segítségével vizsgáltuk.

IV.6 Szalicilsav *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a keletkező metabolitok szerkezetének igazolása

A **IV.4.2** pontban leírt HPLC-UV módszer lehetővé tette a különböző mintavételi időpontokban vett vékonybél-perfuzátum minták szalicilsav-tartalmának meghatározását, de nem bizonyult elég érzékenynek az igen kis mennyiségben megjelenő szalicilát-metabolitok vizsgálatára. A keletkező bomlástermékek jelenlétének és szerkezetének igazolására új alkalmas HPLC-DAD-MS módszert fejlesztettünk.

A szalicilsav és a szalicilátszármazékok kromatográfiás elválasztása savas tartományban (pK_a-érték alatt, azaz 2,0-2,6 intervallumban) ideális, ugyanakkor a savas kémhatású mozgófázis okozta magas hidrogénion-koncentráció ronthatja a savas vegyületek ionizációját a tömegspektrometriás analízis során. Ezen probléma kiküszöbölése érdekében olyan módszert fejlesztettünk, amelyben a felhasznált mozgófázis savkomponense egyrészt MS-kompatibilis (a korábban használt ortofoszforsav helyett hangyasav), másrészt az alkalmazott alacsonyabb savkoncentráció nem rontja a tömegspektrometriás analízis során az elektrospray ionizációt.

IV.6.1 Vizsgált anyagok, oldatok

A kromatográfiás módszerfejlesztés során szalicilsav, 2,3-dihidroxibenzoesav, 2,4-dihidroxibenzoesav és 2,5-dihidroxibenzoesav 5 mg/mL koncentráció acetonitrillel készült törzsoldatait használtuk. A törzsoldatokat és a belőlük hígítással készített standard oldatokat a módszerfejlesztés és -validálás teljes időtartama alatt hűtőben (2-8 °C hőmérsékleten) tároltuk.

A módszert számos teljesítményjelzőre (úgy mint specificitás, linearitás, ismételhetőség, reprodukálhatóság, kimutatási és meghatározási határ) validáltuk. Az oldatkészítés során felhasznált valamennyi reagens és oldószer HPLC minőségű volt.

IV.6.2 Mintaelőkészítés

A -70 °C-on tárolt, 750 µL térfogatú perfuzátumot szobahőmérsékleten kiolvasztottuk, majd 0.2 g vízmentes nátrium-szulfáttal 10 másodpercig vortexelve kevertük, ezután a mintát 2 percig 15.000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót különválasztottuk, 10 µL 2 M kénsavoldattal megsavanyítottuk, majd 400 µL *terc*-butil-metil-éterrel (TBMÉ) 30 másodpercig vortexelve kevertük. 2 perc 15.000 g-vel való centrifugálást követően a felső (éteres) fázist különválasztottuk és tisztítás céljával 500 µL hangyasavval (pH 2.60 ± 0,02) 30 másodpercig vortexelve kevertük, majd a fázisok szétválását követően a felső fázist elkülönítettük és nitrogén-áram alatt szárazra pároltuk. A bepárlási maradékot 25 µL hangyasav (pH 2.60 ± 0,02) - metanol elegyben (80/20, v/v) 30 másodpercnyi vortexelve keveréssel oldottuk és HPLC-MS analízisnek vetettük alá a **IV.6.3** pontban leírt körülmények mellett. Összehasonlítóként kontroll (nátrium-szalicilátot nem tartalmazó izotóniás perfúziós médiummal perfundált) patkányból származó, azonos időpontban gyűjtött, a fent leírtak szerint előkészített mintát használtunk.

A mintaelőkészítési eljárás során alkalmazott vízmentes nátrium-szulfát és *terc*-butil-metil-éter analitikai tisztaságúak, a hangyasav, az ioncserélt víz és a metanol HPLC minőségűek voltak.

IV.6.3 HPLC-DAD-MS körülmények

A minták analízisét Jasco típusú HPLC-vel végeztük diódasoros (λ_1= 237 nm; λ_2= 248 nm; λ_3= 252 nm; λ_4= 314 nm) és tömegspektrometriás (Waters 3100 single-quadrupole mass detector) detektálás mellett (*m*/*z* 70-350) végeztük. Kromatográfiás oszlopként Thermo Scientific Accucore C18 kolonnát (2.1 mm × 150 mm, 2.6 µm) használtunk, amely előtt előtétkolonnát (Phenomenex Security Guard Cartridge; Gemini NX; C18) helyeztünk el. A mozgófázis hangyasav (pH 2,60 ± 0,02) és metanol 80:20 (v/v) arányú elegyéből állt. A komponensek elválasztása 20 percet vett igénybe, ebben az időintervallumban az elúció izokratikus volt. Az áramlási sebesség 0,25 mL/perc, az injektált minta térfogata 5 µL volt. A mérés időtartama alatt a mintateret szobahőmérsékleten, az oszloptér hőmérsékletét 35 °C-on tartottuk. A diódasorral nyert adatokat ChromNav szoftver segítségével értékeltük.

A tömegspektrometriás mérés elektrospray ionizáció mellett negatív módban történt. A spektrumokat 70-350 *m/z* tartományban értékeltük. Az MS adatok feldolgozása Empower 2 szoftver segítségével történt.

IV.7 Szalicilsav *in vitro* oxidatív átalakulásainak Fenton- és Udenfriend-modellekkel való vizsgálata

IV.7.1 Fenton-inkubáció

Vas(II)-szulfát 30 mM 100 µL térfogatú pH 3,0 kénsavval készült oldatát 100 µL 10 mM szalicilsavoldattal és 100 µL 10 mM hidrogén-peroxid-oldattal elegyítettünk, majd az elegyet pH 3,0 kénsavoldattal 1,0 mL végtérfogatra egészítettünk ki. (Az így elkészített reakcióelegy szalicilsavra és hidrogén-peroxidra nézve 1 mM-os, Fe^{2+}-ionokra nézve 3 mM-os.) Az oldatot jól záró kémcsőben 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Üres (szalicilsavat nem tartalmazó) inkubálást is végeztünk.

Az inkubációt fiziológiás pH-n (kénsav helyett Krebs-Tris puffert alkalmazva), magasabb hidrogén-peroxid (10 mM) és alacsonyabb Fe^{2+}-ion (300 µM) koncentráció mellett is elvégeztük, vizsgálva a reakciókörülmények termékek mennyiségére és minőségére kifejtett hatását.

Az inkubációs idő letelte után az inkubátumot 10 µL 2 M kénsavoldattal megsavanyítottuk és azonnali mintaelőkészítésnek vetettük alá.

A reakcióelegy elkészítéséhez felhasznált szalicilsav HPLC tisztaságú, a többi reagens analitikai tisztaságú volt. A vizes oldatokhoz ioncserélt vizet használtunk, amelyet csapvízből HF-MX típusú kevertágyas ioncserélővel Intézetünkben állítottuk elő.

IV.7.2 Udenfriend-inkubáció

2,0 mL desztillált víz, 1,0 mL 10 mM szalicilsavoldat, 1,0 mL 10 mM aszkorbinsavoldat, 1,0 mL 2,4 mM nátrium-edetát-oldat és 1,0 mL 2 mM vas(II)-ammónium-szulfát-oldat elegyét 50 mM foszfát pufferrel (pH 7,18-7,22) 10,0 mL végtérfogatra egészítettük ki. (Az így elkészített reakcióelegy szalicilsavra nézve 1 mM-os, Fe^{2+}-ionokra nézve 200 µM-os.) Az elegyet jól záró kémcsőben 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Üres (szalicilsavat nem tartalmazó) inkubálást is végeztünk.

Az inkubációs idő letelte után az inkubátumot jeges vízfürdőbe helyeztük és 10 µL 2 M kénsavoldattal megsavanyítottuk.

A reakcióelegy elkészítéséhez felhasznált szalicilsav HPLC tisztaságú, a többi reagens analitikai tisztaságú volt. A vizes oldatokhoz ioncserélt vizet használtunk, amelyet csapvízből HF-MX típusú kevertágyas ioncserélővel Intézetünkben állítottuk elő.

IV.7.3 Mintaelőkészítés és mintaanalízis

A Fenton- és Udenfriend-inkubáció során keletkező reakcióelegyek azonos térfogatait azonos módon készítettük elő. A mintaelőkészítés legfontosabb lépései a következők:

1. A megsavanyított inkubátum 1,0 mL-éhez 10 µL 4-nitrofenol (*p*-nitrofenol, mint extrakciós standard) 0,5 mg/mL koncentrációjú törzsoldatát elegyítettük.
2. Az elegyet 500 µL *terc*-butil-metil-éterrel (TBMÉ) 30 másodpercig vortexeltük.
3. A fázisok szétválását követően a felső TBMÉ-es fázist elkülönítettük és 300 µL hangyasavval (pH 2,60 ± 0,02) 30 másodpercig vortexelve kevertük.
4. A fázisok szétválását követően a TBMÉ-es fázist újra elkülönítettük és nitrogen-áram alatt szárazra pároltuk.
5. A bepárlási maradékot 50 µL hangyasav (pH 2.60 ± 0,02) - metanol elegyben (80/20, v/v) 30 másodpercnyi vortexelve keveréssel oldottuk.

A mintaelőkészítési eljárás során alkalmazott *terc*-butil-metil-éter analitikai tisztaságú, a 4-nitrofenol, a hangyasav, az ioncserélt víz és a metanol HPLC minőségűek voltak.

A minták analízisét a **IV.6.3** pontban ismertetett HPLC-DAD-MS módszerrel végeztük. Összehasonlítóként az azonos módon előkészített kontroll (szalicilsavat nem tartalmazó) inkubátumokat alkalmaztuk.

V Eredmények és következtetések

V.1 Kapszaicinoidok gyógyszeralapanyagból való meghatározása

Az Asian Herbex Ltd. által gyógyszeralapanyagként történő felhasználás céljából előállított kapszaicinoid-extraktum és a Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására validált, egyszerűen és gyorsan kivitelezhető HPLC-DAD módszert fejlesztettünk (23. ábra). A módszer segítségével elvégeztük a vizsgált kapszaicinoid-extraktumok USP 29 szerinti minősítését is.

A „Capsaicin" névvel jelölt kapszaicinoid-tartalmú alkaloida-keverék hatóanyagként az Amerikai Gyógyszerkönyvben hivatalos. A Magyar Gyógyszerkönyvben a szárított paprika-termés alkoholos kivonata (*Tinctura capsici* - Ph.Hg. VII.) és a paprika termése (*Capsici fructus* - Ph.Hg. VIII.) alkotnak önálló cikkelyt.

Az USP követelményeket támaszt a „Capsaicin" névvel jelölt kapszaicinoid-tartalmú alkaloida-keverék kapszaicin-, dihidrokapszaicin- és egyéb kapszaicinoid-tartalmára vonatkozóan. Ennek megfelelően, az alkaloida-keverék összkapszaicinoid-tartalma 90-110 % között kell legyen, kapszaicin ($C_{18}H_{27}NO_3$)-tartalma nem lehet kevesebb 55%-nál, a kapszaicin és dihidrokapszaicin ($C_{18}H_{29}NO_3$)-tartalom összege nem lehet kevesebb 75%-nál és az egyéb kapszaicinoid-tartalom nem haladhatja meg a 15%-ot (103).

Méréseink eredményeként megállapíthattuk, hogy az Asian Herbex Ltd. által előállított kapszaicinoid-extraktum és a Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard egyaránt megfelelnek az USP 29 kapszaicinoid-tartalomra vonatkozó követelményeinek (4-5. táblázat).

4. táblázat. *Az Asian Herbex Ltd. által előállított kapszaicinoid-extraktum USP 29 szerinti minősítése.*

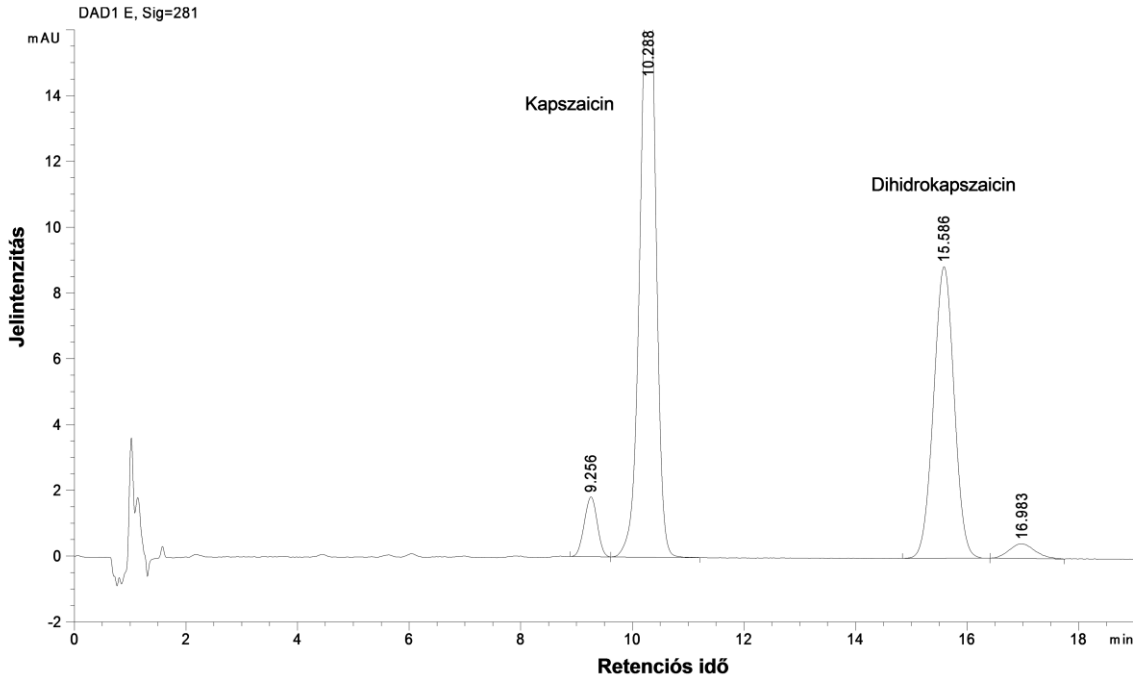
Kapszaicinoidok	**Tartalom (*m/m%)**	**USP 29 követelmény**
Kapszaicin (K)	61,32%	≤ 55%
Dihidrokapszaicin (DHK)	22,59%	–
K+DHK	83,91%	≤ 75 %
Egyéb kapszaicinoidok	6,99%	≥ 15%
Összes kapszaicinoidok	90,90%	90-110 %

*m/m%: tömegszázalékos összetétel

5. táblázat. *A Fluka által forgalmazott capsaicin natural standard USP 29 szerinti minősítése.*

Kapszaicinoidok	**Tartalom (*m/m%)**	**USP 29 követelmény**
Kapszaicin (K)	61,96%	≤ 55%
Dihidrokapszaicin (DHK)	37,49%	–
K+DHK	99,45%	≤ 75 %
Egyéb kapszaicinoidok	7,48%	≥ 15%
Összes kapszaicinoidok	106,93%	90-110 %

*m/m%: tömegszázalékos összetétel



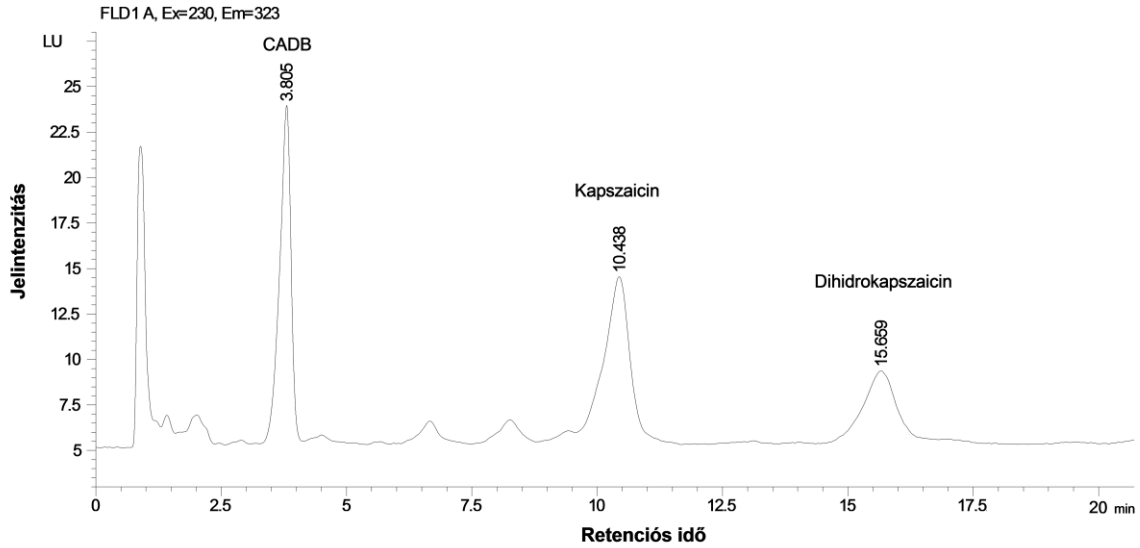
23. ábra. *Az Asian Herbex Ltd. által előállított kapszaicinoid-extraktum PEG 400 : metanol=1:14 (v/v) eleggyel készített 0,1 mg/mL koncentrációjú oldatának kromatogramja. A* t_R*=9,256 és 16,983 perc retenciós idővel megjelenő kis csúcsok minor kapszaicinoidok.*

V.2 Kapszaicinoidok *per os* alkalmazást követő plazma mintából való meghatározása

Csak azok az anyagok tesztelhetők humán résztvevőkön, amelyek terápiás potenciált mutatnak és amelyeket a preklinikai vizsgálatok során biztonságosnak találtak.

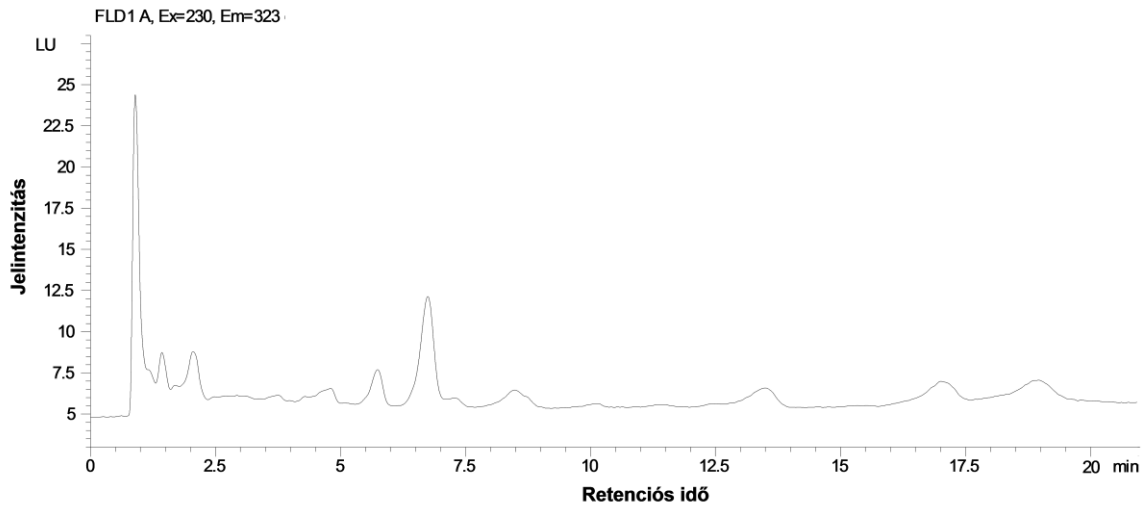
Kapszaicinoid-tartalmú gyógyszer fejlesztése kapcsán USP 29 szerint minősített (Asian Herbex Ltd. által előállított) kapszaicinoid-extraktum PEG 400 oldószerrel készült oldatával, 0-1200 µg/ttkg dózisban, 28 napon keresztül, napi egyszeri adagolás mellett beagle kutyák bevonásával toxikológiai vizsgálatok valósultak meg. A különböző időpontokban (0 h; 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h) gyűjtött plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmát vizsgáltuk.

Mivel kisdózisú kapszaicinoid orális adását követően a várható plazmakoncentráció igen alacsony, fehérjementesítést követő szilárd fázisú extrakciós módszert dolgoztunk ki, amellyel közel tízszeresre tudtuk töményíteni a minták kapszaicinoid-tartalmát. Továbbá, a kapszaicinoidok hidroxi-(metoxibenzil) funkciós csoportjához rendelhető fluoreszcens aktivitáson alapuló (40), az UV-detektáláshoz képest két nagyságrenddel nagyobb érzékenységgel bíró HPLC-FLD módszert fejlesztettünk. A validálási paramétereknek megfelelően a módszer jól alkalmazható kapszaicinoidokat igen alacsony koncentrációban tartalmazó plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására (24. ábra).

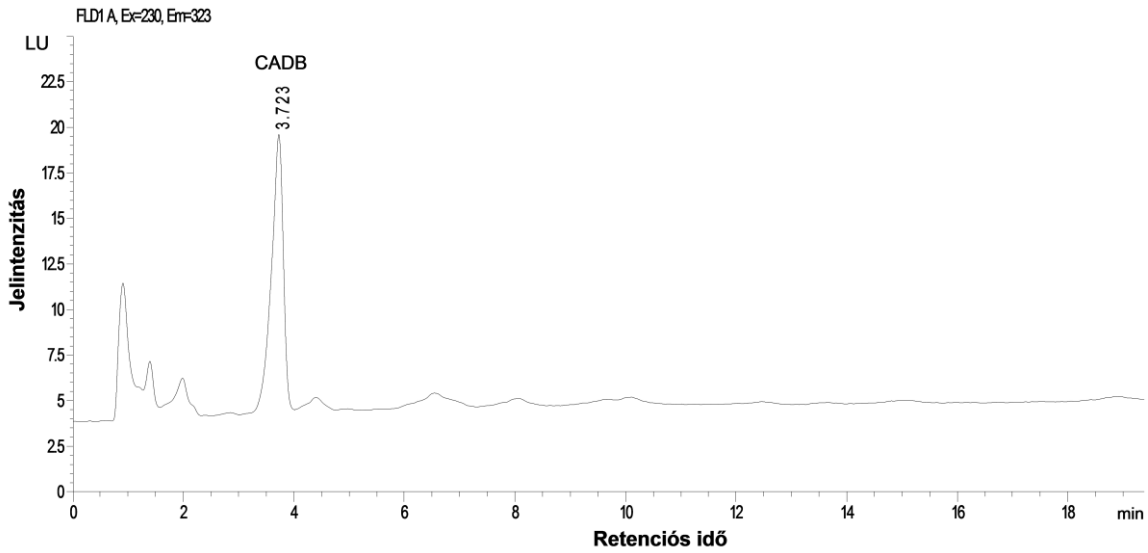


24. ábra. *Ciklohexánkarbonsav-3,4-dimetoxibenzilamidot (CADB) belső standardot 20 ng/mL koncentrációban, capsaicin natural standardot 50 ng/mL koncentrációban tartalmazó, "spike"-olt kontroll (nem kezelt kutyától származó) plazmából szilárd fázisú extrakció után nyert kromatogram.*

Méréseink során nem várt eredményt kaptunk; a különböző dózisban kezelt beagle kutyák különböző időpontokban gyűjtött plazmáinak egyikében sem lehetett kimutatni kapszaicinoidokat, még a magasabb dózisok esetében sem (25-26. ábra). A kapott eredmények számos, a kapszaicinoidok farmakokinetikájával kapcsolatos kérdést vetnek fel.



25. ábra. *Kontroll (nem kezelt) kutya plazmájából szilárd fázisú extrakció után nyert kromatogram. A belső standard és a kapszaicinoidok retenciós idejével megegyező helyen nem látszanak csúcsok a kromatogramon.*



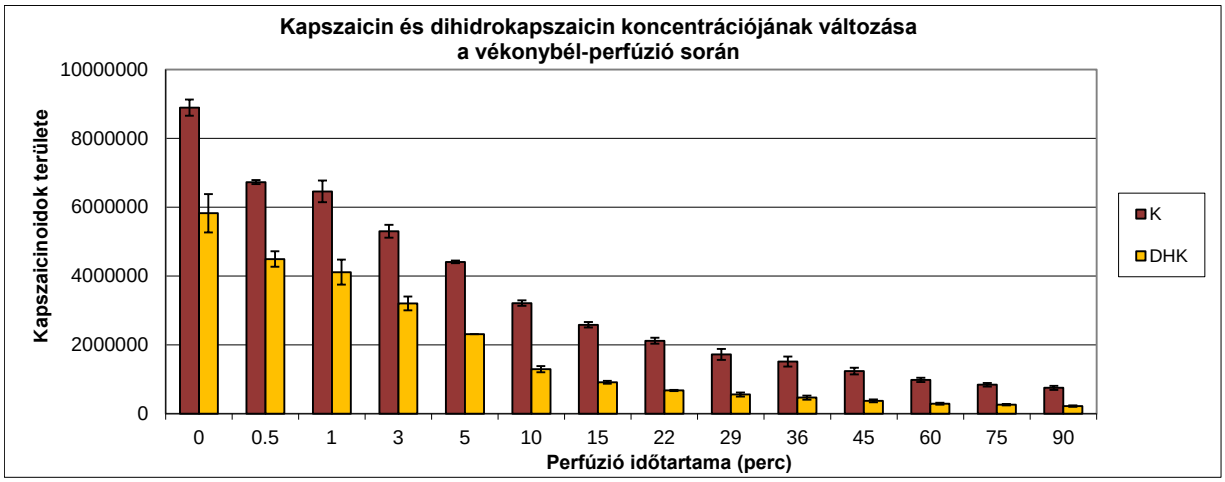
26. ábra. *900 µg/ttkg dózisban kezelt kutya plazmájából (1 h) mintaelőkészítés után nyert kromatogram. Az extrakció hatásfokának ellenőrzésére a mintaelőkészítést megelőzően belső standarddal "spike"-oltuk a plazmát (20 ng/mL koncentrációban); a* t_R*=3,723 perc retenciós idővel megjelenő csúcs a belső standardtól származik. A kapszaicinoidok retenciós idejével megegyező helyen nem látszanak csúcsok a kromatogramon.*

V.3 A kapszaicinoidok felszívódnak és metabolizálódnak a vékonybélben

A preklinikai-toxikológiai vizsgálatokból származó plazma minták analízisének eredményeit megismerve vizsgálni kívántuk a kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusát. Vizsgálatainkat *in vivo* patkány-modellen végeztük, amely során az éhbél (jejunum) felső szakaszát perfundáltuk capsaicin natural standard 100 µM koncentrációjú izotóniás perfúziós médiummal készült oldatával. A perfuzátum kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására, valamint a megjelenő metabolitok vizsgálatára a plazma minták analízisére használt, de a biológiai mátrix változása miatt (plazma → perfuzátum) újravalidált HPLC-FLD módszert alkalmaztuk.

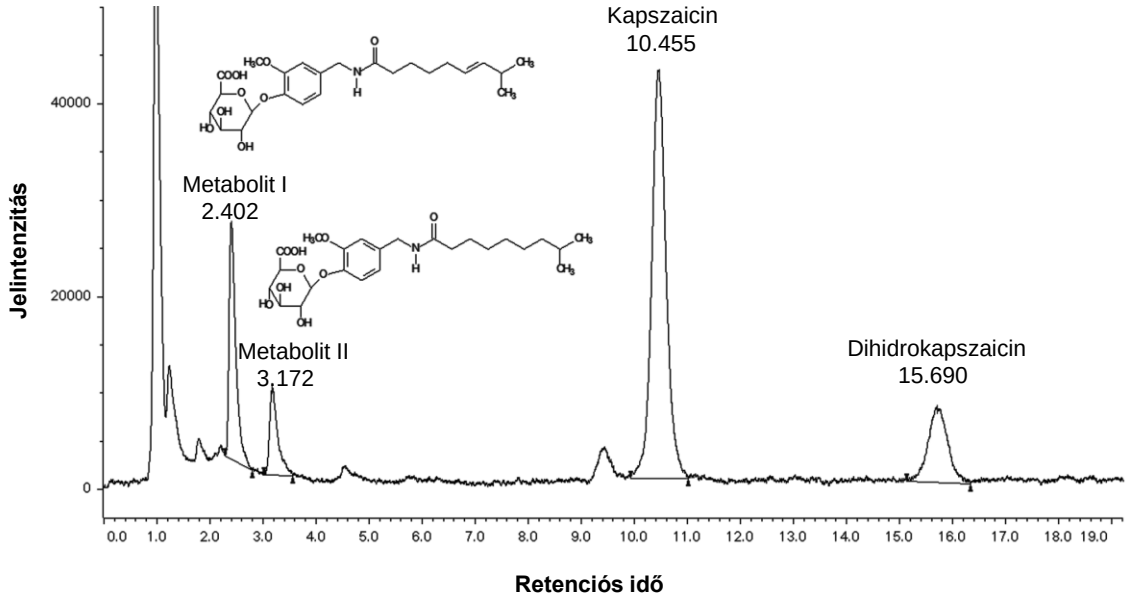
V.3.1 Kapszaicinoidok vékonybélből történő felszívódása

Méréseink során igazolni tudtuk azt az irodalomból már ismert tényt, hogy a kapszaicinoidok lipofilitásuk révén könnyen felszívódnak a gasztrointesztinális traktusból (37). A kapszaicin és a dihidrokapszaicin perfuzátumbeli koncentrációja a perfúzió ideje alatt exponenciálisan csökkent (27. ábra), a vizsgálat végéig a kapszaicinoidok kb. 90 %-a felszívódott.

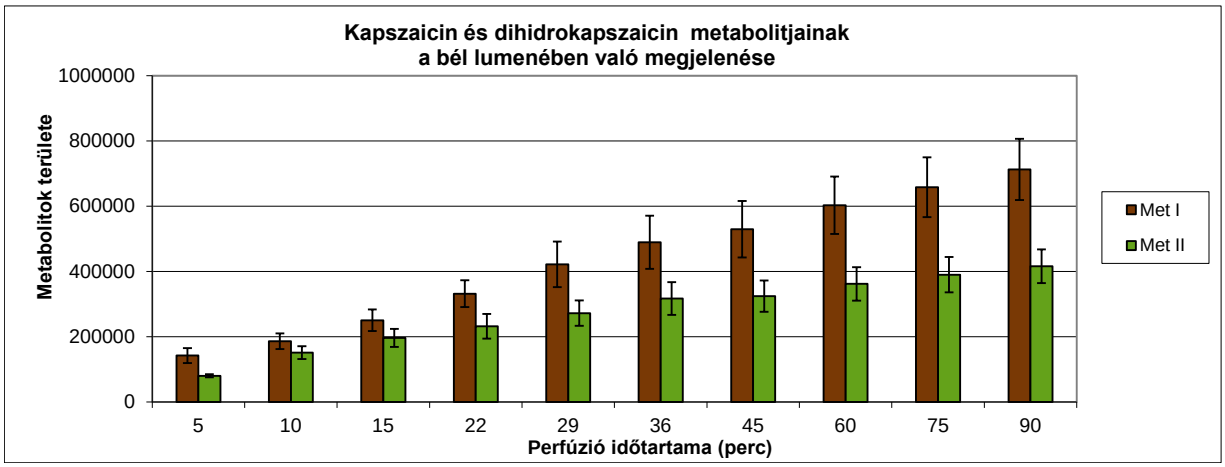


27. ábra. *A kapszaicin (K) és dihidrokapszaicin (DHK) mennyiségének perfuzátumbeli változása, a jejunum felső szakaszának 100 µM koncentrációjú kapszaicinoid-oldattal való perfúziója során. A diagram 5 független állatkísérletből származó eredmények átlagértékeit (± standard deviáció) ábrázolja.*

A kapszaicin és a dihidrokapszaicin mennyiségének csökkenésével párhuzamosan két polárisabb (a kromatogramon korábban megjelenő) komponens megjelenését figyeltük meg (28. ábra), melyek perfuzátumbeli mennyisége a vizsgálat időtartama alatt exponenciális növekedést mutatott (29. ábra).



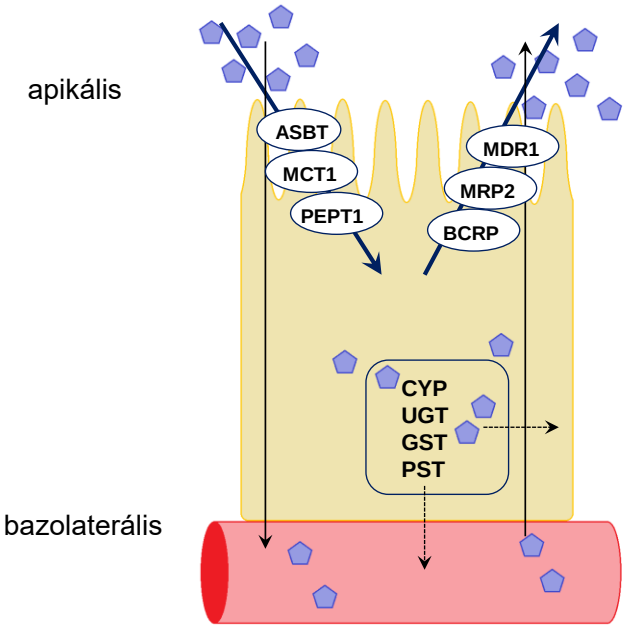
28. ábra. *A perfúzió 90. percében vett minta kromatogramja, t_R=2,40 perc és t_R=3,17 perc a kapszaicinoid-metabolitokhoz tartozó retenciós idők.*



29. ábra. *A kapszaicinoid-metabolitok (Met I és Met II) mennyiségének perfuzátumbeli változása, a jejunum felső szakaszának 100 µM koncentrációjú kapszaicinoid-oldattal való perfúziója során. A diagram 5 független állatkísérletből származó eredmények átlagértékeit (± standard deviáció) ábrázolja.*

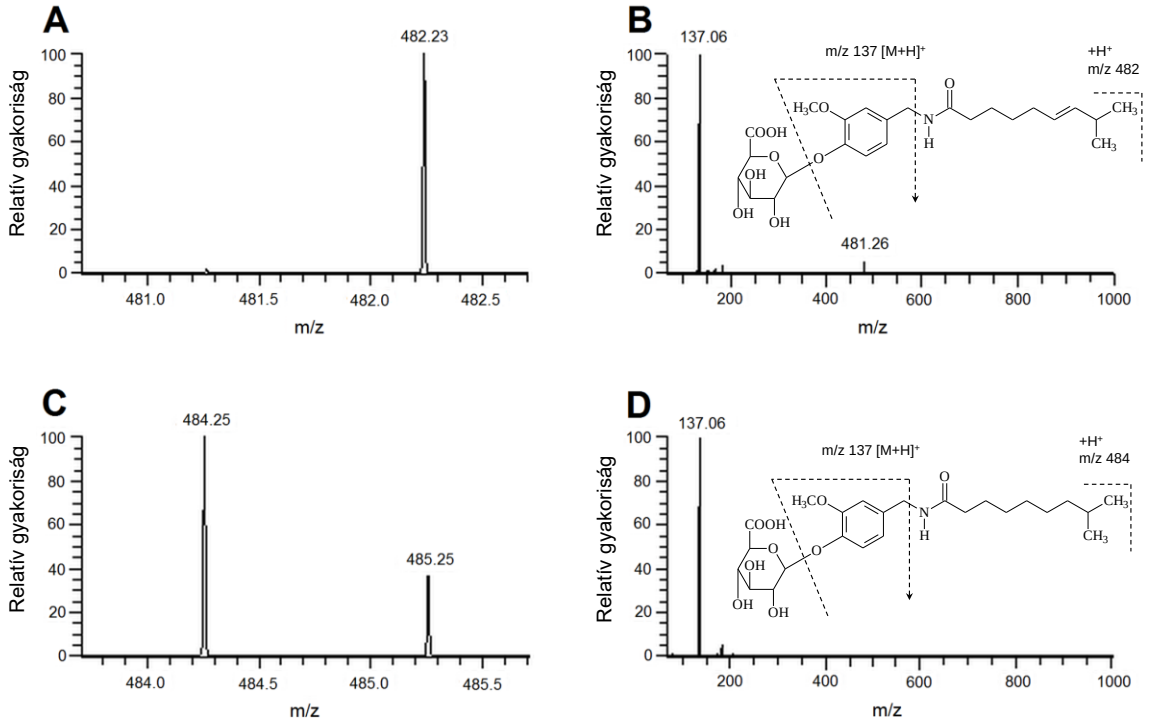
V.3.2 A kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusa, a metabolitok szerkezetének azonosítása

A vékonybélben működő enzimrendszerek (CYP, UGT, GST, PST) lehetővé teszik az orálisan alkalmazott, a vékonybélből diffúzióval és/vagy carrier-mediált transzportfolyamatok révén felszívódó gyógyszervegyületek vékonybél általi átalakulását. A bélhámsejtek apikális membránjában jelenlévő efflux transzporterek (BCRP, MRP2, MDR1) szerepet játszhatnak a metabolitok lumen irányába történő exkréciójában (82).



30. ábra. *A vékonybél metabolizáló és kiválasztó szerv.*

A perfúzió során a kapszaicinoidok mennyiségének csökkenésével párhuzamosan a kapszaicinoidok metabolizálódtak a vékonybélben és a bél lumen irányába történő kiválasztódás eredményeként a képződő bomlástermékek megjelentek a perfuzátumban. A perfuzátumok HPLC-MS analízise lehetővé tette a metabolitok szerkezetének meghatározását, így a 29. ábrán kisebb retencióval (t_R=2,40 perc, Metabolit I) eluálódó komponens a kapszaicin glükuronid-konjugátumaként, a nagyobb retenciós idővel (t_R=3,17 perc, Metabolit II) jelzett komponens a dihidrokapszaicin glükuronid-konjugátumaként volt azonosítható (31. ábra).



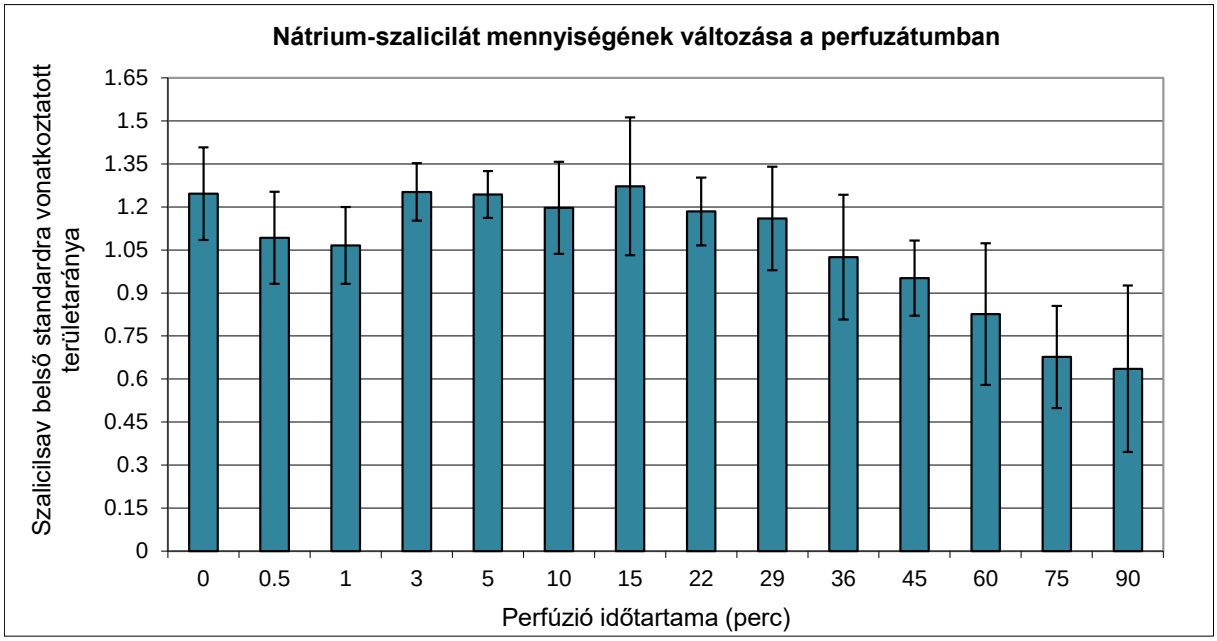
31. ábra. *A kapszaicin-glükuronid (A, B) és a dihidrokapszaicin-glükuronid (C, D) SIM-MS és MS/MS spektrumai. Az A és C ábrákon szelektív ion detektálás (SIM) módban a kapszaicin-glükuronidnak (m/z=482,23) és a dihidrokapszaicin-glükuronidnak (m/z=484,25) megfelelő jel látható. A B és D ábrák MS/MS spektrumok, melyeken a két metabolit közös fragmens ionja (m/z=137,06) jelenik meg.*

A kapszaicinoidok vékonybélben történő átalakulása magyarázatként szolgálhat arra a kérdésre, hogy a toxikológiai vizsgálatok során nyert plazma mintákban miért nem volt kimutatható az orálisan alkalmazott kapszaicinoid-extraktum két fő komponense, a kapszaicin és a dihidrokapszaicin. Megfigyeléseink kapcsán a jövőben vizsgálni kívánjuk a kapszaicinoidok oxidatív metabolikus átalakulásait is.

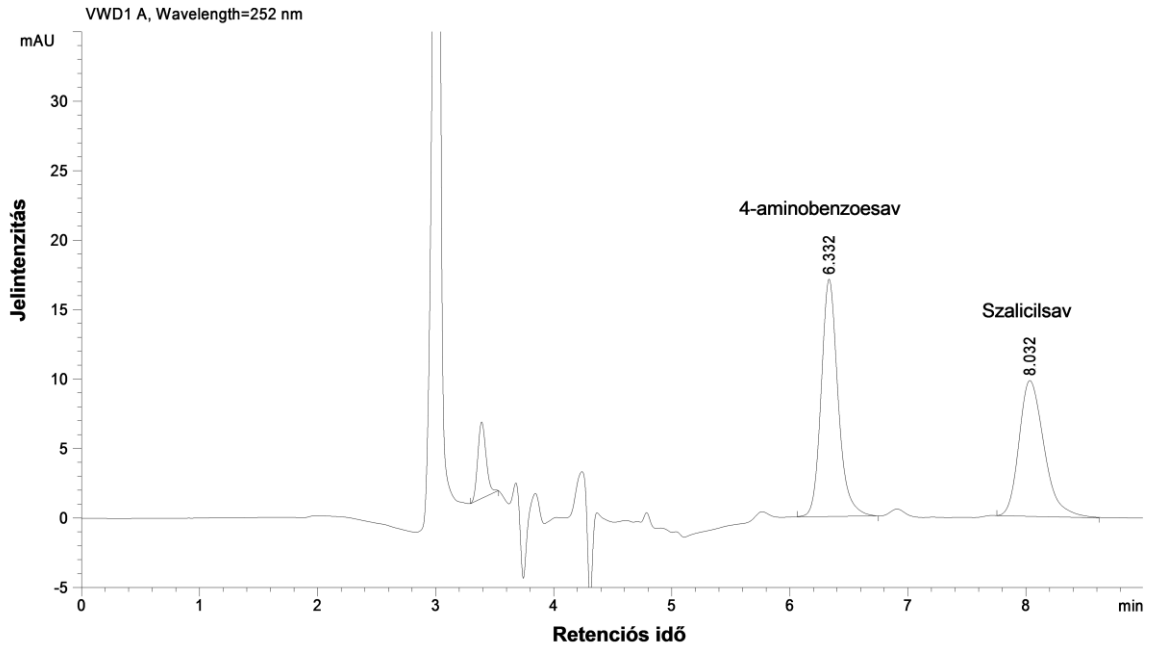
V.4 Szalicilátok vékonybélből történő felszívódásának vizsgálata

A vékonybél kezdeti szakaszán 2,0-4,0, távolabbi szakaszán 7,0 körüli a pH. Ilyen környezetben a szalicilátok ionos, vízoldható formája válik dominánssá. Az ionos forma túlsúlya ellenére azonban a szalicilátok vékonybélből történő felszívódása igen jelentős, a nem-ionizált forma passzív diffúziója mellett specifikus carrier-mediált transzportfolyamatok (pl.: OAT-1) is fontos szerepet játszanak a szalicilátok vékonybélből történő felszívódásban (85).

Méréseink igazolták, hogy a vizsgált nátrium-szalicilát felszívódik a vékonybélből. A perfúzió teljes időtartama alatt a perfundált izotóniás perfúziós médiummal készült 250 µM-os nátrium-szalicilát-oldat koncentrációja megközelítőleg a felére csökkent (32. ábra).



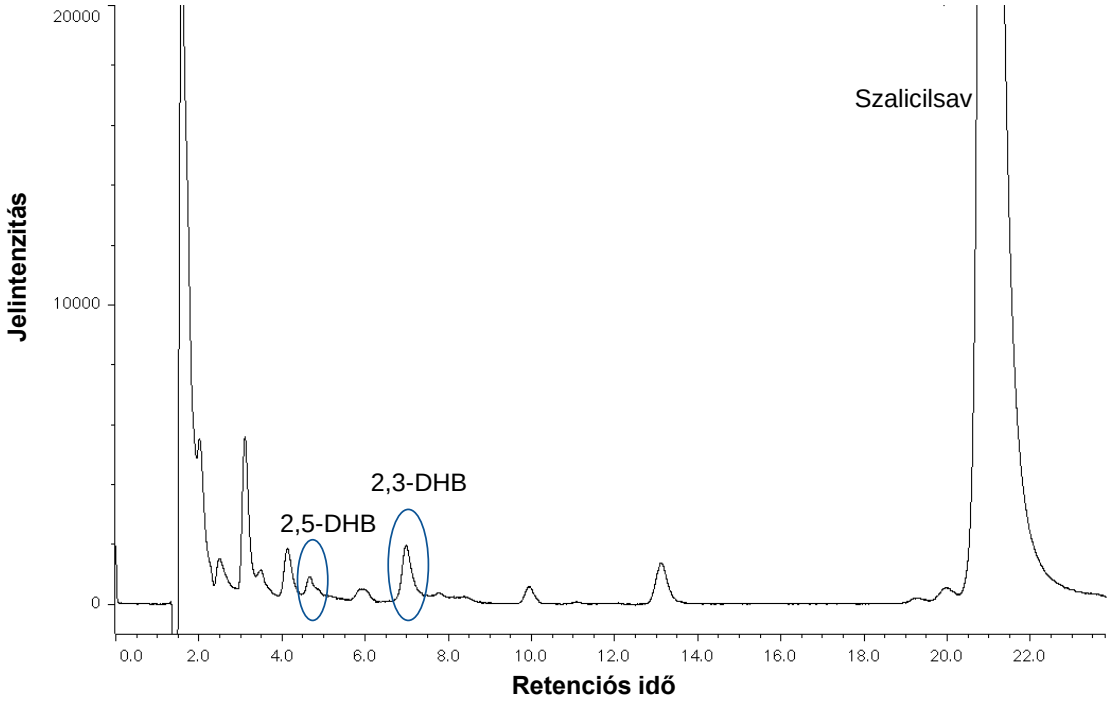
32. ábra. *A nátrium-szalicilát mennyiségének perfuzátumbeli változása 250 µM koncentrációjú nátrium-szalicilát-oldattal való vékonybél (proximális jejunum)-perfúzió során. A szalicilsav és a belső standardként alkalmazott 4-aminobenzoesav csúcsterületének hányadosát ábrázoltuk az idő függvényében. A diagram 5 független állatkísérletből származó eredmények átlagértékeit (± standard deviáció) ábrázolja.*



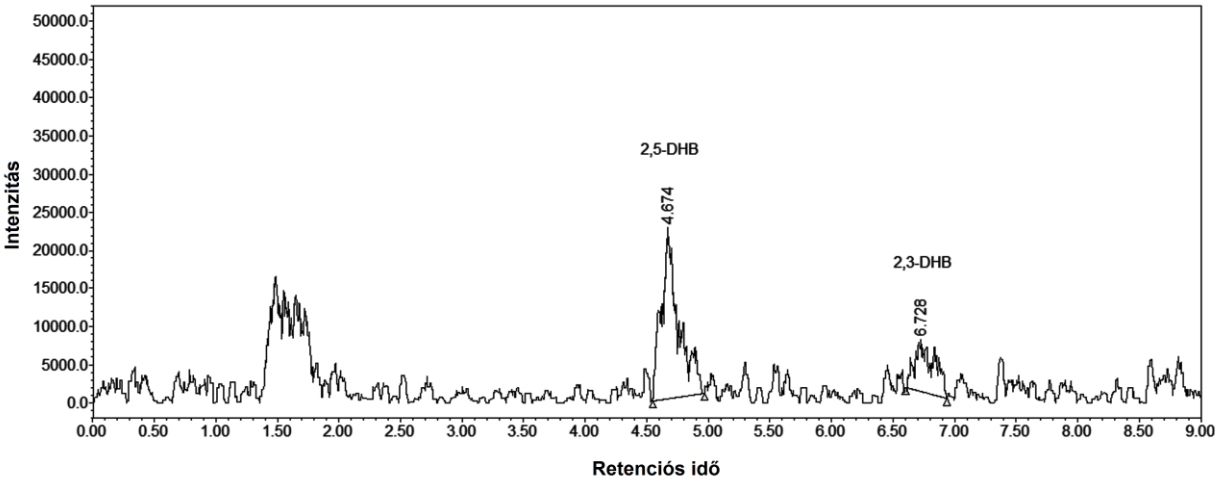
33. ábra. *A perfúzió 45. percében vett minta kromatogramja.* t_R*=3,7-4,3 perc között látható csúcsok a mozgófázis tetrahidrofurán komponensétől származnak,* t_R*=3 percnél megjelenő csúcs egy endogén, a kontroll (szaliciláttal nem kezelt) patkány perfuzátumában is megjelenő azonosítatlan komponens.*

V.5 Szalicilátok vékonybél-metabolizmusa

A perfúzió 90 percnyi időtartama alatt a 250 μM koncentrációjú nátrium-szalicilát-oldat szalicilát-tartalmának megközelítőleg a fele szívódott fel a vékonybélből. A szalicilátok vékonybélben történő átalakulása és lumenbe való exkréciója esetén (figyelembe véve a felszívódás mértékét) csak igen kis mennyiségű szalicilát-metabolit perfuzátumban való megjelenésére számíthattunk. Ugyanakkor megfelelő mintaelőkészítési eljárást (kisózást követő folyadék-folyadék extrakció) és érzékenyebb elválasztási módszert (HPLC-DAD-MS) alkalmazva a szalicilsav mellett két dihidroxibenzoesav (2,3-dihidroxibenzoesav és 2,5-dihidroxibenzoesav) is azonosítható volt a perfuzátumban (34-35. ábra).



34. ábra. *A 90. percben gyűjtött perfuzátumban a szalicilsav mellett 2,3-dihidroxibenzoesav (2,3-DHB) és 2,5-dihidroxibenzoesav (2,5-DHB) volt azonosítható (λ= 314 nm). Az azonosítás a 2,3-DHB és 2,5-DHB standardok azonos körülmények között felvett kromatogramjait felhasználva, a retenciós idők összehasonlításával történt.*



35. ábra. *A hidroxilált metabolitok szerkezetét tömegspektrometriás detektálás mellett is igazoltuk. A 153 ± 0,5 m/z tartományban felvett extrahált ion kromatogramon 2,3-DHB és 2,5-DHB volt azonosítható.*

Felmerül a kérdés, hogy milyen reakciók eredményeként oxidálódik a szalicilsav a vékonybélben. A bélhámsejtekben megtalálható CYP3A4 enzim által katalizált reakcióban szalicilsavból 2,5-dihidroxibenzoesav keletkezik. Az aromás gyűrű hidroxilációja nem-enzimatikus módon, hidroxilgyökök hatására is végbemehet, ilyenkor a már említett 2,5-dihidroxibenzoesav mellett 2,3-dihidroxibenzoesav képződése is kimutatható (91; 92).

A nem-szteroid gyulladáscsökkentők bélnyálkahártya károsító hatásuk révén növelik a bélnyálkahártya mieloperoxidáz aktivitását (107). A képződő reaktív oxigénszármazékok (pl.: $OH^{\cdot}$) igen nagy reakciókészséggel bírva képesek az endogén és exogén molekulákat nem specifikus, nem-enzimkatalizált reakcióban oxidálni (106). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a szalicilsav és az acetilszalicilsav alacsony koncentrációban nem károsítják a bélnyálkahártyát, azonban képesek kivédeni az indometacin ulcerogén hatását (107).

Az *in vivo* kísérleteink során alkalmazott 250 μM-os szalicilát-koncentráció kiválthatja a bélnyálkahártya mieloperoxidáz aktivitásának, és ezáltal a lokális hidroxilgyök-koncentráció emelkedését. Ugyanakkor a szalicilátok $^{\cdot}OH$-scavenger hatással is bírnak, ezért a 2,3- és 2,5-dihidroxibenzoesavak perfuzátumban való megjelenése hátterében $\cdot OH$ által katalizált reakciót feltételezünk.

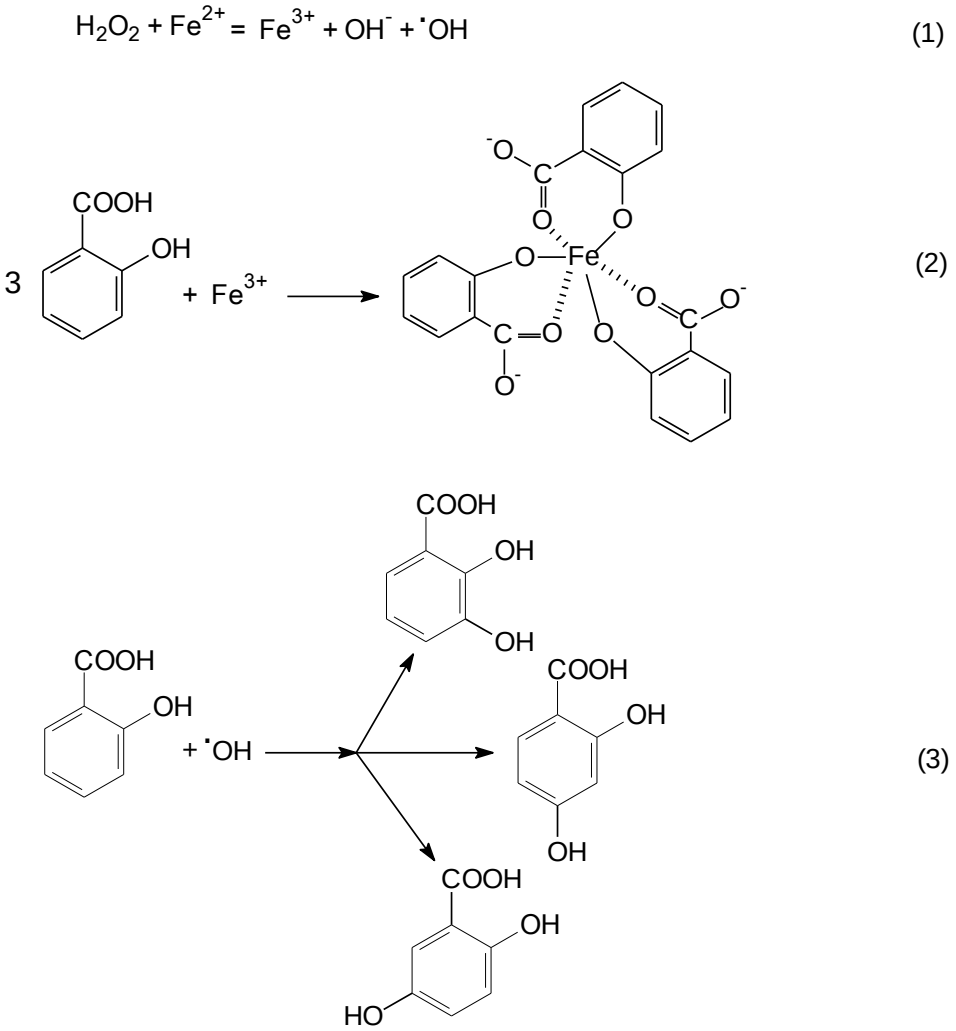
V.6 Szalicilátok *in vitro* oxidatív átalakulásainak vizsgálata

A gyógyszeres terápiában alkalmazott vegyületek legnagyobb hányada aromás elektronszerkezettel rendelkezik és ezek közül számos vegyület biotranszformációja során megfigyelhető hidroxilált metabolitok keletkezése, amelyek hátterében specifikus enzimkatalizált reakciók mellett több nemspecifikus mechanizmus (pl.: Fenton-reakció, Udenfriend-reakció) működése is feltételezhető.

A szalicilsav, mint modellvegyület Fenton- és Udenfriend-inkubáció során történő vizsgálata jól ismert már az irodalomból, azonban a vizsgálatokat a legtöbb esetben *in vitro* körülmények között optimalizált reakciókörülmények között végezték el (pl.: a Fenton-reakció pH-optimuma savas közegben van). Munkánk során vizsgálni kívántuk a reakciókörülmények termékek mennyiségére és minőségére kifejtett hatását, valamint a két egymással nagy rokonságot mutató reakció aromás rendszerekre kiterjedő hidroxilációs mechanizmusát.

V.6.1 A szalicilsav Fenton-inkubáció során történő átalakulásai

A szalicilsav Fenton-inkubáció során történő átalakulásait alapvetően három egymással párhuzamosan zajló reakció egyensúlya határozza meg: (1) a Fenton-reakció, (2) a Fenton-reakcióban képződő Fe^{3+}-ionok szalicilsavval való komplexképzési reakciója és (3) a Fenton-reakcióban képződő hidroxilgyökök szalicilsavval való szubsztitúciós reakciója (36. ábra).

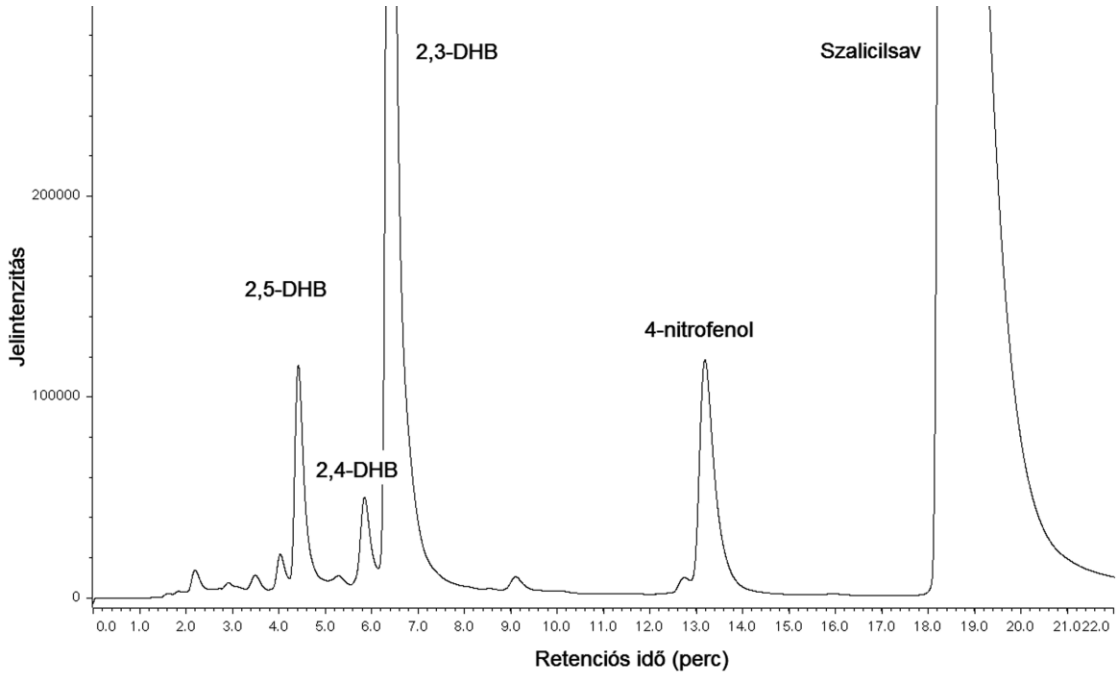


36. ábra. *A szalicilsav Fenton-inkubációját meghatározó egymással, párhuzamosan zajló reakciók.*

A kialakuló reakciótermékek mennyiségét nagymértékben befolyásolja az inkubálás során alkalmazott hidrogén-peroxid-koncentráció, a Fe^{2+}/H_2O_2 arány, a pH, valamint az inkubálási idő (98).

A Fenton-reakció lejátszódásának pH-optimuma savas tartományban van (pH 3-4). Ilyen körülmények között (1 mM H_2O_2 és 3 mM Fe^{2+} mellett) nem régiószelektív szubsztitúció eredményeként a szalicilsavból 2,3-dihidroxibenzoesav, 2,4-dihidroxibenzoesav és 2,5-

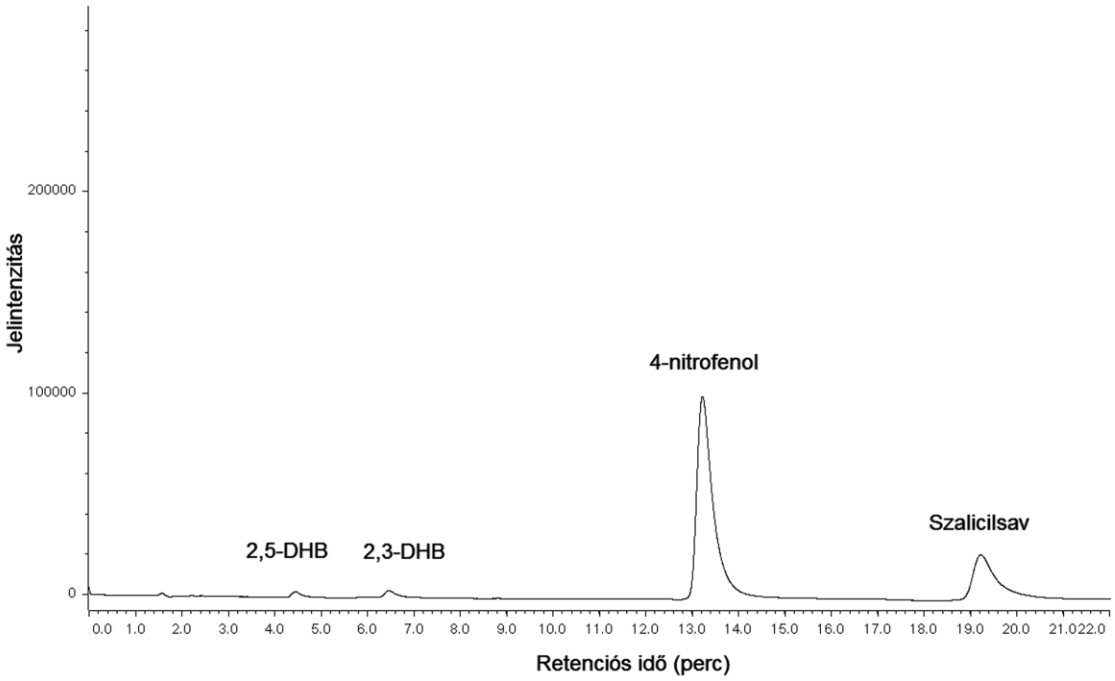
dihidroxibenzoesav keletkezik (36/3. ábra), amelyet saját vizsgálataink eredményei is alátámasztottak (37. ábra).



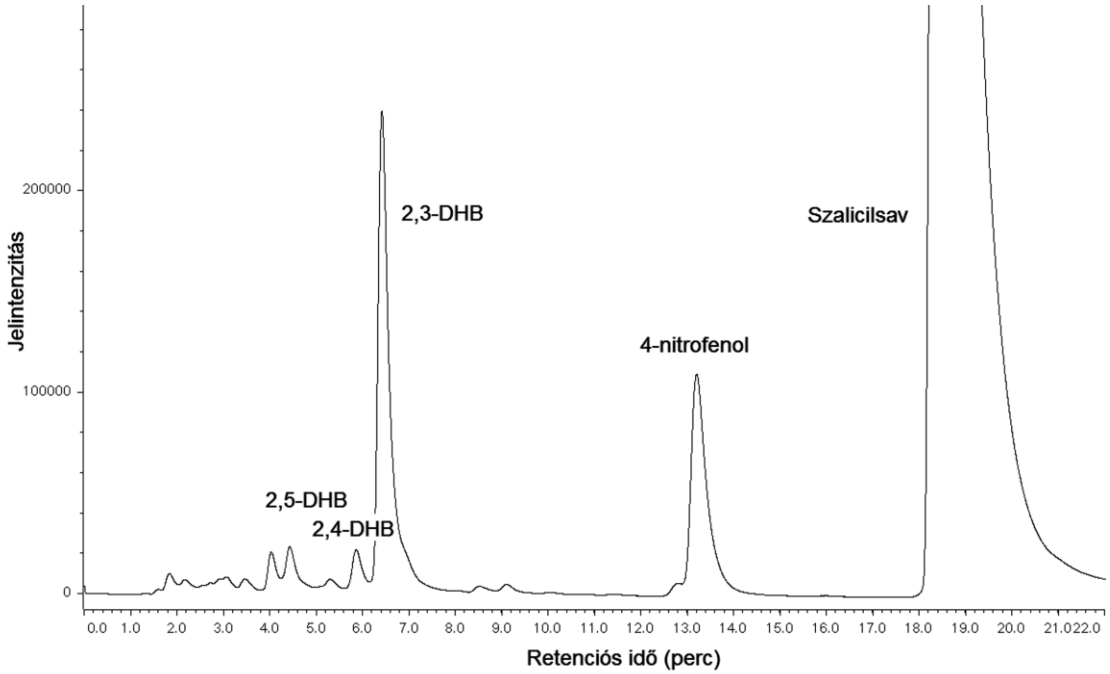
37. ábra. *A szalicilsav Fenton-inkubátumának kromatogramja (λ= 237 nm) (1 mM szalicilsav,* ***1 mM hidrogén-peroxid és 3 mM*** Fe^{2+} *mellett).*

Magasabb hidrogén-peroxid-koncentráció (1 mM → 10 mM) mellett a szalicilát-típusú vegyületekhez tartozó csúcsok jóval kisebbek voltak, illetve meg sem jelentek (pl.: 2,4-DHB) a kromatogramon (38. ábra). Feltételezhető, hogy a nagy hidrogén-peroxid-feleslegben lejátszódó reakció során a szalicilsav aromás gyűrűje felnyílik, így dihidroxibenzoesavak is csak jóval alacsonyabb mennyiségben keletkeznek és jelennek meg az extraktumokban.

A Fe^{2+}-ionok inkubátumbeli koncentrációjának csökkentése (3 mM → 300 μM) a keletkező dihidroxibenzoesavak egymáshoz viszonyított koncentráció-arányában okozott eltolódást: a magasabb Fe^{2+}-ion-koncentráció mellett kivitelezett reakcióhoz képest a keletkező 2,3-DHB és 2,4-DHB mennyisége megközelítőleg a felére, míg a 2,5-DHB mennyisége az ötödére csökkent (39. ábra).



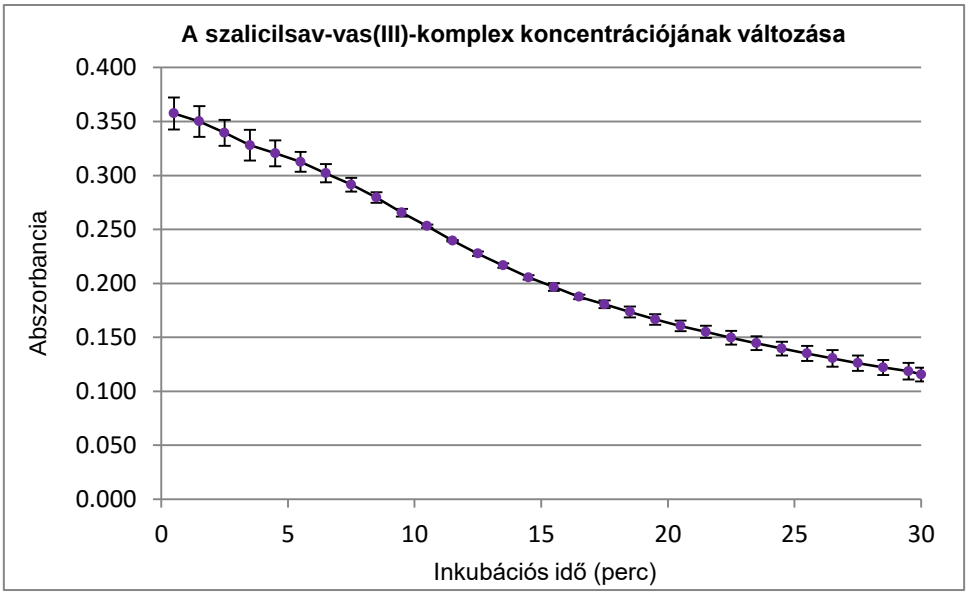
38. ábra. *A szalicilsav Fenton-inkubátumának kromatogramja (λ= 237 nm) (1 mM szalicilsav,* ***10 mM hidrogén-peroxid és 3 mM*** Fe^{2+} *mellett).*



39. ábra. *A szalicilsav Fenton-inkubátumának kromatogramja (λ= 237 nm) (1 mM szalicilsav,* ***1 mM hidrogén-peroxid és 300 μM*** Fe^{2+} *mellett).*

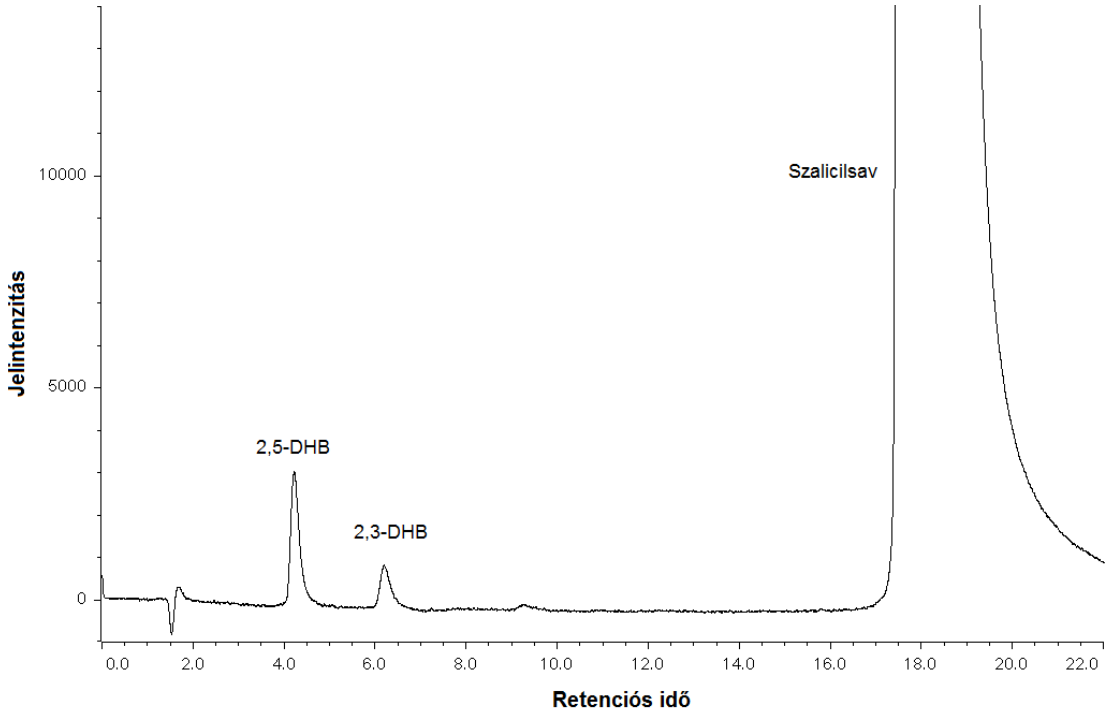
Savas körülmények között a szalicilsav *orto*-helyzetű szubsztitúciója előnyt élvez a *meta*- és *para*-helyzetű szubsztitúcióhoz képest, a keletkező termékek arányát az inkubátum Fe^{2+}-ion koncentrációja határozza meg.

A reakcióelegy az inkubálás teljes időtartama alatt (30 perc) ibolyaszínű volt, amely a szalicilsav Fe^{3+}-ionokkal alkotott komplexének jelenlétére utal (36/2. ábra). Vizsgáltuk a komplex mennyiségének időbeni változását, 3 mM és 300 μM Fe^{2+}-koncentráció mellett is. A szalicilsav-Fe^{3+}-komplex koncentrációja az inkubációs idő végéig folyamatosan csökkent (40. ábra).



40. ábra. *A szalicilsav-Fe^{3+}-komplex mennyiségének változása az inkubáció során (λ=* 560 nm, *1 mM szalicilsav, 1 mM hidrogén-peroxid és 300 μM Fe^{2+} mellett). A grafikon 3 párhuzamos inkubálásból származó eredmények átlagértékeit (± standard deviáció) ábrázolja.*

A Fenton-reakció fiziológiás pH-n (pH 7,2) 2,3-DHB és 2,5-DHB keletkezését eredményezte, azonban a savas körülmények között végbemenő reakcióhoz képest a termékek aránya – a kromatográfiás csúcsterületeket összehasonlítva – a 2,5-DHB irányába tolódott el (41. ábra).



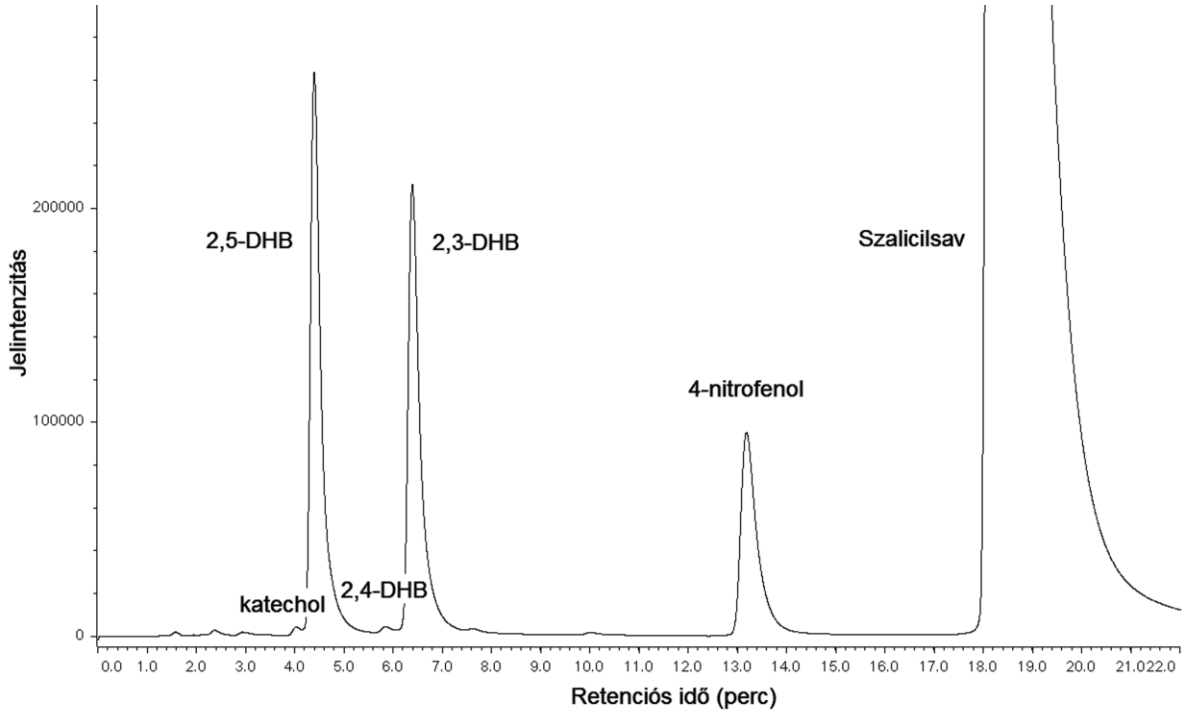
41. ábra. *A szalicilsav Fenton-inkubátumának kromatogramja (1 mM szalicilsav,* ***1 mM hidrogén-peroxid és 300 µM*** Fe^{2+} *mellett). A dihidroxibenzoesavak területaránya:* $A_{2,3\text{-}DHB}/A_{2,5\text{-}DHB}=0,52$. *(λ= 237 nm)*

V.6.2 A szalicilsav Udenfriend-inkubáció során történő átalakulásai

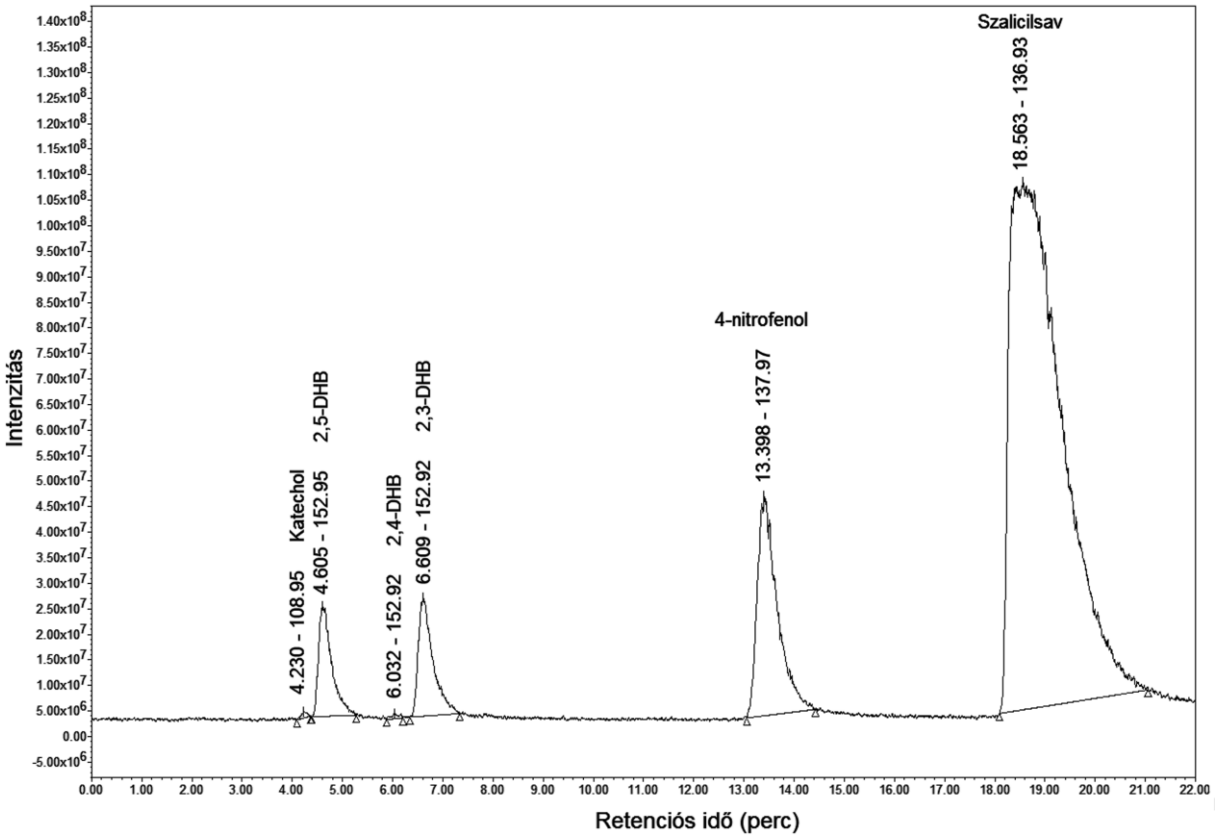
S. Udenfriend és munkatársai 1954-ben elvégzett kísérletei során egy, az aromás rendszerekre kiterjedő hidroxilációs mechanizmus felfedezésére került sor (99). Az Udenfriend-rendszerben több endogén és exogén vegyület átalakulását tanulmányozták már, többek között a szalicilsavét is.

Udenfriend és munkatársai a szalicilsav inkubálását követően a megsavanyított inkubátumot először kloroformmal, majd dietil-éterrel extrahálták. A kloroformos extraktumból az át nem alakult szalicilsav mennyiségét tudták meghatározni, az éteres extraktumban 2,5-dihidroxibenzoesav jelenlétét tudták kimutatni (101).

Saját vizsgálataink során azt találtuk, hogy a szalicilsav Udenfriend-inkubációja 2,5-DHB mellett 2,3-DHB, továbbá igen kis mennyiségben katechol és 2,4-DHB keletkezését is eredményezi (42-43 ábra).



42. ábra. *A szalicilsav Udenfriend-inkubátumának kromatogramja (λ= 237 nm). A 2,5- és 2,3-dihidroxibenzoesavak területaránya közel azonos:* $A_{2,5\text{-}DHB}/A_{2,3\text{-}DHB}=1,11$.



43. ábra. *A szalicilsav Udenfriend-inkubátumának totál ion kromatogramja (m/z 92-154).*

VI Megbeszélés és összefoglalás

Munkánk során nemszteroid-gyulladásgátló szerek okozta gyomornyálkahártya-károsodás kivédése céljából acetilszalicilsav mellett kisdózisú kapszaicinoidot is tartalmazó gyógyszer fejlesztése okán, kapszaicinoidok és szalicilátok meghatározására alkalmas validált analitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása volt a célkitűzésünk.

A gyógyszerfejlesztés különböző fázisaihoz igazodva először a kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyag minősítése, majd a preklinikai állatkísérletekből származó plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározása céljából fejlesztettünk fordított fázisú HPLC-DAD illetve HPLC-FLD módszereket. A fejlesztett módszerek közti legfontosabb különbséget a linearitási tartományok közti különbözőség jelenti. A diódasoros módszer µg/mL-es tartományban lineáris, ezáltal gyógyszeralapanyag minősítésére alkalmas. A fluoreszcens módszer ng/mL-es koncentrációtartományban képes kvantitatíven meghatározni az állatkísérletekből származó plazma mintákban a két fő kapszaicinoid-komponens mennyiségét, így farmakokinetikai analízist tesz lehetővé.

Miután a preklinikai-toxikológiai vizsgálatok nem várt eredményeket hoztak – miszerint 0-1200 µg/ttkg dózisban orálisan adott kapszaicinoid-tartalmú extrakrum két fő komponensét a különböző időpontokban gyűjtött plazma minták egyikében sem lehetett kimutatni – figyelmünk a vizsgált vegyületek esetleges vékonybél-metabolizmusára irányult. *In vivo* patkány-modellen az éhbél felső szakaszát 100 µM koncentrációjú izotóniás kapszaicinoid-oldattal perfundálva kísérleteink igazolni tudták a kapszaicinoidok vékonybélben lejátszódó enzimkatalizált átalakulását.

Az Aspirin 1899-ben történt forgalomba kerülése óta eltelt több mint 100 évben számos, az acetilszalicilsav farmakokinetikáját feldolgozó tanulmány jelent meg a szakirodalomban, azonban kevessé ismert a vegyület, illetve a belőle képződő fenolos karakterű szalicilsav sorsa a vékonybélben. I*n vivo* patkány-modellen az éhbél felső szakaszát 250 µM koncentrációjú izotóniás nátrium-szalicilát-oldattal perfundálva igazoltuk a szalicilsav vékonybélből történő felszívódását, illetve vékonybélben való átalakulását.

Gyulladásos betegségben (pl.: rheumatoid arthritis) szenvedők acetilszalicilsavval történő kezelése során került kimutatásra, hogy az acetilszalicilsavval kezelt betegek szervezetében magasabb koncentrációban képződik 2,3-dihidroxibenzoesav az ASA metabolizmusa során, mint az ASA nem gyulladáscsökkentő indikációban (dózisban) való alkalmazása esetén. Ezen az észrevételen alapuló feltételezések szerint a 2,3-DHB koncentrációjának vizsgálata az oxidatív stressz egyértelmű markere lehet. A 2,3-DHB szervezetben való keletkezését a

szalicilsav aromás gyűrűjének nem-enzimatikus hidroxilációja eredményezheti. Kísérleteink során Fenton- és Udenfriend-modellek segítségével vizsgáltuk a szalicilsav nem-enzimkatalizált oxidatív átalakulásait, 2,3-DHB, 2,4-DHB és 2,5-DHB keletkezését (az Udenfriend-reakcióban katekol keletkezését is) sikerült kimutatnunk. Irodalmi adatok támasztják alá a vizsgált modellek fiziológiás körülmények közti relevanciáját, azaz a nagydózisú acetilszalicilsav adását követő 2,3-dihidroxibenzoesav-képződés hátterében a Fenton-reakció mellett az Udenfriend-rendszer működése is feltételezhető.

Munkánk során kapott új eredmények:

1. Kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok minősítése céljából kapszaicin és dihidrokapszaicin tartalmi meghatározására alkalmas validált HPLC módszert fejlesztettünk.
2. A kapszaicinoidok toxikológiai vizsgálata céljából, minősített kapszaicinoid-tartalmú készítménnyel kezelt beagle kutyák plazma mintáinak analízisére alkalmas mintaelőkészítési eljárást és validált HPLC módszert dolgoztunk ki a minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására.
3. *In vivo* patkány-modellen vizsgáltuk a kapszaicinoidok vékonybélből történő felszívódását és vékonybél általi metabolizmusát. Kísérleteink igazolták, hogy a kapszaicinoidok felszívódnak és enzimkatalizált reakció (glükuronid-konjugáció) eredményeként metabolizálódnak a jejunumban. A vegyületek vékonybélben történő átalakulása részben magyarázatot adhat arra a kérdésre, hogy a preklinikai-toxikológiai vizsgálatok során nyert plazma mintákban miért nem volt kimutatható az orálisan alkalmazott kapszaicinoid-extraktum két fő komponense, a kapszaicin és a dihidrokapszaicin.
4. *In vivo* patkány-modellen vizsgáltuk a nátrium-szalicilát vékonybélből történő felszívódását és vékonybél általi metabolizmusát. Kísérleteink igazolták, hogy a nátrium-szalicilát felszívódik és átalakul a jejunumban. Az átalakulás eredményeként 2,3-DHB és 2,5-DHB keletkezik. A kísérletek során alkalmazott szalicilát-koncentráció kiválthatja a bélnyálkahártya mieloperoxidáz aktivitásának, és ezáltal a lokális hidroxilgyök-koncentráció emelkedését. Ugyanakkor a szalicilátok ˙OH-scavenger hatással is bírnak, ezért a 2,3- és 2,5-dihidroxibenzoesavak perfuzátumban való megjelenése hátterében ·OH által katalizált reakciót feltételezünk.

5. *In vitro* kísérletek során Fenton- és Udenfriend-modellek segítségével vizsgáltuk a szalicilsav nem-enzimatikus oxidatív átalakulásait. A két eltérő reakciómechanizmusban, amelyekben közös a Fe^{2+}-ionok szerepe, közös metabolitok, 2,3-DHB, 2,4-DHB és 2,5-DHB keletkezését figyeltük meg. Mivel a Fenton- és Udenfriend-modellek fiziológiás körülmények közötti relevanciája alátámasztható, így a szalicilsav biotranszformációja során a hidroxilált metabolitok képződésében szerepük nem kizárható.

Az értekezésben bemutatott analitikai meghatározások lehetőséget biztosítottak a RET Medipolisz pályázatban farmakokinetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

A szalicilsav metabolizmusának *in vitro és in vivo* vizsgálatai egy újabb kutatási irány elindítását jelentik, amelyek elvezethetnek bennünket az acetilszalicilsav terápiás alkalmazása során a klinikai körülmények között észlelt hatások és/vagy mellékhatások mechanizmusainak megismeréséhez. További célkitűzéseink között szerepel a szalicilsavból keletkező oxidációs metabolitok Fenton- és Udenfriend-modellen történő vizsgálata.

VII Irodalomjegyzék

1. **Iwai K, Suzuki T, Suzuki T and Kobashi M.** Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihyrocapsaicin using mass fragmentography. *J. Chromatogr.* 1976, 123: 119-128.

2. **Ku KH, Lee KA and Park JB.** Physicochemical properties and sensory evaluation for the heat level (hot taste) of korean red pepper powder. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2012, 17: 29-35.

3. **Micko K.** Zur Kenntnis des Capsaicins. *Z. Unters. Nahr. Genussm.* 1898, 1: 818-829.

4. **Nelson EK.** The constitution of capsaicin - the pungent principle of capsicum. *J. Am. Chem. Soc.* 1919, 41: 1115-1121.

5. **Szolcsányi J.** Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 2004, 38: 377-384.

6. **Kulka K.** Aspects of functional groups and flavour. *J. Agric. Food Chem.* 1967, 15: 48-52.

7. **Govindarajan VS and Sathyanarayana MN.** Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism: structure pungency, pain, and desensitization sequences. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1991, 29: 435-474.

8. **Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Perkins MN, Raid DJ and Winter J.** Analogs of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies 1. The aromatic “A-region”. *J. Med. Chem.* 1993, 36: 2362-2372.

9. **Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN and Winter J.** Analogs of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies 2. The amide bond “B-region”. *J. Med. Chem.* 1993, 36: 2373-2380.

10. **Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN and Winter J.** Analogs of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies 3. The hydrophobic side chain “C-region". *J. Med. Chem.* 1993, 36: 2381-2389.

11. **Reilly CA and Yost GS.** Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bioactivation, and detoxification processes. *Drug. Metab. Rev.* 2006, 38: 685-706.

12. **Surh YJ and Lee SS.** Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci.* 1995, 56: 1845-1855.

13. **Bernard BK, Ubukata K, Mihara R, Sato Y and Nemoto H.** Studies of the toxicological potential of capsinoids, XI: pharmacokinetic and tissue distribution study of 14C-dihydrocapsiate and metabolites in rats. *Int. J. Toxicol.* 2010, 29: 3S-14S.

14. **Mózsik Gy, Dömötör A, Past T, Vas V, Perjési P, Kuzma M, Blazics Gy and Szolcsányi J.** Capsaicinoids. Academy Publisher, Budapest, 1st ed., 2009.

15. **Robertson DRC and George CF.** Treatment of post herpetic neuralgia in the elderly. *Br. Med. Bull.* 1990, 46: 113-123.

16. **Altman RD, Aven A, Holmburg CE, Pfeifer LM, Sack M and Young GT.** Capsaicin Cream 0.025% as Monotherapy for Osteoarthritis: A Double-Blind Study. *Semin. Arthritis Rheum.* 1994, 23: 25-33.

17. **Dray A.** Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 44: 611-615.

18. **Boreddy SR and Srivastava SK.** Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals. *Cancer Lett.* 2013, 334: 86-94.

19. **Oikawa S, Nagao E, Sakano K and Kawanishi S.** Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. *Free Radic. Res.* 2006, 40: 966-973.

20. **Lee JS, Chang JS, Lee JY and Kim JA.** Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27: 1147-1153.

21. **Díaz-Laviada I.** Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future Oncol.* 2010, 6: 1545-1550.

22. **Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y and Srivastava SK.** *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 2008, 13: 1465-1478.

23. **Lu HF, Chen YL, Yang JS, Yang YY, Liu JY, Hsu SC, Lai KC and Chung JG.** Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells *in vitro* and COLO 205 tumor xenografts *in vivo*. *J. Agric. Food. Chem.* 2010, 58: 12999-13005.

24. **Oyagbemi AA, Saba AB and Azeez OI.** Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian J. Cancer.* 2010, 47: 53-58.

25. **Reyes-Escogido Mde L, Gonzalez-Mondragon EG and Vazquez-Tzompantzi E.** Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules* 2011, 16: 1253-1270.

26. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997, 389: 816-824.

27. **Suh YG and Oh U.** Activation and activators of TRPV1 and their pharmaceutical implication. *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11: 2687-2698.

28. **Holzer P.** The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 155: 1145-1162.

29. **Szolcsányi J, Nagy J and Pethő G.** Effect of CP-96,345 a non-peptide substance P antagonist, capsaicin, resiniferatoxin and ruthenium red on nociception. *Regul. Pept.* 1993, 46: 437-439.

30. **Helyes Zs, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E and Szolcsányi J.** Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release *in vivo* and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 2003, 73: 2345-2353.

31. **Jancsó N, Jancsó-Gábor A and Szolcsányi J.** Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1967, 31: 138-151.

32. **Szállási Á, Blumberg PM.** Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999, 51: 159-212.

33. **Szolcsányi J, Jancsó GA and Joo F.** Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1975, 287: 157-169.

34. **Szállási A, Joo F and Blumberg PM.** Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Res.* 1989, 503: 68-72.

35. **Szolcsányi J.** Actions of capsaicin on sensory receptors. Capsaicin in the Study of Pain. Wood JN. (Ed.), Academic Press, London, pp. 1-26, 1993.

36. **Leelahuta Y, Glinsukon T, Wangpanish W.** In vitro capsaicin metabolism in the rat, mouse and hamster. *Toxicon*. 1983, 21: 245-248.

37. **Kawada T, Suzuki T, Takahashi M, and Iwai K.** Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984, 72: 449-456.

38. **Donnerer J, Amann R, Schuligoi R and Lembeck F.** Absorption and metabolism of capsaicinoids following intragastric administration in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1990, 342: 357-361.

39. **Suresh D and Srinivasan K.** Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J. Med. Res.* 2010, 131: 682-691.

40. **Saria A, Lembeck F and Skofitsch G.** Determination of capsaicin in tissues and separation of capsaicin analogues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1981, 208: 41-46.

41. **Reilly CA, Ehlhardt WJ,Jackson DA, Kulanthaivel P, Mutlib AE, Espina RJ, Moody DE, Crouch DJ and Yost GS.** Metabolism of capsaicin by cytochrome P450 produces novel dehydrogenated metabolites and decreases cytotoxicity to lung and liver cells. *Chem. Res. Toxicol.* 2003, 16: 336-349.

42. **Hayman M and Kam P.** Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 2008, 19: 338-343.

43. **Surh YJ, Ahn SH, Kim KC, Park JB, Sohn YW and Lee SS.** Metabolism of capsaicinoids: evidence for aliphatic hydroxylation and its pharmacological implications. *Life Sci.* 1995, 56: PL305-PL311.

44. **Oi Y, Kawada T, Watanabe T and Iwai K.** Induction of capsaicin-hydrolyzing enzyme activity in rat liver by continuous oral administration of capsaicin. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40: 467-470.

45. **Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A and Bley K.** In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metab. Dispos.* 2008, 36: 670-675.

46. **Pershing LK, Reilly CA, Corlett JL and Crouch DJ.** Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, 200: 73-81.

47. **Babbar S, Marier JF, Mouksassi MS, Beliveau M, Vanhove GF, Chanda S and Bley K.** Pharmacokinetic analysis of capsaicin after topical administration of a high-concentration capsaicin patch to patients with peripheral neuropathic pain. *Ther. Drug Monit.* 2009, 31: 502-510.

48. **Mózsik Gy.** Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients. Capsaicin as a Therapeutic Molecule, Abdel-Salam OME (Ed.), Springer Pubblishers, Basel, pp. 195-245, 2014.

49. **O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M and Dickenson AH.** Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacol. Rev.* 2012, 64: 939-971.

50. **Stone E.** Anaccount of the success of the bark of the willow in the cure of agues. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 1763, 53: 195-200.

51. **Sharp G.** The history of the salicylic compounds and of salicin. *The Pharmaceutical Journal* 1915, 94: 857-858.

52. **Akao T, Yoshino T, Kobashi K and Hattori M.** Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury. *Planta Med.* 2002, 68: 714-718.

53. **Jourdier S.** A miracle drug. Chemistry in Britain, 1999.

54. **Stricker S.** Über die Resultate der Behandlung der Polyarthritis rheumatica mit Salicylsäure. *Berliner Klinische Wohenschrift*, 1876, 13: 1-2, 15-16, 99-103.

55. **Újszászy L, Nemesánszky E and Rácz I.** A ciklooxigenáz-2 (COX-2) enzim gátlás evolúciója és az alkalmazás gasztroenterológiai vonatkozásai. *Gyógyszereink* 2000, 50: 181-189.

56. **Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH and O'Banion MK.** COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Mol. Brain Res.* 2003, 119: 213-215.

57. **Chandrasekharan NV, Dai H, Lamar Turepu Roos K, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS and Simmons DL.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99: 13926-13931.

58. **Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ and Vane JR.** Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 90: 11693-11697.

59. **Hawkey CJ.** COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999, 353: 307-314.

60. **Ehrlich K, Sicking C, Respondek M, and Peskar BM.** Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. *JPET* 2004, 308: 277-283.

61. **Mancini JA, Riendeau D, Falgueyret JP, Vickers PJ and O'Neill GP.** Arginine 120 of the prostaglandin G/Hsynthase-1 is required for the inhibition bynonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 29372-29377.

62. **DeWitt DL.** COX-2 selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharmacol.* 1999, 55: 625-631.

63. **Roth GJ, Stanford N and Majerus PW.** Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975, 72: 3073-3076.

64. **Roth GJ and Siok CJ.** Acetylation of the NH_2-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin. *J. Biol. Chem.* 1978, 253: 3782-3784.

65. **Burch JW, Stanford N and Majerus PW.** Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J. Clin. Invest.* 1978, 61: 314-319.

66. **Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL and Smith WL.** Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 13207-13215.

67. **Clària J and Serhan CN.** Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 9475-9479.

68. **Serhan CN.** Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007, 25: 101-137.

69. **Hawkins D, Pinckard RN, Crawford IP and Farr RS.** Structural changes in human serum albumin induced by ingestion of acetylsalicylic acid. *J. Clin. Invest.* 1969, 48: 536-542.

70. **Pinckard RN, Hawkins D and Farr RS.** *In vitro* acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. *Nature* 1968, 219: 68-69.

71. **Bridges KR, Schmidt GJ, Jensen M, Cerami A and Bunn HF.** The acetylation of haemoglobin by aspirin. In vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 1975, 56: 201-207.

72. **Tsuji M, Kawano S and DuBois RN.** COX-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 94: 3336-3340.

73. **Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ and Murray FE.** The relationship between cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 1999, 282: 1254-1257.

74. **Saunders MA, Sansores-Garcia L, Gilroy D and Wu KK.** Selective suppression of C/EBPb binding and COX-2 promoter activity by sodium salicylate in quiescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 18897-18904.

75. **U.S. Preventive Services Task Force.** Routine aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the primary prevention of colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 2007, 146: 361-364.

76. **Algra AM and Rothwell PM.** Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol.* 2012, 13: 518-527.

77. **Manzano A and Pérez-Segura P.** Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention? Scientific World J. 2012, 327-341.

78. **Kune GA, Kune S and Watson LF.** Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 1988, 48: 4399-4404.

79. **Thun MJ, Namboodiri MN and Heath CW Jr.** Aspirin use and reduced risk of fatal coloncancer. *N. Engl. J. Med.* 1991, 325: 1593-1596.

80. **Schrör K.** Acetylsalicylic acid, Wiley-Blackwell, Weinheim, 2009.

81. **Takagi M, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H, Oku N and Yamashita S.** A new interpretation of salicylic acid transport across lipid bilayer: Implications of pH-dependent but not carrier-mediated absorption from the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 285: 1175-1180.

82. **Pang KS.** Modeling of intestinal drug absorption: Roles of transporters and metabolic enzymes (for the gillette review series). *Drug Metab. Dispos.* 2003, 3: 1507-1519.

83. **Rowland M.** The influence of route of administration on drug availability. *J. Pharm. Sci.* 1972, 101: 70-74.

84. **Gibaldi M, Boyes RN and Feldman S.** The influence of first pass effect on availability of drugs. *J. Pharm. Sci.* 1971, 60: 1338-1340.

85. **Tsuji A and Tamai I.** Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res. (NY).* 1996, 13: 963-977.

86. **Cohen LS.** Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Semin. Thromb. Hemost.* 1976, 2: 146-175.

87. **Green FA and Young CY.** Acetylation of erythrocytotic membrane peptides by aspirin. *Transfusion* 1981, 21: 55-58.

88. **Dromgoole SH and Furst DE.** Salicylates, in Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring, Evans WE, Schentag JJ and Jusko WJ (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1992.

89. **Ghahramani P1, Rowland-Yeo K, Yeo WW, Jackson PR and Ramsay LE.** Protein binding of aspirin and salicylate measured by *in vivo* ultrafiltration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1998, 68: 285-295.

90. **Smith MJH and Dawkins PD.** Salicylate and enzymes. *J. Pharm. Pharmacol.* 1971, 23: 729-744.

91. **Strolin-Benedetti M, Brogin G, Bani M, Oesch F and Hengstler JG.** Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress *in vivo* as evidenced by 3-hydroxylation of salicylate. *Xenobiotica* 1999, 29: 1171-1180.

92. **Halliwell B and Grootveld M.** The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett.* 1986, 213: 9-14.

93. **Hutt AJ, Caldwell J and Smith RL.** The metabolism of aspirin in man: a population study. *Xenobiotica* 1986, 16: 239-249.

94. **Miners JO.** Drug interactions involving aspirin (acetylsalicylic acid) and salicylic acid. *Clin. Pharmacokinet.* 1989, 17: 327-344.

95. **Udenfriend S and Cooper JR.** The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 1952, 194: 503-511.

96. **Bilinski T, Krawiec Z, Liczmanski A and Litwinska J.** Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 130: 533-539.

97. **Mwebi NO.** Fenton & Fenton-like reactions: the nature of oxidizing intermediates involved. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, Maryland, 2005.

98. **Barbusinski K.** Fenton reaction - Controversy Concerning the Chemistry. *Ecol. Chem. Eng.* S 2009, 16: 347-358.

99. **Udenfriend S, Clark CT, Axelrod J and Brodie BB.** Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 1954, 208: 731-739.

100. **Barron ESG, de Meio RH and Klemperer F.** Studies on biological oxidations. V. Copper and hemochromogens as catalysts for the oxidation of ascorbic acid. The mechanism of the oxidation. *J. Biol. Chem.* 1936, 112: 625.

101. **Brodie BB, Axelrod J, Shore PA and Udenfriend S.** Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. II. Products formed by reaction of substrates with ascorbic acid, ferrous ion, and oxygen. *J. Biol. Chem.* 1954, 208: 741-750.

102. **Axelrod J, Udenfriend S and Brodie BB.** Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. III. Effects of ascorbic acid on hydroxylation of acetanilide, aniline and antipyrine *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1954, 11: 176-181.

103. **United State Pharmacopoeial Convention.** United States Pharmacopoeia 29/National Formulary 24. Rockville, MD, pp. 363-364, 2006.

104. **Fischer E, Rafiel A and Bojcsev S.** Intestinal elimination of *p*-nitrophenol in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 1995, 83: 355-362.

105. **Goon D and Klaassen CD.** Dose-dependent intestinal glucuronidation and sulfation of acetaminophen in the rat *in situ*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990, 252(1): 201-207.

106. **Halliwell B, Hoult RJ and Blake DR.** Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* 1988, 2: 2867-2873.

107. **Takeuchi K and Satoh H.** NSAID-Induced Small Intestinal Damage - Roles of Various Pathogenic Factors. *Digestion* 2015, 91: 218-232.

VIII Saját közlemények és kongresszusi prezentációk jegyzéke

A tézis alapját képező közlemények

1. Mózsik Gyula, Past Tibor, Omar M. E. Abdel Salam, **Kuzma Mónika**, Perjési Pál: Interdisciplinary review for correlation between the plant origin capsaicinoids, non-steroidal antiinflammatory drugs, gastrointestinal mucosal damage and prevention in animals and human beings.
   Inflammopharmacology, 2009, 17(3): 113-150.
   IF: -
2. Mózsik Gyula, Past Tibor, Dömötör András, Kuzma Mónika, Perjési Pál: Production of orally applicable new drug or drug combinations from natural origin capsaicinoids for human medical therapy.
   Curr. Pharm. Des. 2010, 16(10): 1197-1208.
   IF: 4,774
3. **Kuzma M**, Fodor K, Maász G, Avar P, Mózsik Gy, Past T, Fischer E, Perjési P.: A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat.
   J Pharm. Biomed. Anal. 2014, 103C: 59-66.
   IF: 2,83
4. **Kuzma M**, Fodor K, Boros B, Perjési P.: Development and Validation of an HPLC-DAD Analysis for Pharmacopoeial Qualification of Industrial Capsicum Extracts.
   J Chromatogr. Sci. 2015, 53(1): 16-23.
   IF: 1,363
5. **Kuzma M**, Nyúl E, Mayer M, Fischer E, Perjési P.: Analysis of intestinal absorption and metabolism of salicylic acid. *Biomed. Chromatogr.* Közlésre beküldve.

Egyéb közlemények

1. Markó Lajos Dr., Molnár Gergő Attila Dr., Wagner Zoltán Dr., Kőszegi Tamás Dr., Matus Zoltán Dr., Mohás Márton Dr., **Kuzma Mónika**, Szijártó István András, Wittmann István Dr.: Immunnefelometria és nagy teljesítményű folyadékkromatográfia a microalbuminuria vizsgálatában. Újonnan javasolt határértékek vizsgálata.
   Orvosi Hetilap, 2008, 149: 59-67.
   IF: -

2. **Kuzma Mónika**: Kapszaicinoidok meghatározására alkalmas gázkromatográfiás módszer kidolgozása és alkalmazása.
   Farmakognóziai Hírek, 2009, IV(12): 8-9.
   IF: -
3. Hajtó T, Adámy A, Baranyai L, Langmár Z, Kirsch A, **Kuzma M**. Ábrahám L. Perjési P: Can Standardized Plant Extracts Induce Complete Remission in Patients with Metastatic Tumors?
   Altern. Integr. Med. 2014, 3(3): 161-166.
   IF:-
4. Poór M, **Kuzma M**, Matisz G, Li Y, Perjési P, Kunsági-Máté S, Kőszegi T.: Further aspects of ochratoxin A-cation interactions: complex formation with zinc ions and a novel analytical application of ochratoxin A-magnesium interaction in the HPLC-FLD system.
   Toxins (Basel), 2014, 6(4): 1295-1307.
   IF: 2,48
5. Hajtó T, Baranyai L, Kirsch A, **Kuzma M**, Perjési P.: Can a synergistic activation of pattern recognition receptors by plant immunomodulators enhance the effect of oncologic therapy? Case Report of a patient with uterus and ovary sarcoma.
   Clin. Case Rep. Rev. 2015, 1(10): 235-238.
   IF: -

Könyvek, könyvfejezetek

1. Gyula Mózsik, András Dömötör, Tibor Past, Viktória Vas, Pál Perjési, **Mónika Kuzma**, Gyula Blazics, János Szolcsányi. *Capsaicinoids.* Akadémia Kiadó, 2009.
2. **Mónika Kuzma**, Tibor Past, Gyula Mózsik and Pál Perjési. Pharmacobotanical Analysis and Regulatory Qualification of Capsicum Fruits and Capsicum Extracts. A Survey. Open acess, *Capsaicin - Sensitive Neural Afferentation and the Gastrointestinal Tract: from Bench to Bedside*, book edited by Gyula Mózsik, Omar M. E. Abdel-Salam and Koji Takeuchi, 2014.

Idézhető absztraktok

1. **Kuzma Mónika**, Molnár Szilárd, Perjési Pál: Szalicilsav Fenton-reakcióval történő oxidációjának vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII., Budapest, 2006. május 25-27. *Gyógyszerészet* (kongresszusi különszám) 2006, p. 67.

2. Perjési Pál, **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Rozmer Zsuzsanna: Application of crocin bleaching and deoxyribose degradation tests to assess antioxidant capacity of capsaicinoids and some selected flavonoids. 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Tartu, September 13-15, 2007. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32(S1), 39 (2007)

3. **Kuzma Mónika**, Molnár Szilárd, Perjési Pál: Kapszaicinoidok meghatározására alkalmas gázkromatográfiás módszer kidolgozása és alkalmazása. Gyógyszer az ezredfordulón VII. A XXI. század kihívásai a gyógyszerészetben. Sopron, 2008. szeptember 25-27. *Magyar Epidemiológia* 5(S2), S156 (2008)

4. **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Boros Borbála, Perjési Pál: HPLC-DAD módszer fejlesztése és alkalmazása kapszaicinoid-tartalmú extraktum kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest, 2009. november 13-15. *Gyógyszerészet Supplementum* 2009/11, S114.

5. **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Past Tibor, Mózsik Gyula, Perjési Pál: HPLC-FLD módszer fejlesztése és alkalmazása kapszaicin és dihidrokapszaicin plazmából történő meghatározására. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest, 2009. november 13-15. *Gyógyszerészet Supplementum* 2009/11, S115.

6. Székely Noémi Piroska, Almási Attila, **Kuzma Mónika**, Fischer Emil, Perjési Pál: Az ibuprofén felszívódásának és kiválasztásának vizsgálata *in vivo* állatkísérletes modellen. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, 2014. április 10-12. *Gyógyszerészet Supplementum* 2014/14, S78.

7. Nyúl Eszter, **Kuzma Mónika**, Perjési Pál: Szalicilátok vékonybél-metabolizmusának vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, 2014. április 10-12. *Gyógyszerészet Supplementum* 2014/14, S77.

8. **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Maász Gábor, Avar Péter, Mózsik Gyula, Past Tibor, Fischer Emil, Perjési Pál: Kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusának vizsgálata HPLC-FLD módszerrel. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, 2014. április 10-12. *Gyógyszerészet Supplementum* 2014/14, S76.

Poszterek

1. **Kuzma Mónika**, Molnár Szilárd, Perjési Pál: Capsaicinoidok meghatározására alkalmas gázkromatográfiás módszer kidolgozása és alkalmazása. *Gyógyszerkutatási Szimpózium*, Debrecen, 2006.
2. **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Rozmer Zuzsanna, Perjési Pál: Néhány kapszaicinoid és flavonoid antioxidáns hatásának vizsgálata krocin oxidációs teszt és deoxiribóz degradációs teszt alkalmazásával. *Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa*, Pécs, 2007.
3. **Kuzma Mónika**, Molnár Szilárd, Perjési Pál: Szalicilsav Fenton-reakcióval történő oxidációjának vizsgálata. *Gyógyszerkutatási Szimpózium „Kihívások és eredmények”*, Szeged, 2007.
4. Perjési Pál, **Kuzma Mónika**, Fodor Krisztina, Rozmer Zsuzsanna: Studies on *in vitro* antioxidant effect of salicylic acid and its hydroxylated metabolites. *9th International Symposium on Instrumental Analysis*, Pécs, 2008.
5. **Kuzma Mónika**, Benkő András, Perjési Pál: Az acetilszalicilsav és metabolitjainak összehasonlító vizsgálata különböző extrakciós eljárásokkal, humán plazmából, PDA HPLC segítségével. Magyar Elválasztástudományi Társaság Vándorgyűlése, Sárvár, 2008.
6. **Kuzma Mónika**, Molnár Szilárd, Perjési Pál: Kapszaicinoidok meghatározására alkalmas gázkromatográfiás módszer kidolgozása és alkalmazása. *Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa*, Pécs, 2008.
7. **Kuzma M**, Fodor K, Maász G, Avar P, Mózsik G, Past T, Fischer E, Perjési P: Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin metabolism of the small intestine in the rat by HPLC-FLD. *2nd Internal Doctoral Workshop on Natural Sciences*, Pécs, 2013.
8. Almási Attila, Székely Noémi Piroska, Fischer Tamás, **Kuzma Mónika**, Mayer Mátyás, Fischer Emil, Perjési Pál: Az ibuprofén felszívódásának és kiválasztásának vizsgálata vékonybél-perfuzátumban és epében. *45. Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg, 2015.

Előadások

1. **Kuzma M**. Kapszaicinoidok vizsgálatára alkalmas analitikai módszerek fejlesztése. *Tudomány és Tea - Kutatói Fórum a PTE Gyógyszerésztudományi Szakán*, Pécs, 2010.

2. **Kuzma M**. Kapszaicin-tartalmú gyógyszer fejlesztése során végzett analitikai vizsgálatok. *X. Clauder Ottó Emlékverseny*, Budapest, 2011.

3. **Kuzma M,** Kovács N, Sziva L, Maász G, Perjési P. Szalicilátok hidroxilgyökökkel lejátszódó reakciójának vizsgálata. *A Magyar Epidemiológiai Társaság VII. és Közép-Európai Kemoprevenciós Társaság Első Közös Nemzetközi Kongresszusa*, Pécs, 2013.

4. Kovács N, **Kuzma M**, Sziva L, Perjési P, Maász G: The analysis of the reaction between salicylates and hydroxyl radicals. *2nd Internal Doctoral Workshop on Natural Sciences,* Pécs, 2013.

5. Avar P, Pápai Z, **Kuzma M**, Maász G: HPLC-MS analysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and their metabolites. *2nd Internal Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013.*

6. **Kuzma M**, Mózsik Gy, Perjési P. Kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusának vizsgálata. *Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '14*, Herceghalom, 2014.

7. **Kuzma M**, Nyúl E, Lakatos S, Perjési P. Szalicilátok és kapszaicinoidok vékonybél-metabolizmusának vizsgálata *in vivo* patkány modellen. *Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '15*, Herceghalom, 2015.

IX Köszönetnyilvánítás

Ezúton fejezem ki köszönetemet mindazoknak, akik az elmúlt évek során segítették munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Perjési Pálnak és Prof. Dr. Mózsik Gyulának, hogy szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérték, köszönöm szakmai és személyes tanácsaikat.

Hálás köszönettel tartozom kollégámnak, Dr. Fodor Krisztinának, aki a kromatográfiás módszerfejlesztések kezdetén kitartó társam volt.

Köszönöm Dr. Mayer Mátyásnak, Dr. Maász Gábornak és Dr. Avar Péternek a tömegspektrometriás vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok Dr. Fischer Emil Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított az állatkísérletek elvégzésére Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben, továbbá külön köszönöm Reiszné Németh Máriának az állatkísérletek elvégzésében nyújtott segítségét.

A laboratóriumi munkában és a HPLC mérésekben nyújtott segítségéért köszönetet mondok Dancsné Német Nórának.

Köszönettel tartozom Ódorné Fábián Erikának a dolgozat ábraanyagának elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm a Gyógyszerészi Kémiai Intézet minden munkatársának az évek során nyújtott segítségét.

Végül köszönöm barátaim biztatását, családom támogatását, megértő türelmét és mindazt a szeretetet, amit tőlük kaptam.