

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

**Dr. Kuzma Mónika**



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

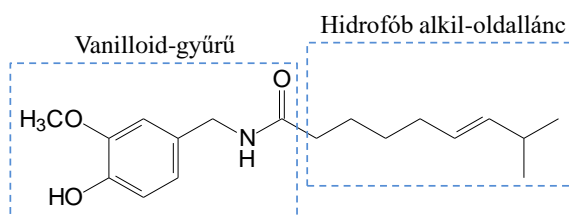
## I. Bevezetés

### I.1. Kapszaicinoidok

A különféle paprikák a burgonyafélék (*Solanaceae*) családján belül a *Capsicum* nemzetségbe tartoznak. Egyik közös tulajdonságuk, hogy egy kapszaicinoid-vegyületekből álló keveréket termelnek, amely megfelelő koncentrációban csípős érzetet vált ki. 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.

A kapszaicinoid-vegyületek közös szerkezeti eleme a 3-hidroxi-4-metoxi-benzilamid (vanilloid) molekularész, csak hidrofób alkil-oldalláncukban különböznek egymástól (**1**). 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.

A kapszaicinoid-vegyületek legjelentősebb hatásai között szerepelnek a következők: serkentik az emésztést, megóvják a gyomor nyálkahártyáját az alkohol, illetve a nem-szteroid gyulladáscsökkentők okozta károsodásoktól, csillapítják a reumás ízületi gyulladást és a szenzoros neuropátiás fájdalmat, valamint tumorelles és antioxidáns hatással rendelkeznek.



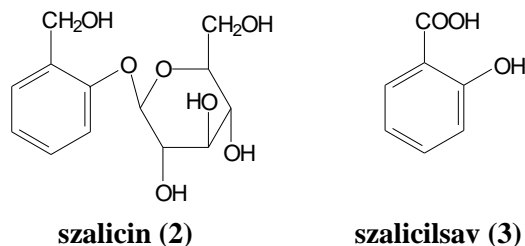
**kapszaicin (1)**

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. 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.

### I.2. Szalicilsav származékai, a szalicilátok

A fehér fűzfa (*Salix alba*) kérgéből és leveléből készült kivonat fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatása már az ókor óta ismert.

Kezdetben úgy vélték, hogy a porított fűzfakéregből készült extraktum hatásért felelős komponense a szalicin-glikozid (2). 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 (3).



A XIX. század hetvenes-nyocvanas éveiben a szalicilsav volt a reuma leghatékonyabb gyógyszere, azonban a krónikus reumás fájdalom kezelésében alkalmazott magas (4-6 g/nap) dózist súlyos mellékhatások kísérték (pl.: gyomorhurut, fülzúgás). A szalicilsav kémiai módosításával előállított acetilszalicilsav a szalicilsavhoz viszonyítva csekélyebb mértékű mellékhatásokkal rendelkezik. Hatása az intakt molekula acetyl- és szalicilát-részének, valamint a belőle képződő aktív szalicilát-metabolitnak egyaránt köszönhető.

A szalicilátok a prosztaglandinok bioszintézisét elindító ciklooxygenáz (COX) enzimek gátlói. A ciklooxygenáz rendszer gátlásával a prosztaglandin-funkciókban működészavar támad, ennek következményeként alakul ki a szalicilátok terápiás jelentőségű láz- és fájdalomcsillapító, valamint gyulladáscsökkentő hatása (acetilszalicilsav esetén trombocita-aggregációt gátló hatás is). Ugyanakkor a prosztaglandin-szintézis gátlása tehető felelőssé a szalicilátok olyan mellékhatásainak megjelenéséért is, mint például a gyomor- és bél-nyálkahártyakárosító (ulcerogén) hatás, vagy a nefrotoxicitás.

A szalicilsav és az acetilszalicilsav egyaránt savas karakterű vegyületek ( $pK_a(\text{SA})=3,00$ ;  $pK_a(\text{ASA})=3,50$ ). Gyomorból való felszívódásuk passzív diffúzióval történik. A vékonybélben (pH 2,0-7,0) 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<sup>2</sup>) köszönhető. A szalicilátok nem-ionizált formájának passzív diffúziója mellett specifikus carrier-mediált transzportfolyamatok (pl.: organikus anion transzporter-1) is fontos szerepet játszanak a savas karakterű gyógyszervegyületek vékonybélből történő felszívódásában.

Az acetilszalicilsav 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 főként a máj enzimszere által (enzimkatalizált és nem-enzimatikus) oxidációval illetve konjugációval alakul tovább. 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.

## II. Célkitűzések

A nemsteroid-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 támogatásával. Orális alkalmazású, gyógyszer kategóriába tartozó kapszaicinoid-tartalmú készítmény fejlesztése kapcsán kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok és preklinikai állatkísérletekből származó plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására alkalmas analitikai módszerek fejlesztését tűztük ki célul.

A preklinikai állatkísérletekből származó minták vizsgálata során nem várt eredményt tapasztaltunk, miszerint a két legnagyobb mennyiségben előforduló kapszaicinoid-komponens (kapszaicin és dihidrokapszaicin) még nagy dózisok adását követően sem volt kimutatható a vizsgált állatok plazmájában. Ezen eredmények alapján a kapszaicinoidok preszisztémás átalakulásait feltételezve indokoltá vált a vegyületek *in vivo* felszívódásának és extrahepatikus metabolizmusának vizsgálata.

Az acetilszalicilsav és a belőle képződő fenolos karakterű szalicilsav máj általi biotranszformációja igen jól ismert az irodalomból, azonban keveset tudunk a szalicilátok sorsáról a vékonybélben.

A szalicilsav gyökfogyó (antioxidáns) hatással rendelkezik, pl.: acetilszalicilsavval kezelt rheumatoid arthritisben szenvedő egyéneknél megfigyelhető a kizárólag nem-enzimkatalizált reakcióban keletkező szalicilát-metabolitok (pl.: 2,3-dihidroxibenzoésav) mennyiségének szignifikáns emelkedése. Azonban nagyobb dózisban a szalicilsav szétkapcsolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt, amelynek eredményeképpen megnöveli az oxigénfelvételt, így fokozza a reaktív oxigénszármazékok képződésének valószínűségét. 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 hatásmechanizmusáiban?

### **Céljaink között szerepelt:**

- Kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok minősítése céljából kapszaicin és dihidrokapszaicin tartalmi meghatározására alkalmas validált nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer fejlesztése és alkalmazása.
- 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.
- Kapszaicinoidok *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a keletkező metabolitok szerkezetének igazolása.
- Szalicilsav és hidroxilált metabolitjai (2,3-dihidroxibenzoésav és 2,5-dihidroxibenzoésav) elválasztására alkalmas validált HPLC módszer fejlesztése.
- Szalicilsav vékonybélből való felszívódásának vizsgálata *in vivo* patkány-modellen.
- Szalicilsav *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a keletkező metabolitok szerkezetének igazolása.
- Szalicilsav *in vitro* oxidatív átalakulásainak Fenton- és Udenfriend-inkubálás során való vizsgálata.

## **III. Vizsgálati módszerek és eredmények**

### **III.1. Kapszaicinoidok gyógyszeralapanyagból való meghatározására alkalmas validált HPLC-DAD módszer fejlesztése**

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 diódasorral (DAD) kapcsolt ( $\lambda=281$  nm) fordított fázisú HPLC-módszert. 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.

Méréseink eredményeként megállapíthatjuk, 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.

### **III.2. Kapszaicinoidok *per os* alkalmazást követő 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  $\mu\text{g}/\text{tkg}$  (0; 100; 300; 900; 1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 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 hidroxil-(metoxibenzil) funkciós csoportjához rendelhető fluoreszcens aktivitás az UV-detektáláson alapuló módszerekhez képest jóval nagyobb érzékenységet biztosít.

A plazmamintákat fehérjementesítést és szilárd fázisú extrakciót követően analizáltuk az általunk fejlesztett fordított fázisú HPLC-FLD módszerrel ( $\lambda_{\text{ex}} = 230 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 323 \text{ nm}$ ). A módszert sikeresen alkalmaztuk kapszaicinoidokat igen alacsony koncentrációban tartalmazó plazma minták kapszaicin- és dihidrokapszaicin-tartalmának meghatározására. 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. A kapott eredmények számos, a kapszaicinoidok farmakokinetikájával kapcsolatos kérdést vetnek fel.

### **III.3. Kapszaicinoidok *in vivo* vékonybél-metabolizmusának vizsgálata patkány-modellen, a perfúzió során keletkező minták analízise**

A preklinikai-toxicológiai 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  $\mu$ M 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  $\rightarrow$  perfuzátum) újraprofilált HPLC-FLD módszert alkalmaztuk.

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

A kapszaicin és a dihidrokapszaicin mennyiségének csökkenésével párhuzamosan két metabolit megjelenését tapasztaltuk, melyek perfuzátumbeli mennyisége a vizsgálat időtartama alatt exponenciális növekedést mutatott. A perfúzió során a kapszaicinoidok metabolizálódtak a vékonybélben és a bél lumen irányába történő kiválasztódás eredményeként a képződő bomlástermékek megjelentek a perfuzátumban. HPLC-MS analízis lehetővé tette a metabolitok szerkezetének meghatározását. A két metabolit a kapszaicin és dihidrokapszaicin glükuronid-konjugátumaként volt azonosítható.

A kapszaicinoidok vékonybélben történő átalakulása magyarázatként szolgálhat arra a kérdésre, hogy a toxicológiai vizsgálatok során nyert plazma mintákban miért nem volt kimutatható az orálisan alkalmazott kapszaicinoid-extraktum két fő komponense, a kapszaicin és a dihidrokapszaicin.

### III.4. Szalicilátok vékonybélből való 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.

Méréseink igazolták, hogy a vizsgált nátrium-szalicilát felszívódik a vékonybélből. A perfúzió teljes időtartama alatt a perfundált izotóniás perfúziós médiummal készült 250  $\mu$ M-os nátrium-szalicilát-oldat koncentrációja megközelítőleg a felére csökkent.

### III.5. Szalicilátok vékonybél-metabolizmusának vizsgálata

Vizsgálatainkat *in vivo* patkány-modellen végeztük, amely során az éhbél (jejunum) felső szakaszát perfundáltuk nátrium-szalicilát standard 250  $\mu$ M koncentrációjú izotóniás perfúziós médiummal készült oldatával.

A perfúzió 90 percnyi időtartama alatt a 250  $\mu$ M koncentrációjú nátrium-szalicilát-oldat szalicilát-tartalmának megközelítőleg a fele szívódott fel a vékonybélből. A különböző időpontokban vett perfuzátum mintákat kimosást követő folyadék-folyadék extrakció után HPLC-DAD-MS módszert alkalmazva analizáltuk. A kísérlet utolsó mintavételi időpontjából származó mintában a szalicilsav mellett igen kis koncentrációban 2,3-dihidroxibenzoészav és 2,5-dihidroxibenzoészav is azonosítható volt.

A nem-szteroid gyulladáscsökkentők bélnyálkahártya károsító hatásuk révén növelik a bélnyálkahártya mieloperoxidáz aktivitását. A képződő reaktív oxigénszármazékok (pl.:  $\text{OH}\cdot$ ) igen nagy reakciókészséggel bírva képesek az endogén és exogén molekulákat nem specifikus, nem-enzimkatalizált reakcióban oxidálni.

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



### III.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 háttérben 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.

#### Szalicilsav Fenton-reakcióban való átalakulásának vizsgálata

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  $\text{Fe}^{3+}$ -ionok szalicilsavval való komplexképzési reakciója és (3) a Fenton-reakcióban képződő hidroxilgyökök szalicilsavval való szubsztitúciós reakciója. A kialakuló reakciótermékek mennyiségét nagymértékben befolyásolja az inkubálás során alkalmazott hidrogén-peroxid-koncentráció, a  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  arány, a pH, valamint az inkubálási idő.

A Fenton-reakció lejátszódásának pH-optimuma savas tartományban van (pH 3-4). Ilyen körülmények között (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  és 3 mM  $\text{Fe}^{2+}$  mellett) nem régiószelektív szubsztitúció eredményeként a szalicilsavból 2,3-dihidroxibenzoészav, 2,4-dihidroxibenzoészav és 2,5-dihidroxibenzoészav keletkezik, amelyet saját vizsgálataink eredményei is alátámasztottak.

Magasabb hidrogén-peroxid-koncentráció (1 mM  $\rightarrow$  10 mM) mellett a szalicilát-típusú vegyületek nem volt kimutatható az inkubátumokban. A  $\text{Fe}^{2+}$ -ionok inkubátumbeli koncentrációjának csökkentése (3 mM  $\rightarrow$  300  $\mu\text{M}$ ) a keletkező dihidroxibenzoészavak egymáshoz viszonyított koncentráció-arányában okozott eltolódást. A Fenton-reakció fiziológiás pH-n (pH 7,2) 2,3-dihidroxibenzoészav és 2,5-dihidroxibenzoészav keletkezését eredményezte, azonban a savas körülmények között végbemenő reakcióhoz képest a termékek aránya a 2,5-dihidroxibenzoészav irányába tolódott el.

## Szalicilsav Udenfriend-reakcióban való átalakulásának vizsgálata

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

Udenfriend és munkatársai a szalicilsav inkubálását követően dietil-éteres extraktumban 2,5-dihidroxibenzoésav jelenlétét tudták kimutatni.

Saját vizsgálataink során azt találtuk, hogy a szalicilsav Udenfriend-inkubációja 2,5-dihidroxibenzoésav mellett 2,3-dihidroxibenzoésav, továbbá igen kis mennyiségben katechol és 2,4-dihidroxibenzoésav keletkezését is eredményezi.

## IV. Új eredmények összefoglalása

- Kapszaicinoid-tartalmú gyógyszeralapanyagok minősítése céljából kapszaicin és dihidrokapszaicin tartalmi meghatározására alkalmas validált HPLC módszert fejlesztettünk.
- 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.
- *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.
- *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  $\cdot\text{OH}$ -scavenger hatással is bírnak,

ezért a 2,3- és 2,5-dihidroxibenzoésavak perfuzátumban való megjelenése háttérben  $\cdot\text{OH}$  által katalizált reakciót feltételezünk.

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

## V. Publikációk listája

### 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.: Immunefelometria és nagy teljesítményű folyadékkromatográfia a microalbuminuria vizsgálatában. Újonnan javasolt határértékek vizsgálata.  
Orvosi Hetilap, 2008, 149: 59-67.  
IF: -
2. Kuzma Mónika: Kapszaicinoidok meghatározására alkalmas gázkromatográfias 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 access, 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. Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006.
2. Kuzma Mónika, Fodor Krisztina, Rozmer Zuzsanna, Perjési Pál: Néhány kapszaicinoid és flavonoid antioxidáns hatásának vizsgálata krocín 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. Gyógyszerkutató 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 Kemoprevenációs 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.

## **VI. Köszönetnyilvánítás**

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 kromatográfias 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 és megértő türelmét.