

**DIABÉTESZ HATÁSA A CITOKRÓM P450 KATALIZÁLT
GYÓGYSZERMETABOLIZMUSRA
- A DICLOFENAC ÉS K-48 METABOLIZMUS
PÉLDÁJÁN**

Doktori (Ph.D.) tézisek

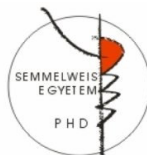
BENKŐ BERNADETT

Richter Gedeon NyRt.
In Vitro Metabolizmus Kutató Laboratórium

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



RICHTER GEDEON



Témavezető: Dr. Tihanyi Károly, C.Sc., Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Veres Zsuzsanna, Ph.D., D.Sc.
Dr. Perjési Pál, C.Sc., Ph.D., habil

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Takácsné Novák Krisztina, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Klebovich Imre, Ph.D., D.Sc.
Dr. Monostory Katalin, Ph.D.

Budapest
2008

SUMMARY

Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) is a complex metabolic disorder, which develops changes in the cytochrome P450 (CYP), mediated metabolism in the liver and in the small intestine and it may also produce altered bioavailability. The main goal of this study was to reveal these metabolic changes in experimental diabetic rats and to evaluate their significance in the drug metabolism.

Decreased intestinal CYP3A mediated metabolism in spite of the statistically unaltered total CYP content resulted, which suggests either posttranslational regulation of the enzyme via covalent down-regulation (e.g. phosphorylation) or a change in the intestinal isoenzyme composition. Insulin may be involved in the intestinal CYP3A regulation since inverse correlation was found between the blood glucose concentration (as a marker for insulin level) and the CYP3A function. The hepatic total CYP content and the hepatic CYP2E1 and FMO3 gene expression and function were seen to change remarkably in untreated long-term diabetes and following insulin treatment. Our study concentrated on rat hepatic CYP2C11, CYP2C13, CYP2C22 and CYP2C23 isoforms and reduced gene expressions with the exception of CYP2C23 were found in diabetes, which is explained, by its different physiological role and regulation. The mRNA level of CYP2C11 and CYP2C13 isoforms were sensitive to insulin showing the role of insulin in their regulation. The study resulted in unaltered CL_{int} of the CYP2C substrate; diclofenac in either insulin treated or untreated diabetic rats. Similarly, unchanged biotransformation of the cholinesterase reactivator oxime, K-48 was seen in diabetes. These results suggest no influence of diabetes and particularly compensated diabetes on the metabolism of the two drugs investigated. The *in vitro* and *in vivo* metabolism studies of K-48 resulted in a weak metabolism. None of the *in silico* predicted metabolites but the K-48 was found in serum, CSF and brain while an epoxide metabolite was detected in urine. The presence of K-48 in the brain shows a moderate penetration of K-48 to the CNS.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az inzulinfüggő diabétesz (IDDM) megváltoztatja a máj és a vékonybél monooxigenáz enzimeinek működését. A megváltozott metabolikus kapacitás megváltozott gyógyszer-biohasznosulást eredményezhet. Vizsgálataink célja patkányban streptozotocinnal (STZ) kiváltott IDDM citokróm P450 enzimrendszerre (CYP) kifejtett hatásának és jelentőségének tanulmányozása volt, egy gyógyszer és egy fejlesztés alatt álló gyógyszerjelölt metabolizmusában.

Kísérletes diabéteszben csökkent intesztinális CYP3A aktivitást mutattunk ki változatlan citokróm P450 tartalom mellett, melyet egy lehetséges poszttranszlációs szabályozással (pl. foszforiláció), illetve az intesztinális CYP izoenzimösszetétel megváltozásával magyarázhatunk. Fordított korrelációt találtunk az intesztinális CYP3A aktivitás és az inzulinszint egyik markere, a vércukorszint között, ebből az inzulin reguláló szerepére következtetünk. 28 napig fennálló diabéteszben és inzulinadást követően a legjelentősebb változást a máj CYP tartalmában illetve a hepatikus CYP2E1 és FMO3 génexpresszióban és aktivitásban mértük. Patkány máj CYP2C11, CYP2C13 és CYP2C22 mRNS szintje csökkent diabéteszben, ez inzulinkezelésre - a CYP2C22 kivételével - szignifikánsan nőtt. A CYP2C23 génexpresszió nem változott kezelt és kezeletlen diabéteszben, amit ezen izoforma eltérő fiziológiás szerepével és szabályozásával magyarázunk. A csökkent CYP2C expresszió ellenére a diclofenac metabolikus klirensze nem változott kísérletes diabéteszben. Nem volt eltérés a piridinium aldoxim kolinészteráz reaktivátor, a K-48 molekula metabolizmusában sem. Feltételezzük tehát, hogy a kiválasztott molekulák biotranszformációja nem változik meg jelentősen kezeletlen és inzulinnal kompenzált cukorbetegségben. A K-48 *in vitro* és *in vivo* vizsgálata a vegyület mérsékelt metabolizmusát mutatta. Patkány szérumban, likvorban és agy homogenátumban csak a K-48 vegyületet, míg vizeletben annak epoxid metabolitját tudtuk kimutatni. Az alacsony K-48 koncentráció az agyban a molekula kismértékű vér-agy gát penetrációjára utal.

BEVEZETÉS

A gyógyszermetabolizmust a nem, az életkor, a biotranszformáló enzimek polimorfizmusa, endogén anyagok (hormonok, transzkripció faktorok) és xenobiotikumok illetve patológiás eltérések befolyásolják. A metabolizáló enzimek működésében bekövetkező változások a gyógyszerek biotranszformációját és biohasznosulását is megváltoztathatják. Inszulinfüggő diabétes mellitusban (IDDM) a máj és a vékonybél monooxigenáz enzimjeinek mennyisége és működése is módosul. A streptozotocinnal (STZ) kiváltott diabéteszes patkány modellt általánosan alkalmazzák a citokróm P450 (CYP) és a flavin-monooxigenáz (FMO) enzimek expressziójának és aktivitásának vizsgálatára inszulinfüggő diabéteszben. A máj metabolizmussal szemben, a patkány vékonybél citokróm P450 enzimjeinek funkcionális és génexpressziós változásait kísérletes diabéteszben kevésbé vizsgálták. Májban és vékonybélben a legtöbb CYP izoenzim up-regulációja figyelhető meg, melyet az inszulinfüggő diabéteszben bekövetkező anyagcsere- és hormonális változásoknak tulajdonítanak. A CYP2C11 és CYP2C13 izoenzimek expressziója és aktivitása kísérletes diabéteszben csökken, a két izoenzim regulációjáért a diabéteszben csökkent nemi és növekedési hormonok szekréciója a felelős. A STZ diabétesz modellben az enzimváltozásokat az inzulin többnyire részlegesen vagy teljesen visszaállítja, és ez az inzulin (közvetett vagy közvetlen) citokróm P450 enzimeket szabályozó szerepét valószínűsíti.

A gyógyszerkutatás és -fejlesztés során a gyógyszerbiztonság döntő szempont. A patológiás állapotokban megváltozott biotranszformációs folyamatok minél pontosabb ismerete a gyógyszerek biohasznosulásának, átalakulásának és biológiai inaktiválásának szempontjából már a preklinikai kutatás fázisában nélkülözhetetlen. Kevés vizsgálat foglalkozott ezidáig a diabéteszben megváltozott gyógyszer-biotranszformációval, bár ennek jelentősége a diabéteszes betegeknek adott gyógyszerek hatásában nagy lehet. Vizsgálatainkat így e szempontok figyelembevételével végeztük STZ diabéteszes patkányokon.

Kísérleteinkhez diclofenacot, egy általánosan alkalmazott nem-szteroid gyulladáscsökkentőt választottunk. Ismert, hogy az intravénásan adott diclofenac farmakokinetikája (AUC, CL_{int} , V_{ss}) diabéteszes patkányokban megváltozik, ugyanakkor per os adás után nem mutattak ki ilyen változásokat. Az i.v. adagolást követően megváltozott kinetikát a diabéteszben csökkent CYP2C11 katalizált metabolizmussal magyarázzák.

Vizsgálataink során a piridinium aldoxim kolinészteráz reaktivátorok csoportjába tartozó K-48 molekula metabolizmusát is vizsgáltuk, melyet organofoszfát mérgezések antidótumaként fejlesztettek ki.

KÉRDÉSFELVETÉSEK

Célunk patkányban streptozotocinnal kiváltott inzulinfüggő diabétesz máj és vékonybél citokróm P450 enzimrendszerre kifejtett hatásának és jelentőségének a tanulmányozása volt, egy gyógyszer és egy fejlesztés alatt lévő gyógyszerjelölt molekula metabolizmusában. Vizsgálatainkhoz, a hasnyálmirigy β -sejteket károsító diabetogén vegyület, a streptozotocin által okozott patkány-kísérletes modellt alkalmaztuk. A patkányokat a rövid ideig tartó (18 napos) és a hosszan fennálló (28 napos) diabéteszes modellben három csoportba osztottuk: (1) kontroll, (2) STZ diabéteszes és (3) inzulinnal kezelt diabéteszes állatok. A CYP és FMO működését az irodalomban leírt indexreakciókkal, az mRNS expressziót qRT-PCR-rel határoztuk meg. A diclofenac 4'-hidroxiláz enzimkinetikai paramétereinek (K_M , V_{max}) meghatározásával a diabéteszes állapotnak a diclofenac biotranszformációt befolyásoló hatását tanulmányoztuk. A K-48 vegyület metabolizmusát *in silico*, *in vitro* és *in vivo* módszerekkel vizsgáltuk.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan befolyásolja a STZ által okozott diabétesz a patkány vékonybél citokróm P450 tartalmát és CYP3A aktivitását?
2. Van-e szignifikáns kapcsolat az intesztinális CYP3A aktivitás és az inzulinszint (inverz) paramétere, a vércukorszint között?
3. A 28 napon át fennálló diabéteszes állapotban, hogyan változik a fontosabb izoenzimek expressziója és aktivitása?
4. Helyreállítja-e a 9 napon át adagolt inzulin a diabétesz által okozott citokróm P450 változásokat?
5. A CYP2C11 génexpresszió csökkenése együtt jár-e megváltozott enzimek szinttel és enzimaktivitással?
6. Az inzulinnal kezelt és a kezeletlen diabéteszes állapot befolyásolja-e más CYP2C izoenzimek génexpresszióját?
7. Hogyan változnak a diclofenac 4'-hidroxiláz enzim kinetikai paraméterei diabéteszes állapotban és inzulinkezelést követően?
8. A CYP2C11 izoenzim génexpressziójának csökkenése megváltoztatja-e a diclofenac *in vitro* biotranszformációját?
9. Befolyásolja-e a streptozotocin diabétesz a K-48 biotranszformációját *in vitro*?
10. A piridinium aldoxim kolinészteráz reaktivátor, K-48 *in silico* megjósolható metabolitjai keletkeznek-e *in vitro*?
11. Intramuszkuláris adást követően patkány szérumban, likvorban vagy vizeletben kimutatható-e K-48 vagy annak metabolitjai?
12. Bejut-e az intramuszkulárisan adott K-48 molekula az agyba?

MÓDSZEREK

Kísérleti körülmények

	<i>Rövid ideig fennálló diabétesz vékonybél biotranszformáció vizsgálatához</i>	<i>Hosszan fennálló diabétesz máj biotranszformáció vizsgálatához</i>
<i>STZ kezelés (0. nap)</i>	i.p. 70 mg/ttkg (D70, ID70) 0.1M citrát pufferben, pH 6.0	i.v. 55 mg/ttkg (D55, ID55) in 0.1M citrát pufferben, pH 6.0
<i>Inzulinkezelés bevezetése</i>	5. nap	20. nap
<i>Inzulinkezelés időtartama</i>	14 nap	9 nap
<i>Csoportok</i>	kontroll STZ kezelt diabéteszes (D70), Inzulin kezelt diabéteszes (ID70)	kontroll STZ kezelt diabéteszes (D55), inzulin kezelt diabéteszes (ID55)

Vékonybél és máj mikroszóma preparálása

A vékonybél és máj egy-egy darabját 1,15 % KCl tartalmú Tris-HCl pufferben (0.1 M, pH 7.4) homogenizáltuk. A patkányokból mikroszóma preparátumokat differenciál centrifugálással készítettünk. A mikroszóma pelleteket a homogenizáló pufferben reszuszpendáltuk.

Mikroszómális protein és citokróm P450 tartalom mérése

A meghatározásokat spektrofotometriásan Lowry illetve Greim módszere szerint végeztük.

Enzimaktivitások meghatározása

A CYP és FMO enzimek aktivitását az alábbi indexreakciókkal határoztuk meg: fenacetin O-deetiláz (CYP1A), aminopirin N-demetiláz (CYP2B/3A), tolbutamid 4'-hidroxiláz (CYP2C), mefenitoin 4'-hidroxiláz (CYP2C), bufuralol 1'-hidroxiláz (CYP2D), klórzoazon 6-hidroxiláz (CYP2E1), tesztoszteron 6β-hidroxiláz (CYP3A) és benzidamin N-oxigenáz (FMO). A keletkező metabolitok koncentrációját HPLC-UV és spektrofotométer segítségével mértük.

CYP és FMO izoformák mRNS mennyiségének meghatározása

Az RNS izolálását RNeasy Mini Kit alkalmazásával végeztük. Az RNS templátból teljes hosszúságú cDNS szálát "Superscript III First-

Strand Synthesis SuperMix for qRT PCR” felhasználásával nyertünk. Az mRNS mennyiségét Applied Biosystem TaqMan® Gene Expression Assays segítségével mértük. Az mRNS relatív mennyiségét, összehasonlító Ct (treshold cycle) módszerrel határoztuk meg.

Western blot analízis

Tris-Glycine PAGER GOLD Precast gélt és Immobilion-P PVDF membránt alkalmaztunk a CYP2C11 protein expresszió meghatározásához. Elsődleges jelölőként nyúl poliklonális citokróm P450 2C11 (1:1500) és kecske Actin C-11 (1:200) standard antitesteket, másodlagos antitestként biotinilált anti-nyúl (1:2000) és anti-kecske IgG (1:2000) használtunk.

A diclofenac 4'-hidroxiláz enzim kinetikai paramétereinek meghatározása

A mikroszómális protein koncentráció és az inkubálási idő a metabolit képződés lineáris tartományában volt. A szubsztrát koncentrációt 1,56 - 100 μM tartományban növeltük. A kinetikai állandókat (K_M , V_{\max}) a Lineweaver-Burk görbe segítségével határoztuk meg. A metabolikus klírenszt (CL_{int}) a V_{\max}/K_M összefüggés alapján számoltuk.

K-48 metabolizmusának vizsgálata

A K-48 lehetséges metabolitjait illetve azok lipofilitását *in silico*, Pallas Program segítségével prediktáltuk. Az *in vitro* metabolizmust kontroll és a hosszan fennálló diabéteszes állatok máj mikroszóma preparátumain tanulmányoztuk. Az *in vivo* kísérlethez hím patkányokat 50 μM intramuszkulárisan adott K-48 vegyülettel kezeltünk. Ezután szérum, likvor, agyszövet és vizelet mintákat vettünk. Az anyavegyületet illetve a keletkezett metabolitokat HPLC-ECD és HPLC-MS technikákkal mértük.

Adatfeldolgozás

A statisztikai kiértékelést az átlag, szórás, korrelációs koefficiens meghatározását a GraphPad Prism 4.0 programmal végeztük.

EREDMÉNYEK

Fizikai és biokémiai paraméterek

A kontroll állatok vércukorszintje a kísérlet teljes ideje alatt megközelítőleg 100 mg/dl volt. A streptozotocin kezelés hatására az állatok vércukorszintje a kísérletekben 536 mg/dl-re illetőleg 546 mg/dl-re emelkedett. Az inzulinkezelés csökkentette a diabéteszben megemelkedett vércukorszintet (391 és 276 mg/dl), de a csökkenés csak a hosszan fennálló diabéteszes modell esetén volt szignifikáns. A diabéteszes állatok testsúlya és májsúlya jelentősen csökkent. Az inzulinadagolás csak a májsúlyt állította helyre, ez a relatív májsúly szignifikáns növekedését eredményezte.

Diabétesz és inzulinkezelés hatása az intesztinális biotranszformációs folyamatokra

A vékonybél tesztoszteron 6 β -hidroxiláz (CYP3A) aktivitása szignifikánsan csökkent (52 %), míg a teljes citokróm P450 tartalom statisztikailag nem változott a rövid ideig fennálló kísérletes diabéteszben. Inzulinadagolásra a CYP3A aktivitás megnőtt (39 %) a diabéteszben mért aktivitáshoz képest, de a kontroll értéket nem érte el. Az átviteli szám (CYP3A aktivitás teljes citokróm P450 tartalomra vonatkoztatva) 74 és 54 %-kal csökkent a STZ diabéteszes illetve az inzulin kezelt diabéteszes patkányokban. Az inzulinszint csökkenés markerének tekintett vércukorszint emelkedés és a CYP3A aktivitás csökkenés között korrelációt mutattunk ki patkány vékonybélben ($r=0,6787$; $p=0,0054$; $n=14$).

Diabétesz és inzulinkezelés hatása a hepatikus metabolizmusra

CYP és FMO izoformák génexpressziója

Az mRNA expresszió mértékét qRT-PCR-ral határoztuk meg. A legjellegzetesebb változást kísérletes diabéteszben a CYP2E1 (2.2 - szeres) és FMO3 (3-szoros) génexpressziójában találtuk. Mindkét izoenzim mRNA szintje csökkent inzulinkezelést követően, de csak a CYP2E1 esetén volt a változás szignifikáns. A diabéteszes állapot a CYP2D2 génexpresszióját csökkentette (55 %), az inzulinkezelésnek

viszont alig volt hatása a CYP2D2 mRNS szintjére. Más izoenzimek (CYP1A, CYP2B, CYP3A, FMO1) mRNS expressziójában nem volt lényegi változás kezeletlen diabéteszben. Ugyanakkor a CYP1A2 és CYP3A1 génexpressziója szignifikánsan csökkent az inzulinkezelést követően.

A CYP2C izoenzimek génexpressziója

A CYP2C11, CYP2C13 és CYP2C22 izoenzimek génexpressziója csökkent kísérletes diabéteszben. A legnagyobb mértékű csökkenést (95 %) a CYP2C11 mRNS szintje mutatta. Az inzulinkezelés részlegesen helyreállította a CYP2C11 és CYP2C13 mRNS szintet, a CYP2C22 expresszió alig változott. A CYP2C23 izoenzim kezelt és kezeletlen diabéteszben is változatlan maradt.

A CYP2C11 izoenzim Western blot analízise

A CYP2C11 enzimfehérje kontroll állatokban jól detektálható volt, diabéteszben azonban nem tudtuk kimutatni. Az eredmény összhangban van a 95 %-kal csökkent CYP2C11 génexpresszióval. Inzulinadagolásra az enzimfehérje expressziója megnövekedett, de kisebb mennyiségben volt jelen, mint a kontrollban.

CYP és FMO aktivitás a májban

A CYP és FMO aktivitásokat az irodalomban leírt indexreakciókkal mértük. A citokróm P450 tartalom, klorzoxazon 6-hidroxiláz (CYP2E1) és benzidamin N-oxigenáz (FMO) aktivitás szignifikánsan nőtt STZ által kiváltott diabéteszben. A többi izoenzim aktivitása statisztikailag nem változott. Az inzulinkezelés a CYP2E1 aktivitást a kontroll szintre, míg a citokróm P450 tartalmat és FMO aktivitást a kontrollnál is alacsonyabb szintre csökkentette. A CYP2C izoenzim tolbutamid 4'-hidroxiláz és mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitása a csökkent CYP2C11 génexpresszió ellenére statisztikailag nem változott diabéteszes állapotban, bár a mefenitoin metabolizmusa inzulinadagolásra 42 %-kal csökkent a kontrollhoz képest.

Diclofenac metabolizmusa kezelt és kezeletlen diabéteszben

A diclofenac 4'-hidroxiláz enzim kinetikai paramétereit (K_M , V_{max}) kontroll, diabéteszes és inzulinnal kezelt diabéteszes patkányok máj mikroszóma preparátumain határoztuk meg. Diabéteszben a K_M és V_{max} értékek szignifikánsan emelkedtek, ezt a változást az inzulinkezelés csak kismértékben csökkentette. A K_M és V_{max} értékek változása nem eredményezett eltéréseket a metabolikus klírenszekben a vizsgált csoportok között. *In vitro* eredményeink szerint a kísérletes diabéteszben kialakult citokróm P450 változások nincsenek hatással a diclofenac biotranszformációjára és biohasznosulására.

K-48 vegyület metabolizmusa

K-48 molekula mérsékelten metabolizálódott *in vitro* és *in vivo*. Mind a kontroll, mind a diabéteszes patkányok mikroszóma preparátumain mérve 15-20 % -kal csökkent a K-48 koncentráció. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a diabéteszes állapot nem befolyásolta a K-48 biotranszformációját. A K-48 *in vitro* mikroszomális metabolizmusának vizsgálata során hidroxil metabolitot azonosítottunk HPLC-MS segítségével. Az intramuszkulárisan K-48 molekulával kezelt hím patkányokból származó szérum és likvor mintákban illetve az agy homogenátumokban csak az anyavegyületet tudtuk kimutatni. Vizelet mintákban, HPLC-MS technikával epoxid metabolitot azonosítottunk, K-48 nem volt detektálható. Más *in silico* előrejelzett, pl. deaminált vagy N-demetilált metabolitokat, nem tudunk azonosítani sem az *in vitro*, sem az *in vivo* kísérletekben. Az alacsony K-48 koncentráció az agyban, a molekula kismértékű vér-agy gát penetrációjára utal.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kísérleteink eredményei alapján, a STZ által kiváltott diabéteszben a xenobiotikumok intesztinális metabolizmusa megváltozik. A CYP3A enzim esetleges kovalens down-regulációját (pl. foszforiláció) vagy a vékonybél izoenzim összetétel megváltozását feltételezzük kísérletes diabéteszben, mivel csökkent intesztinális CYP3A aktivitást mértünk változatlan össz-citokróm P450 tartalom mellett.
2. Megállapítottuk, hogy az inzulin szerepet játszhat az intesztinális CYP3A szabályozásában, minthogy korrelációt találtunk a CYP3A aktivitás csökkenés és a vércukorszint emelkedés (az inzulin szint markere) között.
3. 28 napig fennálló diabétesz a máj citokróm P450 tartalmát, a CYP2E1 illetve az FMO3 génexpresszióját és aktivitását jelentősen növeli, ugyanakkor a CYP2C11 és CYP2D2 mRNS expresszió szignifikánsan csökken. A többi izoenzim génexpressziójában és aktivitásában nem tapasztaltunk jelentős változást.
4. A kilenc napon át adagolt inzulin a citokróm P450 tartalmat, a CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1 génexpressziót növeli, míg a CYP2C11 génexpressziót kontroll szintre csökkenti. Vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy az FMO és CYP2E1 izoenzimek a legérzékenyebbek inzulinra, mivel a kezelés az aktivitásukat kontroll szint alá csökkenti.
5. A csökkent CYP2C11 génexpresszió csökkent enzimfehérje szintet eredményez kísérletes diabéteszben, mely nem nyilvánul meg a CYP2C indexreakciókban, vagyis a tolbutamid- és a mefenitoin 4'-hidroxiláció csökkenésében. Az inzulinadagolás a CYP2C11 gén- és proteinexpressziót is indukálta, de a kontroll szintet egyik esetben sem érte el.

6. Kimutattuk, a hepaticus CYP2C11 és CYP2C13 mellett, a CYP2C22 génexpressziójának csökkenését diabéteszes állapotban. Az inzulinkezelés a nemi- és növekedési hormonok által szabályozott CYP2C11 és CYP2C13 génexpressziót szignifikánsan növelte. A CYP2C22, melynek regulációja kevésbé ismert, statisztikailag nem változott inzulin hatására. A CYP2C23 nem érzékeny az inzulinszint változásra, melyet az eltérő fiziológiás szerepével (arachidonsav metabolizmus) és a valószínűleg inzulintól független szabályozásával magyarázhatunk.
7. Kísérletes diabéteszben megváltozott (növekedett) diclofenac 4'-hidroxiláz K_M és V_{max} értékeket mértünk, mely változatlan metabolikus klírenszenz eredményezett.
8. Az *in vitro* kísérleteink alapján valószínűnek tartjuk, hogy a diclofenac biohasznosulása nem változik diabéteszes állapotban. Ezt a metabolikus utak redisztribúciójával magyarázzuk.
9. *In vitro* vizsgálatainkban nem találtunk különbséget a K-48 vegyület metabolizmusában kontroll és diabéteszes állapotban. Így arra következtetünk, hogy a K-48 biotranszformációja nem változik meg diabéteszben.
10. A K-48 molekula *in vitro* mikroszómális metabolizmus vizsgálata során, kizárólag hidroxil metabolitot tudtunk azonosítani az *in silico* jelzett metabolitok közül.
11. K-48 i.m. adását követően a patkányok szérumában, likvorjában és agy homogenátumban az anyavegyületet, míg vizeletben kizárólag egy metabolitot, (feltehetőleg) epoxidot, tudtunk kimutatni.
12. Kísérleteinkkel megerősítettük a K-48 kismértékű penetrációját a vér-agy gáton keresztül.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájában megjelent cikkek:

1. Tímea Borbás, Bernadett Benkő, Imola Szabó, Balázs Dalmadi, Károly Tihanyi: Insulin in flavin-monooxygenase regulation. Flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 activities in experimental diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1-2), 2006
2. Bernadett Benkő, Huba Kalász, Krisztina Ludányi, Georg Petroianu, Kamil Kuca, Ferenc Darvas, Kornélia Tekes: *In vitro* and *in vivo* metabolism of K-48. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4):1243-7, 2007
3. Bernadett Benkő, Rudolf Laufer, Róbert Ohmacht: HPLC Analysis of microsomal metabolism of K-48. *Acta Chromatographica*, 19, 61-72, 2007

Közlés alatt lévő cikk:

Bernadett Benkő, Tímea Borbás, István Likó, Zoltán Urbányi, Károly Tihanyi: Metabolism of diclofenac in streptozotocin induced diabetes

Az értekezés témájába nem tartozó közlemények:

1. Benkő Bernadett, Zelkó Romána: Minőségi rendszerek a gyógyszerészetben I., *Gyógyszerészet*, 46: 264-271, 2002
2. Benkő Bernadett, Zelkó Romána: Minőségi rendszerek a gyógyszerészetben II. -Minőségi rendszerek áttekintése. *Gyógyszerészet*, 46: 462-469, 2002

Az értekezés témájában tartott előadások:

1. Benkő Bernadett, Borbás Tímea, Dalmadi Balázs, Szeberényi Szabolcs, Leibinger János, Tihanyi Károly: Intesztinális gyógyszermetabolizmus jelentősége és stabil citokróm P450 tartalmú mikroszóma preparálása patkány vékonybélből. *Ph.D. TUDOMÁNYOS NAPOK 2003*, 2003. április 10-11., Budapest
2. Borbás Tímea, Benkő Bernadett, Dalmadi Balázs, Szeberényi Szabolcs, Leibinger János, Beke Gyula, Tihanyi Károly:

- Koexpresszió CYP és FMO izoformák között enzimatisz szinten, humán és patkány mikroszómán vizsgálva. *Ph.D. TUDOMÁNYOS NAPOK 2003*, 2003. április 10-11., Budapest
3. Benkő Bernadett, Borbás Tímea, és Tihanyi Károly: Streptozotocinnal kiváltott diabétesz hatása az intesztinális gyógyszermetabolizmusra patkányban. *Ph.D. TUDOMÁNYOS NAPOK 2004*, 2004. április 8-9., Budapest
 4. Borbás Tímea, Benkő Bernadett és Tihanyi Károly: Streptozotocinnal kiváltott diabétesz hatása a hepatikus gyógyszermetabolizmusra patkányban. *Ph.D. TUDOMÁNYOS NAPOK 2004.*, 2004 április 8-9., Budapest
 5. Benkő Bernadett, Borbás Tímea, Tihanyi Károly: Extrahepatikus metabolizmus. “*Gyógyszer az ezredfordulón*” 2004, 2004. március 25-27, Sopron
 6. Benkő Bernadett, Borbás Tímea, Györke Imola: Streptozotocin-indukálta diabétesz hatása az intesztinális és hepatikus gyógyszermetabolizmusra patkányban. *VII. CLAUDER OTTÓ EMLÉKVERSENY*, 2004. október 14-15., Visegrád

Az értekezés témájában készült poszterek:

1. Borbás Tímea, Benkő Bernadett, Dalmadi Balázs, Györke Imola, Vastag Mónika, Tihanyi Károly: Humán hepatocita citokróm P450 izoenzim adatainak statisztikai kiértékelése. *GYÓGYSZER AZ EZREDFORDULÓN V. TOVÁBBKÉPZŐ KONFERENCIA*, 2004 március 25-27., Sopron
2. Borbás Tímea, Benkő Bernadett, Galgóczy Kornél, Dalmadi Balázs, Györke Imola, Tihanyi Károly: Streptozotocin-indukálta diabétesz hatása a hepatikus és intesztinális gyógyszermetabolizmusra patkányban. *FARMAKOKINETIKA ÉS GYÓGYSZERMETABOLIZMUS TOVÁBBKÉPZŐ SZIMPÓZIUM*, 2004. április 15-17., Mátraháza - Poszter Díj I. helyezés
3. Borbás Tímea, Benkő Bernadett, Dalmadi Balázs, Györke Imola, Vastag Mónika, Tihanyi Károly: Humán hepatocita citokróm P450 izoenzim adatainak statisztikai kiértékelése. *FARMAKOKINETIKA ÉS GYÓGYSZERMETABOLIZMUS*

TOVÁBBKÉPZŐ SZIMPÓZIUM, 2004. április 15-17.,
Mátraháza

4. Rudolf Laufer, Bernadett Benkő: Chromatographic analysis of pyridinium aldoximes and metabolites. BALATON SZIMPÓZIUM, 2007. szeptember 8-10., Siófok
5. Benkő Bernadett, Borbás Tímea, Likó István, Urbányi Zoltán, Tihanyi Károly: Experimentális diabétesz hatása a citokróm P450 katalizált gyógyszermetabolizmusra – a diclofenac metabolizmus példáján. Richter Gedeon NyRt. Kutatási Napok, 2008. október 12-14., Visegrád