

# Piridínium aldoximok szervezetbeni sorsának elemzése RP-HPLC módszerrel

Doktori (Ph.D.) tézisek

**Szegi Péter**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, C.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár, D.Sc.  
Dr. Marton Sylvia, egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kecskeméti Valéria, Professor Emerita, C.Sc.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gaszner Péter, egyetemi tanár, D.Sc.  
Dr. Perjési Pál, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest  
2012

## BEVEZETÉS

Napjainkban a szerves foszfát – organofoszfát – (OP-k) típusú vegyületek rendkívüli mérgező voltuk miatt valós veszélyt jelentenek. A WHO adatai szerint évente több millió esetben történik mérgezés az OP-k csoportjába tartozó permetező (pl. pirifosz) szerek helytelen alkalmazásával, de ezen vegyületek közé sorolhatók a rendkívül toxikus, idegmérgeknek számító, a terroristák által is alkalmazott rettegett harci gázok ( pl. sarin, tabun, VX ) is. Az OP-k közös tulajdonsága, hogy az expozíció után irreverzibilisen gátolják szervezetünk egyik kulcsfontosságú enzimét az acetilkolinészterázt (AChE), melynek aktív centrumában található szerin hidroxil csoportjához kapcsolódnak, gátolva ezáltal az enzim működését. Az AChE enzim feladata a neurotransmitterként felszabaduló acetilkolin (ACh) hidrolízise, így hatásának megszüntetése a neuromuszkuláris junkcióban, a vegetatív ganglionokban, a paraszimpatikus posztszinaptikus végkészülékben ill. a központi idegrendszer (KIR) acetilkolinerg neuronjaiban. Az AChE gátlása jellegzetes tünetegyüttest, OP-mérgezést okoz, mely során jelentős ACh felszaporodás figyelhető meg mind a perifériás mind a KIR-ben.

Jelenleg a klinikai gyakorlatban a szerves foszfát (organofoszfát és organofoszfónát) mérgezéseknél ellenszerként a piridínium aldoximok (PA) – pralidoxim (PRX), obidoxim (OBX) – használatosak, mint az AChE egyedüli reaktivátorai, a szokásos terápia (atropin, diazepam) mellett. Ugyanakkor mind a pralidoxim mind pedig az obidoxim terápiás hatékonysága messze elmarad a várttól, ezért új típusú AChE reaktivátorok szintézise, ezek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának vizsgálata világszerte nagy erővel folyik.

Cseh kutatócsoport (Kuča és mtsai) a PRX az OBX szerkezetéből kiindulva számos új ígéretes piridínium ill. biszpiridínium aldoxim (BPA) szerkezetű AChE-reaktívátort szintetizált, amelyeket a szakirodalomban K-vegyületekként tartanak számon. Az új aldoxim típusú vegyületek közös jellemzője, hogy két piridínium gyűrűt és egy vagy két oxim csoportot tartalmaznak. Számos biszpiridínium biszaldoxim és biszpiridínium monoaldoxim közül az előzetes *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján a K203 [(E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(hydroxyimino-methylpyridinium)-but-2-ene dibromide] jelű vegyület mutatkozik az egyik legígéretesebbnek. Ezek az új típusú BPA-k a piridínium gyűrűkben található két pozitív töltésű kvaterner nitrogén atom miatt szöveti pH-n nagyon hidrofilek, ezért a biológiai közegből való meghatározásukhoz és farmakokinetikai vizsgálatukhoz nélkülözhetetlen volt egy validált és optimalizált bioanalitikai módszer kidolgozása.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunkon belül nemzetközi együttműködés keretében a következő feladatokat tűztem ki célul:

1. a legígéretesebb K-vegyületek költséghatékony, általánosan használható, megfelelő érzékenységű bioanalitikai mérési módszereinek kifejlesztése
2. ezen vegyületek logP és teljes poláris felszín területe (TPSA) értékeinek a meghatározása
3. a kifejlesztett fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszer optimalizálása és validálása UV és elektrokémiai (EC) detektálás esetén
4. az optimalizált és validált RP-HPLC módszer alkalmazása a K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározására patkány és beagle kutya modellen
5. a K203 vér-agy gáton történő penetrációjának vizsgálata RP-HPLC kromatográfiás módszerrel patkány és beagle kutya modelleken

## ANYAGOK és MÓDSZEREK

A kísérletekben használt PA-kat (PRX, OBX, K27, K48, K74, K75, K203, K1000) K. Kuča munkacsoportja szintetizálta számunkra.

### *In silico* vizsgálatok

A vizsgált PA-mok kromatográfiás viselkedését és farmakokinetikai jellemzőit meghatározó logP és a TPSA paramétereiket a Pallas program segítségével (Pallas 3.8.1.1, CompuDrug International, Inc., Sedona, USA) határoztam meg.

### Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok

A kromatográfiás módszer optimalizálása, validálása valamint a K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása során JASCO (Tokió, Japán) HPLC rendszert használtunk, amely PU-1580 pumpából, DG-2080-54 gázmentesítő készülékből, AS-2057 Plus automata injektorból, UV-1575 UV-Vis és MD-1510 diódasoros detektorokból állt. Az amperometriás/elektrokémiai módszerrel végzett detektálásokhoz INTRO (ANTEC Leyden, Zoeterwoude, Hollandia) típusú detektorokat használtunk.

Az elválasztáshoz fordított fázisú Agilent Zorbax RX-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5- $\mu$ m) oszlopot használtunk, amely elé minden esetben azonos töltetű előtétoszlopot csatlakoztattunk (12,5 mm × 4,6 mm) (Kromat Kft, Budapest) az álló fázis élettartamának növelése céljából. Az álló fázis termosztálási hőmérséklete 35 °C volt. A mozgó fázis áramlási sebessége 1 ml/perc volt.

A mozgó fázis minden esetben vizes foszfát-citrát puffer:acetonitril (AcN), 10:2 arányú keveréke volt, amely a következő összetevőket tartalmazta:

50 mM dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, 50 mM citromsav-monohidrát, 0,027 mM dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav, 1-oktánszulfonsav nátriumsó (OSA) változó mennyisége.

A vizes foszfát – citrát puffer pH-ját 85 %-os foszforsavval 3,7-re állítottuk be.

A mérések során kapott kromatogramokat Borwin (JMBS, Le Fontanil, Franciaország) 1.21 és 1.5 kromatográfiás programmal regisztráltuk.

A K203 biológiai mintákból történő mennyiségi meghatározására kidolgozott optimalizált módszer validálását az FDA (Food and Drug Administration; Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation; 2001) és az EMA (European Medicines Agency – Guideline on Validation of Bioanalytical Methods; 2009) ajánlása alapján végeztük el.

A K203 *in vivo* farmakokinetikai paramétereinek meghatározása során hím Wistar patkányokat és beagle kutyákat intramuszkulárisan (i.m.) 3 és 50  $\mu\text{mol}/200\text{g}$  K203 vegyülettel kezeltük. A kezeléseket követően meghatározott mintavételi időpontokban (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 és 240 percnél) vér, liquor, szem és agy és különböző agyrészlet mintákat vettünk, amelyeket a mintaelőkészítés során 0,8M-os perklórsav segítségével fehérjementesítettünk. A minták centrifugálását (14 000g, 20 perc, 4 °C) követően a felülúszókból 50  $\mu\text{l}$ -t injektáltunk az RP-HPLC mérések során.

## EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS

### *In silico* vizsgálatok

A PA-k, köztük a K203 szöveti szintjeinek meghatározására irányuló folyadékkromatográfiás módszer fejlesztése során először a vegyületek kromatográfiás viselkedését meghatározó logP és TPSA Pallas programmal számolt értékeit határoztuk meg (1. táblázat). A PA-mok szerkezeti képletei, valamint az általunk számolt, a táblázatban látható negatív logP értékek alapján megállapítható, hogy ezek a vegyületek rendkívül hidrofíil karakterűek. A piridínium gyűrűik, a bennük található kvaterner nitrogén atomoknak köszönhetően, egy-egy töltéssel rendelkeznek, ami szöveti pH-n kettő pozitív töltésnek felel meg, így az RP-HPLC módszer segítségével történő elválasztásuk csak ionpárképző alkalmazásával lehetséges.

1. táblázat: A K-vegyületek Pallas programmal számolt TPSA és logP értékei (Szegi et al. 2010).

Név	TPSA ( $\text{\AA}^2$ )	logP
Pralidoxim	36,47	-2,56
Obidoxim	82,17	-2,87
K27	83,44	-2,84
K48	83,44	-2,79
K74	72,94	-2,36
K75	72,94	-2,46
K203	83,44	-3,04
K1000	112,65	-2,3

## Módszeroptimalizálás

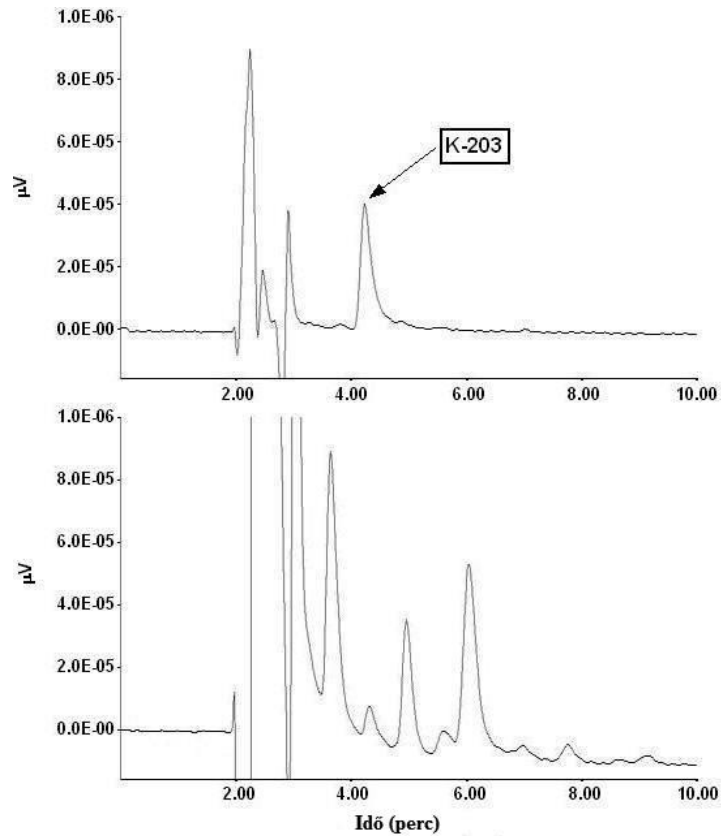
A két állandó pozitív töltésük ismeretében a módszeroptimalizálás első fázisában vizsgáltuk különböző ionpároképzők és ezek mennyiségének a hatását az egyes vegyületek retenciós idejére, amelyet a retenciós faktor ( $k'$ ) értékkel jellemeztünk.

A módszerfejlesztés során kiválasztott ionpároképző, az OSA mennyiségének a változtatása különböző mértékben hatott az általunk vizsgált PA-k migrációs tulajdonságát kifejező retenciós faktorra fordított fázis alkalmazása esetén. A két, jelenleg a klinikumban is rendelkezésre álló vegyület – PRX, OBX – esetében különbség mutatkozik a  $k'$  értékekben. Az OSA mennyiségének növelése a két piridínium gyűrűt tartalmazó OBX retencióját jelentősen, míg a PRX-ét alig befolyásolta. Az újonnan szintetizált PA-k közül a K27 és a K48 esetében a két vegyület között minimális volt a különbség ebben a tekintetben; a piridínium-gyűrűket összekötő propilén ill. butilén linker a retenciós idő változását nem befolyásolta. A K203 a K48 but-2-én linkerrel összekötött származéka. Retenciós idejének változása a K27-tel ill. K48-cal mutat analógiát. Ugyanakkor összehasonlítva a K74 és K75-tel azt látjuk, hogy adott OSA koncentráció mellett hamarabb eluálódik az oszlopról és retenciós ideje kisebb mértékben függ az adott ionpároképző koncentrációjától szemben az előbb említett két vegyülettel. A K74 ill. K75 a szimmetrikus bispiridínium biszaldoximok közé tartoznak, tehát OBX analógok, amit a  $k'$  értékük változása is jól mutat.

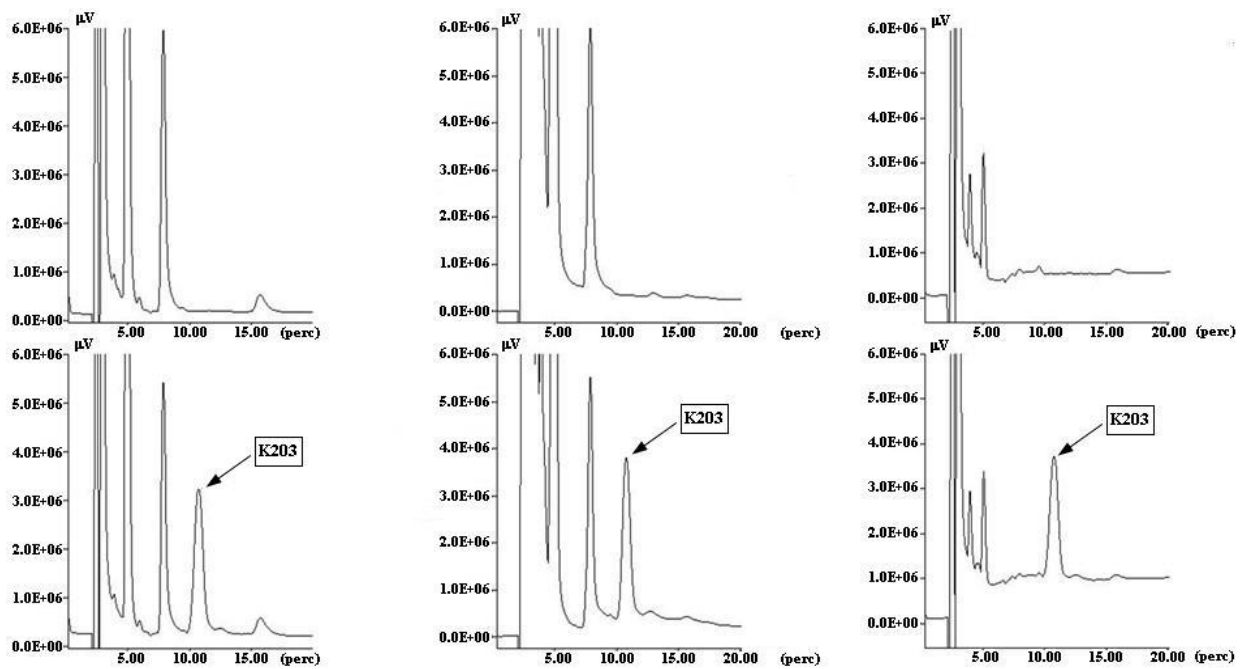
A PA-k RP-HPLC módszeroptimalizálása során az OSA mennyiségi változtatásával sikerült olyan retenciós időket elérni, ahol a zavaró háttércsúcsoktól kifogástalanul elválasztódnak a vizsgálni kívánt K-vegyületek. Az OSA-t 1 g/l koncentrációban alkalmazva a mozgó fázisban a farmakokinetikai vizsgálatokra kiválasztott K203 a biológiai minta zavaró háttércsúcsaival egy időben eluálódott az oszlopról (1. ábra). Az ionpároképző koncentrációjának az emelésével (2,5 g/l) azonban sikerült megfelelő mértékben visszatartanunk a vegyületünket az oszlopon, növelve ezáltal a retenciós idejét elválasztva így a háttércsúcsoktól (2. ábra).

Az optimalizálás további szakaszában a K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása során alkalmazott különböző dózisú kezelések szükségessé tették a jóval érzékenyebb EC detektálást az alkalmazott UV detektálás mellett. Különösen igaz volt ez a KIR hatóanyagtartalmának mennyiségi meghatározásakor, főleg kis dózisok alkalmazása esetén. Az UV detektálás során a mérések alapján az optimális eluensben a K203 abszorpciós maximuma 276 nm volt. Az ehhez az értékhez tartozó LOD ill. LOQ értékek 1,41 pmol/inj ill. 4,71 pmol/inj.

Az elektrokémiai detektálás során a K203 voltamogramjából leolvasható, optimálisnak talált +0,8 V-os cellaáram mellett a következő LOD ill. LOQ értékeket kaptuk: 0,2 pmol/inj ill. 0,68 pmol/inj.



**1. ábra:** Standard K203 oldat (felső) és kontroll patkány agy (alsó) kromatogramja 1 g/l OSA-t alkalmazva EC detektálás esetén (Szeji et al. 2010).



**2. ábra:** Kontroll (felső) ill. 1 µg/ml K203-al spikolt (alsó) szérum, agy, és CSF kromatogramjai 2,5 g/l OSA alkalmazása esetén. (EC detektálás)

## Módszer validálása

Az általunk kidolgozott és optimalizált módszer segítségével a K203  $R_t=9,811$  (UV) illetve  $R_t=10,079$  (EC) percnél eluálódott az oszlopról, amely időpontoknál nem volt látható zavaró háttércsúcs a biológiai mátrixokban. A kapott csúcs a csúcstisztasági vizsgálatok alapján homogén volt (tisztasági faktor  $> 980$ ), tehát a rendszerünk szelektíven az adott időpillanatban a K203-at mérte, zavaró komponensek nélkül. A precizitás és a torzítatlanság (93%-113%) értékei rendre a nemzetközi ajánlások által megszabott határokon belül voltak. A módszer, illetve a készülék ismételhőségének értéke [ $RSD (\%)=0,09$ ] bőven az 5%-os határon belül volt. A kalibrációs görbék az általunk vizsgált koncentrációtartományban lineárisak voltak, amelyet jól tükröznek a kapott regressziós együtthatók értékei is ( $r^2: 0,9994 - 0,9999$ ) és amelyek eleget tettek a nemzetközi ajánlásokban szereplő kritériumnak. A visszanyerési vizsgálatokban a visszanyerés határfoka 86 és 96% közötti tartományban volt. A módszer rugalmasságának és zavartűrésének a vizsgálatait azt mutatták, hogy a mozgó fázis szerves összetevőjének (AcN) a változása jóval nagyobb mértékben befolyásolta a K203 retenciós idejét, mint a mozgó fázis pH-jának a változtatása. A mérési körülmények ilyen mértékű változtatásával a vegyületünk továbbra is elválasztható maradt a biológiai mátrixok zavaró háttér csúcsaitól.

A stabilitás vizsgálatokban azt tapasztaltuk, hogy erősen savas közegben, szobahőmérsékleten a K203 erőteljes bomlásnak indult: az első 4 órában mintegy 50%-os volt a veszteség a kiindulási állapothoz képest és 24 óra múlva már csak az eredeti mennyiség 20-22%-a volt regisztrálható. Ezzel ellentétben a  $t=4^\circ\text{C}$ -on a K203 bomlási sebessége alapvetően lassabb tendenciát mutatott. A 72 órás mérési idő alatt a kiindulási koncentráció mindössze a felére csökkent (49%).

Még lassabb mértékű koncentrációcsökkenést tapasztaltunk abban az esetben, amikor a stabilitási vizsgálatokat pH=3,7 ill. neutrális közegben végeztük el. Ebben az esetben nem volt jele a hirtelen koncentrációváltozásnak és a 72 órás mérés végére a kiindulási mennyiségnek 91% ( $t=4^\circ\text{C}$ ) ill. 75%-át ( $t=25^\circ\text{C}$ ) sikerült regisztrálnunk. A többi, általam vizsgált PA a bomlás tekintetében a K203-hoz hasonló tendenciát mutatott a különböző típusú savak és hőmérsékleti körülmények között elvégzett stabilitási vizsgálatokban.



## A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása

A K203 szöveti szintjeinek meghatározása különböző állatmodellek esetében az általam validált módszer segítségével történt.

A patkányok egyszeri 250  $\mu\text{mol/kg}$  i.m. kezelését követően a K203 gyors felszívódását követően mintegy 15 perc múlva eléri a maximális koncentrációját a szérumban. Felezési ideje 45 percnél volt. Előzetes mérések alapján ezek a vegyületek a vizelettel ürülnek. A szérum koncentráció közel azonos arányban csökkent, ezért valószínűsíthető, hogy az 250  $\mu\text{mol}$  beadott anyagmennyiség a vese valamely aktív transzportere segítségével ürül, ami ennek a nagy mennyiségnek a hatására telítődik.

A K203 kinetikája a szem esetében a szérum szintjét követi. Ebben az esetben is elég hamar ( $t_{\text{max}}$ : 15 - 20 perc) eléri a maximális szintjét ( $c_{\text{max}}$ : 13  $\mu\text{g/g}$  nedves szövet), 60 perces felezési idővel.

A K203 KIR-i hatóanyagtartalmának meghatározásához liquor és agyszövet mintákat használtunk. A K203 maximális koncentrációja az agyhomogenizátum ill. a liquor esetén kissé később éri el a maximális szintjét ( $t_{\text{max}}$ : 35 - 45 perc), majd elsőrendű kinetikát mutatva távozik, míg a felezési ideje ezekben a szöveti mintákban  $t_{1/2}=120$  percnél volt. Figyelemre méltó, hogy a K203 szintje a liquor esetében kis mértékben magasabb volt, mint az agy esetében.

Az agy illetve a liquor K203 szintjét a szérumbeli szinthez viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy az idő előrehaladtával szintén változott, növekvő tendenciát mutatva.

A beagle kutyák egyszeri 250  $\mu\text{mol/kg}$  dózisú kezelését követően a K203 szintén rövid időn ( $t_{\text{max}}$ : 20 perc) belül eléri a maximumát ( $c_{\text{max}}$ :  $8,07 \pm 2,50$   $\text{mg/ml} \pm \text{SD}$ ) a szérumban és a teljes vizsgált időszak (240 perc) további részében konstans, magas koncentrációt ( $c$ : 3 – 5  $\text{mg/ml}$ ) mutatott. Hasonló kinetikát tapasztaltunk a liquor esetében is.

A 15  $\mu\text{mol/kg}$  i.m. dózis alkalmazása után a K203 szintén korán ( $t_{\text{max}}$ : 10 – 20 perc között) eléri a maximális koncentráció értékét ( $c_{\text{max}}$ :  $18,35 \pm 2,74$   $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ ) a szérumban, majd ezután 30 és 120 perces időintervallumban lineáris csökkenést mutatva ürül a szérumból.

A liquor K203 koncentrációja csak mintegy 1 – 2 óra múlva éri el a maximumát ( $c_{\text{max}}$ : 1,5 – 1,6  $\mu\text{g/ml}$ ), tehát a patkány-kezelésekhez hasonlóan ebben az esetben is későbbi liquor maximumokat kaptunk a szérumhoz viszonyítva.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az általam kifejlesztett validált RP-HPLC módszer kiválóan alkalmas egy, a tabun mérgezés esetén rendkívül hatékony, a terápiás kezelések során antidótumként is alkalmazható, újonnan kifejlesztett PA, a K203 szérumból, agyszövetből, liquorból történő gyors és nagy érzékenységgű mennyiségi meghatározására elektrokémiai és UV detektálási módok mellett. A módszer kisebb módosításokkal alkalmazható a K203-hoz hasonló szerkezetű PA-mok szerkezetbeni sorsának nyomon követésére.
2. *In silico* vizsgálatokban igazoltuk a vegyületek rendkívül hidrofil tulajdonságát, így fordított fázison történő elválasztásuk csak ionpárhépző alkalmazása mellett lehetséges.
3. Az ionpárhépző megfelelő koncentrációban történő alkalmazásával sikerült fordított fázison elválasztani ezeket az erősen hidrofil vegyületeket a háttér zavaró komponenseitől különböző biológiai mátrixok esetében. A módszer érzékenységének növelésével lehetővé vált a vizsgált PA-mok, köztük a K203 mennyiségi meghatározása a vegyületet kis koncentrációban tartalmazó biológiai minták esetén is.
4. A stabilitás vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a K203 savas közegben gyors bomlást szenved, mely már 4 °C-on is számottevő. Ez a tény különösen fontos a biológiai mátrixok mérésre való előkészítése során, a fehérjementesítésre alkalmazott savak használatakor, illetve a mérési körülmények megválasztásakor. A vizsgálandó vegyületünk bomlási folyamata kivédhető az alábbi lépések alkalmazásával:
  - a) a mintákat a minta előkészítés és a RP-HPLC-s rendszerbe történő injektálásig  $t = -80$  °C-on tároljuk
  - b) a mintaelőkészítés során a fehérjementesítést követően a felülúszó pH-ját azonnal dietilamin-foszforsav (1:2 v/v) puffer segítségével 2,0-ra állítjuk be. (1:9 arányban, 10-szeres hígításban)
  - c) a kromatográfiás mérések során a mintaadagoló belső terének, így az injektálandó mintáknak a hőmérsékletét  $t = 4$  °C-ra állítjuk be.
5. A K203 *in vivo* farmakokinetikai paramétereinek vizsgálata során használható adatokat nyertem a dózis-vérszint kapcsolatról, modellezhetők a különböző dózisok várható vérszintje patkányon és kutyán. Bizonyítottam az intramuszkuláris beadási mód hatékonyságát, mely jó felszívódást, magas vérszintet eredményez.
6. Bizonyítottam, hogy a K203 hidrofil tulajdonsága ellenére átjut a vér-agy gáton, tehát KIR-i károsodást kivédheti, csökkentheti.

## ÖSSZEFOGLALÁS

*Doktori (Ph.D.) értekezés, Készítette: Szege Péter  
Gyógyszerhatástani Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest  
Témavezető: Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, C.Sc.*

Kísérleteinkben egy, a tabun mérgezés esetén rendkívül hatékony, a terápiás kezelések során antidótumként is alkalmazható, újonnan kifejlesztett PA, a K203 farmakokinetikai paramétereit tanulmányoztuk különböző állatmodellek esetén RP-HPLC módszer segítségével. Erre a célra sikerült egy költséghatékony, optimalizált és validált kromatográfias eljárást kidolgoznunk.

Vizsgálataink során meghatároztuk a K203 és többi hasonló szerkezetű vegyület logP és TPSA értékeit, amellyel igazoltuk rendkívül hidrophil tulajdonságukat. Az RP-HPLC módszer fejlesztése során az ionpárképző megfelelő koncentrációban történő alkalmazásával sikerült az erősen hidrophil vegyületet fordított fázison elválasztani különböző biológiai minták zavaró háttércsúcsaitól.

Módszerünk validálása során meghatároztuk azokat a paramétereiket, amelyek bizonyították alkalmazhatóságát nemcsak a K203, de a többi hasonló szerkezetű PA farmakokinetikai paramétereinek kromatográfias úton történő meghatározására. A validálás részét képező stabilitás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a K203 savas környezetben erőteljesen bomlik, ezért erre különös figyelmet kell fordítani a kísérletek mintaelőkészítési fázisában valamint a mérés során is. A stabilitásból eredő problémák az általunk leírt ajánlások betartásával kiküszöbölhetőek. Stabilitási vizsgálataimmal hozzájárultam egy megfelelő lejárati idejű gyógyszerformula kidolgozásához.

Az általunk kidolgozott validált módszer egyszerűen és rutinszerűen alkalmazható a K203 szérumból, CSF-ből, valamint agyszövet homogenizátumokból történő mennyiségi meghatározására az állatkísérletek során.

Állatkísérleteinkben patkány és beagle kutya modelleken vizsgáltuk a K203 dózisfüggő kinetikáját a szervezet különböző kompartmentjeiben. Megállapítottuk, hogy a K203 nulladrendű eliminációs kinetikát követve ürül ki a szérumból, miután az i.m. kezelést követően hamar eléri a maximális koncentrációját, ami egyben igazolja az i.m. beadási mód hatékonyságát is. Igazoltuk, hogy a K203 rendkívül hidrophil tulajdonsága ellenére átjut a vér-agy gáton, tehát OP mérgezés esetén a KIR károsodását kivédheti, csökkentheti.

## Summary

*PhD thesis, Prepared by: Péter Szegi  
Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University, Budapest  
Supervisor: Kornélia Tekes, PharmD, C.Sc., dr (pharm) habil*

K203 is a newly synthesized bispyridinium monoaldehyde type antidote with potential use in organophosphate poisoning, especially in the case of tabun-poisoned subjects.

The aim of our studies was to develop a bioanalytical method for K203 using reverse-phase HPLC (RP-HPLC) technique to measure the tissue levels of K203 in blood serum, brain areas, eyes and CSF for pharmacokinetic studies in rats and beagle dogs. The method could be applicable to determine the blood brain barrier (BBB) penetration of K203 as well.

In the first series of our experiments logP and TPSA values of different K-compounds (K27, K48, K74, K75, K203, K1000) were determined using an *in silico* method. Results confirmed the very hydrophilic character of the compounds. During the method development and optimization of the RP-HPLC method effects of the quantity and quality of ion-pairing agents, methods of sample preparation, effect of temperature, chemical stability of the analyte were determined beside of the optimal wavelength (UV detection) and cell current (electrochemical (EC) detection) for the sensitive determination of K203.

Validation of the optimized bioanalytical method with both UV and EC detections was carried out according to the internationally accepted (FDA, EMA) guidelines determining selectivity, specificity, accuracy, precision, linearity of calibration curves, limit of detection, limit of quantitation, recovery, robustness, ruggedness and stability.

Using the newly developed and validated method pharmacokinetics of low and high doses of K203 were studied in rats and beagle dogs. Time dependence of the concentrations in the plasma, in the CSF, in seven brain areas (hippocampus, hypothalamus, brainstem, medulla oblongata, spinal cord, striatum, frontal cortex) were determined. It was evidenced, that K203 penetrates the BBB in therapeutically effective amount. It was found, that K203 excretion follows a zero order kinetics in case of the high dose both in rats and beagle dogs, however in case of low dose the kinetics follows a first order. It was also shown, that the brain/plasma ratio and the brain/ CSF ratio is changing with the time following the administration.

## Az értekezés témájában megjelent közlemények

**Szegi P**, Kalasz H, Laufer R, Kuca K and Tekes K. (2010) Pyridinium aldoxime analysis by HPLC: the method for studies on pharmacokinetics and stability. *Anal Bioanal Chem*, 397 (2): 579-586.

**IF.: 3.841**

Laufer R, Kalasz H, Musilek K, **Szegi P**, Darvas F, Kuca K and Tekes K. (2010) Synthesis, Antidotal Effects and HPLC Behavior of Some Novel Pyridinium Aldoximes. *Curr Org Chem*, 14 (5): 447-456.

**IF.: 2.92**

Tekes K, Szegi P, Laufer R and Kalasz H. (2010) Az acetilkolineszteráz gátlói és reaktivátorai a mindennapok gyakorlatában. *Gyógyszerészet*, 54 (4):206-211

Kalasz H, Laufer R, **Szegi P**, Kuca K, Musilek K and Tekes K. (2008) HPLC Study of the Pharmacokinetics of K-203. *Acta Chromatogr*, 20 (4): 575-584.

**IF.: 0.621**

## Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Tekes K, Hashemi F, **Szegi P**, Sotonyi P, Laufer R and Kalasz H. (2011) Prodrugs and active metabolites among antidepressive compounds. *Neuropsychopharmacol Hung*, 13 (2): 103-110.

Tekes K, **Szegi P**, Laufer R, Hantos M and Csaba G. (2011) Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain. *Int J Dev Neurosci*, 29 (2): 171-175.

**IF.: 2.418**

Petroianu G, Szoke E, Kalasz H, **Szegi P**, Laufer R, Benko B, Darvas F and Tekes K. (2009) Monitoring by HPLC of chamomile flavonoids exposed to rat liver microsomal metabolism. *Open Med Chem J*, 3: 1-7.

Szoke E, Petroianu G, Tekes K, Benko B, **Szegi P**, Laufer R and Veress G. (2009) HPLC Monitoring of the Microsomal Stability of Rutin and Quercetin. *Acta Chromatogr*, 21 (3): 399-410.

**IF.: 0.676**

Solti A, **Szegi P**, Basa B, Meszaros I and Sarvari E. (2008) Alleviation of Cd Induced Inhibition of Photosynthesis under Long-Term Cd Treatment in Poplar. *Cereal Res Commun*, 36: 239-242.

Lang F, **Szegi P**, Basa B, Solti A, Gaspar L, Tamas L, Meszaros I and Sarvari E. (2007) Time scale of the appearance of Cd effects on photosynthetically competent poplar leaves. *Photosynth Res*, 91 (2-3): 322-322.

**IF.: 2.139**

## **Idézhető kivonatok:**

Ram N, **Szegi P**, Kuča K, Hashemi F and Tekes K. (2011) Stability monitoring of some acetylcholinesterase reactivating drugs. *BMC Pharmacol*, 11 (Suppl 2): A52.

## **Az értekezés témájában tartott előadások**

**Szegi P.**, Pöstényi Z., Tasnádi B., Laufer R., Kamil K. Optimization process and HPLC behavior of some novel bispyridinium aldoximes

*PhD TUDOMÁNYOS NAPOK 2012.*, 2012. április 12-13., Budapest

## **Az értekezés témájában készült poszterek**

**Szegi P.**, Laufer R., Kalász H., Tekes K., Musilek K.

K-203 farmakokinetikai vizsgálata.

*Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV.*, Budapest, Hungary. 13-15. November 2009

Laufer R., **Szegi P.**, Tekes K., Kalász H., Kuča K.

Bispiridiniumok kromatográfiás vizsgálata.

*Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV.*, Budapest, Hungary. 13-15. November 2009

Laufer R., **Szegi P.**, Kuča K., Musilek K., Tekes K.

Piridinium-aldoximok kromatográfiás vizsgálata RP-HPLC módszerrel

*Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium*, Galyatető, Magyarország, 2010 április 14-16.

Kalász H., Tekes K., **Szegi P.**, Béni Sz., Gergely A. and Kuca K.

Automatic Set-up and Arrangement for Degradation Study of Pyridinium Aldoximes

*Pittcon 2012*, Orlando, USA, 11-15. March 2012

Tekes K., Kalász H., **Szegi P.**, Musilek K., Petroianu G.

HPLC Monitoring of Quaternary Amine Drugs

*Pittcon 2012*, Orlando, USA, 11-15. March 2012

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik doktori disszertációm elkészültéhez hozzájárultak, valamint a dolgozat alapját képező kísérletek elvégzésében támogattak, segítettek.

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tekes Kornéliának, aki szakmai irányításával támogatott, értékes tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm azt a rengeteg értékes gyakorlati és elméleti tudást, amit átadott nekem. Nemcsak szakmailag, emberileg is nagyon sokat tanultam tőle.

A folyadékkromatográfias kísérleti módszerek elsajátításában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és értékes tanácsaiért köszönettel tartozom Dr. Kalász Huba professzor úrnak.

Dr. Bagdy György professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet igazgatójának köszönöm az önzetlen anyagi és emberi segítséget, amelyek lehetővé tették a doktori munkám befejezését.

Köszönettel tartozom Dr. Magyar Kálmán professzor úrnak, programvezetőmnek a szakmai és emberformáló beszélgetésekért.

Köszönettel tartozom Dr. Török Tamás professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet volt igazgatójának, hogy kutatómunkámat az intézet berkein belül elkezdhettem.

A folyadékkromatográfias kísérletek során nyújtott szakmai segítségért és tanácsaiért köszönettel tartozom Dr. Lengyel József tudományos főmunkatársnak.

Köszönettel tartozom Dr. Laufer Rudolf, PhD hallgató kollégámnak az állatkísérletes és kromatográfias vizsgálatokban nyújtott segítségéért és nem utolsósorban a baráti támogatásért.

A kísérleti módszerek elsajátításában és elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen és kiváló technikai segítségért, valamint a családi és baráti légkör megteremtéséért köszönettel tartozom Divikiné Gúth Györgyikének és Fejes Évának.

Hálával tartozom a Gyógyszerhatástani Intézet valamennyi munkatársának barátságukért és támogatásukért.

Köszönettel tartozom az Aesculap Alapítványnak az általuk nyújtott anyagi támogatásért, amely hathatós mértékben segített a doktori disszertációm elkészítésében.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani feleségemnek, Szegei-Bíró Ildikónak, családomnak, barátaimnak kitartó türelmükért és támogatásukért a disszertációm megírásának időszakában.