

# *In vitro* módszerek alkalmazása a gyógyszerfejlesztésben

PhD. értekezés

Szakács Tünde

Témavezető:

Dr. Vereczkey László

MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia  
Kémiai Kutatóközpont, Kémiai Intézet  
Farmakobiokémiai Osztály

Budapest

2001

# **1. Tartalomjegyzék**

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	6
3. Bevezetés	7
4. Irodalmi áttekintés	9
4.1. P450 enzimek	9
4.1.1. Történeti áttekintés	9
4.1.2. P450 enzimek szerkezete, nómenklatúrája és reakciói	12
4.1.3. Enzimdefektusok és következményeik	13
4.1.4. Enzimindukció	14
4.2. Az antipirin alkalmazási területei	16
4.3. Lipid peroxidáció	17
4.4. Farmakokinetika	20
4.5. Gyógyszerkutatás és gyógyszerfejlesztés	21
5. Célkitűzés	24
6. Anyagok és módszerek	26
6.1. Felhasznált anyagok és oldatok	26
6.1.1. Törzsoldatok a tápoldat készítéséhez	27
6.1.2. A tápoldat összetétele	28
6.2. Májsejt preparálás	29
6.2.1. Patkány májsejt preparálás műtéti technikája	29
6.2.1.1. Altatás	29
6.2.1.2. A hasüreg feltárása	29
6.2.1.3. A kanülök bekötése	29
6.2.1.4. A mellüreg feltárása	30
6.2.2. Májsejt preparálás kutya és humán májból	30
6.2.3. Perfúziós módszer	33
6.2.4. A májsejtek tisztítása, kinyerése	34
6.3. Mikoszóma preparálás	34
6.4. Homogenizátum készítés	35
6.5. Szérum készítés	35
6.6. Enzimindukció vizsgálata	35

6.6.1. <i>In vivo</i> előkezelés az enzimaktivitások változásának tanulmányozására	35
6.6.2. <i>In vivo</i> előkezelés az antipirin metabolizmus tanulmányozása esetében	35
6.7. <i>In vitro</i> antipirin metabolizmus	36
6.8. Enzimaktivitás mérés	36
6.8.1. 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkiláció mérése	36
6.8.2. Aminopirin N-demetiláció mérése	37
6.9. A lipid peroxidáció mérése	38
6.10. <i>In vitro</i> vinpocetin metabolizmus	38
6.10.1. Vinpocetin inkubációja májsejtszuszpenzióban	38
6.10.2. Vinpocetin inkubációja szérumban, szervhomogenizátumokban és májsejt frakciókban	39
6.11. HPLC vizsgálatok	39
6.11.1. A HPLC vizsgálathoz használt berendezés	39
6.11.2. Az antipirin metabolitjainak vizsgálata HPLC alkalmazásával	39
6.11.3. Vinpocetin vizsgálata HPLC alkalmazásával	39
6.12. A farmakokinetikai adatok értékelése	40
6.12.1. A $Cl_{int}$ számítása	40
6.12.2. A biológiai hasznosíthatóság számítása	41
6.13. Statisztikai analízis	42
7. Eredmények és értékelésük	43
I. A gyógyszerkutatás szempontjából lényeges, xenobiotikumok által létrehozott kölcsönhatások tanulmányozása <i>in vitro</i> módszerek felhasználásával	43
7.1. Az $\alpha$ -metildopa és más xenobiotikumok hatásai <i>in vitro</i> tesztrendszerekben	43
7.1.1. Az antipirin metabolizmusának változása a xenobiotikumok hatására	43
7.1.1.1. Az előkezelések hatása az antipirin metabolitok mennyiségére	44
7.1.1.2. Az antipirin metabolizmusának gátlása troleandomicinnel	45

7.1.1.3. Az antipirin metabolizmusának gátlása cimetidinnel	45
7.1.1.4. Az antipirin metabolizmusának gátlása klorámfenikollal	46
7.1.1.5. Az $\alpha$ -metildopa hatása az antipirin metabolizmusra	48
7.1.1.6. Az antipirin metabolizmusának összefoglalása	49
7.1.2. Az $\alpha$ -metildopa és a lipid peroxidáció kapcsolata	50
7.1.2.1. A NADPH jelenlétében végzett előinkubálások hatása a CYP enzimaktivitásra	50
7.1.2.2. Az $\alpha$ -metildopa szerkezeti analógjainak vizsgálata	51
7.1.2.3. Az enzimaktivitás csökkenése és a lipid peroxidáció kapcsolata	55
7.1.2.4. Az $\alpha$ -metildopa és szerkezeti analógjainak hatása a lipid peroxidációra	57
7.1.2.5. A citokróm P450 enzimek szerepe a lipid peroxidációban	58
7.1.2.6. A vas-ion, az $\alpha$ -metildopa, valamint együttadásuk hatása a 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkilációra és a lipid peroxidációra	59
7.1.2.7. Az aszkorbinsav, a glutation valamint az $\alpha$ -metildopával történő együttadásuk hatása a 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkilációra	60
7.1.2.8. A glutation és az $\alpha$ -metildopa hatása az aminopirin N-demetilációra	61
7.1.2.9. A lipid peroxidációra vonatkozó kísérletek eredményeinek összefoglalása	62
II. <i>In vivo</i> farmakokinetikai paraméterek becslése <i>in vitro</i> nyert adatok alapján	63
7.2. A vinpocetin farmakokinetikájának vizsgálata	63
7.2.1. A vinpocetin <i>in vivo</i> farmakokinetikai vizsgálatainak eredményei	63
7.2.2. A vinpocetin metabolizmusának vizsgálata májsejtszuspenzióban	63

7.2.3. „Well stirred” modell alkalmazása a vinpocetin <i>in vivo</i> kinetikai paramétereinek becslésére a fehérjekötődés figyelembe vételével	64
7.2.4. A vinpocetin metabolizmus vizsgálata májsejt frakciókkal	68
7.2.5. A fehérjekötődés figyelembe vétele a biológiai hasznosíthatóság becslésekor	69
7.2.6. A vinpocetinre vonatkozó <i>in vivo</i> kinetikai paraméterek becslésének összefoglalása	70
8. Összefoglalás	71
9. Köszönetnyilvánítás	74
10. Irodalomjegyzék	75
11. Mellékletek	87

## 2. Rövidítések jegyzéke

AA: aszkorbinsav

AMD:  $\alpha$ -metildopa

AP: antipirin

APND: aminopirin N-demetiláció

ATZ: 3-amino-1,2,4-triazol (CYP2E1 inhibitor)

AUC: görbe alatti terület

B: elméleti maximális koncentráció

$\beta$ : eliminációs konstans

BHT: 2,[6]-di-tercier-butyl-p-krezol

Cim: cimetidín (CYP2C6, 2C11, magasabb koncentrációban még a 2B1/2 és 3A1/2 enzimeket is gátolja)

Cl: clearance (azt a vértérfogatot jelenti, amely időegység alatt teljesen megszabadul a gyógyszertől)

Cl<sub>int</sub> : intrinsic clearance

CYP: citokróm P450

D: beadott dózis

EBSS: Ca<sup>2+</sup> mentes pufferolt Earle féle sóoldat

EGTA: etilén-glikol-bis( $\beta$ -aminoetil-éter)N,N,N',N'-tetraecetsav

FCS: főtális borjú szérum

GSH: glutation

HAP: 3-hidroximetil-antipirin

HEPES: N-[2-hidroxietilén]piperazin -N'-[2-etánszulfonsav]

HMAP: 4-hidroxil-antipirin

NORAP: norantipirin

KI: klorámfenikol (CYP2B, 3A, 2C11 inhibitor)

PB: fenobarbitál

PROD: 7-pentoxil-rezorufin O-dezalkiláció

SP: spironolakton

TAO: troleandomicin (CYP3A inhibitor)

TBARS: tiobarbitursavval reagáló szubsztrátok

### **3. Bevezetés**

A modern gyógyszerfejlesztés terén egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert az *in vitro* vizsgálatok, mert az így nyert adatokból következtethetünk a gyógyszermolekula metabolizmusára, toxicitására, farmakokinetikájára és más gyógyszerekkel való interakciójára. Mivel ezen adatok ismeretében a gyógyszerfejlesztésre szánt idő és pénz lecsökkenthető, ezért ezeket a vizsgálatokat a gyógyszerfejlesztés korai fázisában végzik el.

Az *in vitro* módszerek közül munkánk során a következőket alkalmaztuk:

- a primer májsejtekkel, valamint különböző májsejt frakciókkal végzett metabolizmus és kinetikai vizsgálatok,
- az *in vivo* indukálószerrel történő előkezelés hatásának vizsgálata a metabolizmus változására, a metabolizmusban részt vevő enzimek (citokróm P450) szerepének tanulmányozására,
- specifikus gátlók alkalmazása a metabolizmusban részt vevő enzimek (citokróm P450) szerepének tisztázására.

A dolgozat első részében egy olyan, forgalomban lévő gyógyszermolekula hatását vizsgáltuk az antipirin metabolizmusára, amely azon kívül, hogy hatásos vérnyomáscsökkentő szer, irodalmi adatok szerint csökkenti egyes enzimek aktivitását, így befolyásolja az anyagok metabolizmusát. Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Kimutatható-e ennek a molekulának valamilyen citokróm P450 enzimgátló hatása?
- Van-e a molekulának szerepe az antipirin metabolizmusának gátlásában?

A második részben egy modellezési problémával foglalkoztunk. Az *in vitro* metabolizmus vizsgálatok során nyert adatokból az *in vivo* clearance értéket és az *in vivo* biológiai hasznosíthatóságot becsülhetjük. Erre általánosan használt módszer a máj intrinsic clearance értékének meghatározása. Munkánk során egy olyan vegyületet tanulmányoztunk, aminek már több fajra vonatkozóan ismertek voltak az

*in vivo* clearance és biológiai hasznosíthatóság értékei, de az *in vitro* kísérleteket még nem végezték el vele.

- Megvizsgáltuk, hogy mennyire megfelelőek az *in vitro* eltűnés-kinetikai kísérletekből származó adatok a farmakokinetikai paraméterek (clearance, biológiai hasznosíthatóság) becslésére az úgynevezett „well-stirred” modellt alkalmazva.
- Tanulmányoztuk a becslési eljárások során használt fehérjekötődési modellek hatását a farmakokinetikai paraméterek alakulására.
- Az irodalomban szereplő és a saját *in vitro* kinetikai vizsgálatainkból nyert adatok alapján a gyógyszermolekula fajok közötti biológiai hasznosíthatóságbeli különbségének okaira kerestük a magyarázatot.



## **4. Irodalmi áttekintés**

Szervezetünk metabolikus homeosztázisáért legnagyobb mértékben a máj a felelős. Az endogén és a szervezetbe került exogén vegyületek eliminációját nagyrészt a hepatociták sima felszínű endoplazmatikus retikulumának membránjában lokalizálódó citokróm P450 enzimesalád és a konjugációs enzimek végzik. A fázis I reakciókban a citokróm P450 enzimek növelik a szubsztrát vízoldhatóságát, majd az így keletkezett metabolit tovább alakulhat a konjugáció révén. A fázis I reakciók során keletkező nukleofil metabolitok konjugálását leggyakrabban a glukuronil-, szulfo- és acetiltranszferázok (fázis II enzimek) végzik, tovább növelve a molekula hidrofíl jellegét. Elektrofil metabolitok pedig a nukleofil metabolitok továbbalakulása révén jöhetnek létre. A P450 enzimek toxikológiai szempontból is igen jelentősek, hiszen a xenobiotikumok átalakulásai során keletkező egyes metabolitok toxicitása nagyobb lehet, mint az anyavegyületé.

### **4.1. P450 enzimek**

#### **4.1.1. Történeti áttekintés**

A kevert funkciójú oxidázokat az 1940-es években fedezték fel, de Klingenberg csak 1958-ban karakterizálta az enzimeket a  $P450Fe^{2+}\cdot CO$  komplexük alapján. Omura és Sato 1962-ben publikáltak értékes adatokat a rendszer felépítéséről és ők hívták először citokróm P450-nek, a korábban szén-monoxid-kötő pigmentnek nevezett enzimeket. Eastabrook (1963) és Copper (1965) fedezték fel azt, hogy a P450 enzimek a terminális oxidázok az endogén szteroidok hidroxilálásában.

1954-ben Brown és munkatársai figyeltek fel először állatokkal végzett kísérleteik alapján arra, hogy az étkezési szokásoknak jelentős szerepük van az *in vitro* metabolizmusban résztvevő enzimek aktivitásának alakulásában. A gyógyszerek metabolizmusában észlelt sebességváltozások függtek az „induktoroknak” nevezett anyagok jelenlététől. Eleinte két csoportot különböztettek meg: a policiklusos szénhidrogéneket (Conney és munkatársai, 1957) és a barbiturátokat (Remmer, 1958). Az állatok indukálószerrel való kezelése során a fehérjeszintézis sebességének növekedésére és a barbiturátok esetében az endoplazmatikus retikulum proliferációjára lettek figyelmesek.

A P450 enzimek a karcinogén anyagok, gyógyszerhatóanyagok és szteroidok metabolizálásában játszott szerepük miatt 1955 és 1958 között újra a kutatás középpontjába kerültek. Más szubsztrátok hatását, mint pl. peszticidek, zsírban oldódó vitaminok, endogén anyagok, a kutatók akkor még nem vizsgálták. Azt, hogy a P450 enzimek működéséhez a NADPH kofaktor és az oxigén is szükséges, már 1955-ben Axelrod, majd 1957-ben LaDu és munkatársai és Gillette és munkatársai is leírták. 1963-ban Copper és munkatársainak munkája igazolta, hogy emlős szervezetben sztoichiometriai összefüggés mutatható ki a mikroszómális szteroid hidroxiláló rendszer és kevert funkciójú oxidázok mennyisége között.

Még ugyanebben az évben ismertté váltak azok a spektrofotometriás módszerek, amelyek közül néhányat ma is elterjedten alkalmaznak a P450 enzim aktivitások mérésére pl. az anilin p-hidroxiláz, a codein N-demetiláz és az aminopirin N-demetiláz aktivitás mérések. Ezeket a reakciókat egy-egy, illetve az aminopirin N-demetilázánál - ma már ismert, hogy több - enzim végzi. Copper és munkatársai (1965) igazolták, hogy a mellékvese és a máj mikroszómák által katalizált hidroxilezési reakciókban a P450 enzimek a terminális oxidázok. Bebizonyították, hogy a szén-monoxid kötő mikroszómális hemoprotein végzi az oxigén aktiválását sok különböző oxidációs folyamatban. Azonkívül igen jelentősek azok az eredmények, amelyeket a P450 enzimek különböző hidroxilezési reakciókban betöltött szerepének tisztázásában értek el pl. anilin hidroxiláció, codein demetiláció.

1966-ban Imai és Sato közölte, hogy ha a részlegesen tisztított, nyúl májból izolált mikroszóma preparátumhoz különböző szubsztrátokat adtak, akkor azok spektrumában változásokat tapasztaltak. A jelenséget azzal magyarázták, hogy a metabolizálódó vegyület kölcsönhatásba lép a P450 fehérje egy speciális részével vagy részeivel. Mason és munkatársai (1965 a.) igazolták, hogy a szubsztrát kötődés hatására bekövetkező spektrális változások oka az, hogy a molekula és a kevert funkciójú oxidázok között vonzás jön létre, ami paramágneses rezonancia változáshoz vezet az enzim hem részében elhelyezkedő vas ionban.

Narasimhan és munkatársai (1965) a P450 enzimek spektrumában szintén változásokat észleltek szteroidok jelenlétében. Az eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy a spektrumbéli változásokat a P450 rendszer eredményezi azzal, hogy oxidálja a szteroid molekulát.

Remmer és munkatársai (1966) és Schenkman és munkatársai (1967) több gyógyszermolekula interakcióját vizsgálták a P450 rendszerrel. Eredményeik

megerősítették a Narasimhulu és munkatársai (1965) által tapasztaltakat. Schenkman (1967) arra lett figyelmes, hogy a nitrogén bázisú kémiai anyagok, mint pl. az anilin spektrális változásokat okoz a máj mikroszóma preparátumban. A tapasztalt változások többfélék voltak és mindig függtek a mikroszóma forrásától és az alkalmazott indukáló szerektől. Ez a jelenség több különböző szubsztrát kötő fehérje jelenlétére utal, de Schenkman még nem következtetett arra, hogy különböző P450 enzimek létezhetnek.

1968-ban közölték Copper és munkatársai a P450 enzimek által katalizált oxidációs reakciók mechanizmusát. Ez volt az első olyan publikáció, amely azt feltételezte, hogy egy ciklikus folyamat felelős a P450 enzimek által létrehozott katalíziséért.

1969-ben Conney figyelte meg azt, hogy a patkány benzpirénnel történő kezelése esetén, az állatból származó mikroszómaokban az anilin hidroxiláz aktivitás megemelkedett. Remmer és Merker (1965) fenobarbitállal előkezelt patkányok májából izolált mikroszóma frakcióban az aminopirin N-demetiláció sebességének változását tapasztalták.

Imai és Sato 1966-ban egy új P450 hemoproteint fedeztek fel, amely nemcsak spektrumában, de funkciójában is különbözött a korábban leírt formától.

Sladek és Mannering (1966) szintén több P450 enzim jelenlétére következtettek a 3-metilkolantrénnel és fenobarbitállal végzett kísérleteik során. Megfigyelték azt is, hogy az új hemoprotein, amit P<sub>1</sub>-450-nek nevezték, a 3-metil-4-monometilaminoazobenzén N-demetilációját katalizálta, míg az etilmorfínét nem.

Alvares és munkatársai 1967-ben megállapították, hogy a metilkolantrénnel történő kezelés hatására a P450 rendszer spektrumának maximuma 450 nm-ről 448 nm-re tolódott el. Ez már előrevetítette, hogy többféle P450 enzim létezik.

Egy évvel később (1968) Hildebrandt és munkatársai figyelték meg azt, hogy ha nyulat fenobarbitállal vagy 3-metilkolantrénnel kezeltek, akkor egymástól különböző spektrális tulajdonságú kevert funkciójú oxidázok szintézisének növekedése következett be.

Conney és munkatársai 1969-ben szögezték le először, hogy nemcsak egyféle P450 enzim létezik. Ezt azzal bizonyították, hogy a tesztoszteron 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, és 16 $\alpha$  pozícióban történő hidroxilezése különböző sebességgel folyt.

1975-re már négy különböző enzimet tisztán is elő tudtak állítani, és 1990-re a kutatás és a fejlesztés középpontjában a P450 enzimek tisztítása mellett aktivitásuk megőrzése állt (Ryan és Levin, 1990).

Nebert és munkatársai 1987-ben közölt cikkükben rendszerezték - a ma is használatos formában - a P450 enzimek nomenklatúráját. A munkacsoport azóta az eukarióta P450 gének és pszeudogének feltérképezésével foglalkozik, felderítették a P450 gének evolúcióját is. 1989-ben még csak 71 P450 gént és 4 pszeudogént karakterizáltak, de 1993-ra a meghatározott gének száma 221-re a pszeudogéneké 12-re emelkedett.

#### 4.1.2. P450 enzimek szerkezete, nomenklatúrája és reakciói

A 4.1.1. fejezetben áttekintettük a P450 enzimek kutatásának történetét, amelyben a korabeli szerzők által leírt kifejezéseket használtuk. Igaz, ezek a meghatározások az irodalomban ma már nem használatosak, viszont a P450 enzimek kutatásában meghatározó szerepet játszottak azok a kutatók, akik munkájáról az előző fejezetben említést tettünk.

A citokróm P450 enzimek a monooxygenázok közé tartoznak. Az oxidáció során a molekuláris oxigén egyik atomját beépítik a szerves szubsztrátokba, míg a másik O atom a kísérő reakcióban vízzé alakul.



Az élő szervezetben jelen vannak még dioxigenázok is, amelyek az általuk katalizált reakcióban az O<sub>2</sub> molekulának mindkét atomját beépítik a szubsztrátba.

A P450 enzimek általánosságban oxidációs folyamatokat katalizálnak, amelyek lehetnek pl. hidroxiláció, heteroatom oxidáció, dezalkiláció vagy epoxidáció (Guengerich, 2001).

A citokróm P450 enzimek elnevezése onnan ered, hogy a redukált állapotú citokróm P450 szénmonoxiddal 450 nm-en ad abszorpciós maximumot. A vas(II)-karbonil komplex említett spektrális sajátága eltér a többi hem-tartalmú fehérjékétől (pl. mioglobin), mert a citokróm P450 aktív helyét képviselő vas proto-porfirin IX gyűrűt a hisztidin N atomja helyett egy cisztein kén atomja tiolát kötéssel kapcsolja a fehérjéhez. A spektrális tulajdonságból származó elnevezés nem utal a

hozzávetőlegesen 350 1996-ig leírt (Estabrook, 1996) izoenzim működésbeli eltéréseire.

A citokróm P450 monooxygenáz rendszer jelen van minden növényi és állati szervezetben, valamint a prokarióta sejtekben is. Emlősökben a legnagyobb mennyiségben a májban, a tüdőben, a vékonybélben, a bőrben és az agyban fordul elő. Az eukarióta sejtben a citokróm P450 rendszer az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium membránjában fordul elő. Preparáláskor az endoplazmatikus retikulumból származó P450 enzimek az úgynevezett mikroszóma frakcióban találhatóak.

A P450 enzimeket - Nebert és munkatársai (1987) által rendszerezett nomenklátúra szerint - enzimsalád, alcsalád és gén megnevezéssel látják el. Az enzimsaládba a 33%-ban homológ génszekvencia által meghatározott fehérjék tartoznak, amit arab számokkal jelölnek (1, 2, 3, ...). Az alcsaládban már 66%-os a homológ génszekvenciák aránya, amit latin nagy betűkkel jelölnek (A, B, C, ...). Az egyes géneket pedig arab számokkal különböztetik meg (1, 2, 3, ...). Ennek megfelelően beszélhetünk CYP2B1 vagy CYP3A2 enzimekről.

#### **4.1.3. Enzimdefektusok és következményeik**

Mind a citokróm P450, mind a konjugációs enzimek működésének zavara a metabolikus homeosztázis felborulásához vezet. Ha a szervezet enzimeit képtelenek ellátni a feladataikat, könnyen kóros állapot alakulhat ki. A metabolikus funkció megszűnése a xenobiotikumok és a feleslegessé vált endogén anyagok felhalmozódását eredményezi. Genetikai okokra visszavezethető klinikai manifesztációt eddig nem bizonyítottak, korrelációt azonban már találtak néhány metabolizmusban résztvevő enzim defektusa és egyes betegségek megjelenése között, de az ok-okozati összefüggést nem találták. Ismeretes még az is, hogy a humán populációban általában néhány %-os gyakorisággal előfordul a xenobiotikumok metabolizmusában részt vevő enzimek hiánya vagy hibás megjelenése, ami csak akkor nyilvánul meg, ha olyan gyógyszer kerül a szervezetbe, amely kizárólag az adott enzimen keresztül metabolizálódik. Például a codein metabolizmusában résztvevő CYP2D6 enzim hiánya okozza a molekula hatástalanságát egyes betegekben, ahol nem képződik morfin, az aktív metabolit, és így a fájdalomcsillapító hatás is elmarad. A gyógyszermetabolizmus polimorfizmusa két fenotípusra osztja a populációt: gyors (extensive metabolizer: EM) és gyengén

metabolizálókra (poor metabolizer: PM). Ezen kívül szerepe van még az etnikai különbségeknek is, amelyeket a különböző környezeti faktorok pl. táplálkozás, dohányzás, gyógyszerfogyasztás, szennyező anyagok tovább módosíthatnak. Példaképpen említhető a CYP2D6 enzimén keresztül metabolizálódó debrisoquin. A vérnyomáscsökkentő szer hidroxilezéssel végbemenő metabolizmusa a német és a brit populációban jelentősen eltérő a debrisoquin hidroxiláz genetikai polimorfizmusa miatt. A CYP2D6 enzimet etnikai különbségek is jellemzik, pl. a kaukázusi rassznál 7-8 %-ban fordul elő az enzim hiánya, a japán populációban viszont igen ritka (1%).

#### 4.1.4. Enzimindukció

Az evolúciós fejlődés során szelekciós előnyre tettek szert azok az élőlények, melyeknek rendelkezésére állt olyan enzimmérszlet, amely alkalmazkodni tudott a folyamatosan változó kémiai környezethez. Ez az enzimmérszlet képes megvédeni az élő szervezetet a terhelő vegyi hatásoktól oly módon, hogy az adott vegyületet elimináló izoenzimek szintjét a szervezet a környezeti terheléshez hangolja, azaz az enzimek mennyiségét a szükséglet szerint csökkenti vagy növeli. A jelenség molekuláris hátterében különböző hatásmechanizmusok állnak, amelyek nagy részéről még nem pontosak az ismereteink.

A P450 enzimek különböző xenobiotikumokkal (induktor vegyületekkel) indukálhatók, ezzel mennyiségük és katalitikus aktivitásuk megnövelhető. Az indukálószer három szinten befolyásolhatja az enzimek mennyiségét és az enzimaktivitást:

1. Az mRNS szintézisének sebességét növeli.
2. Az mRNS élettidejét növeli.
3. A fehérje stabilitását növeli meg.

A P450 enzimek esetében az indukáló szerekéntől függően megkülönböztetünk "MC-típusú", "PB típusú", PCN/glukokortikoid típusú és etanol típusú indukciót.

Az "MC-típusú" induktorok közé tartoznak a 3-metilkolantrén (MC), a benzpirén és a halogénezett poliaromás szénhidrogének. A MC az Ah-receptoron keresztül indukálja a transzkripciót (Okey és munkatársai, 1979; Hannah és munkatársai, 1981). A MC a sejtbe bejutva kötődik a sejt Ah receptorához. A kialakult induktor-receptor komplex bejut a sejtmagba, ahol a P450A1 gén átíródását

stimulálja. Az indukálószer hatására létrejövő mRNS szint emelkedés a sejtben a transzkripció és a poszttranszkripció folyamatok (az mRNS sejtmagból történő transzportja, illetve az mRNS stabilitását növelő mechanizmusok) eredményeképpen valósul meg. Az indukálószer hatására végül megnövekszik többek között a CYP1A1 enzim mennyisége is.

A "PB (fenobarbitál) típusú" indukció esetében az indukálószer hatására a máj tömege, az endoplazmatikus retikulum mennyisége és így az össz-citokróm P450 koncentráció is szignifikánsan megnövekszik. Az indukció, hasonlóan az „MC-típusú” indukcióhoz, a megfelelő gének transzkripcióját és *de novo* fehérjeszintézist jelent (Adesnik és munkatársai, 1981; Atchison és Adesnik, 1983). A PB – egy másik feltevés szerint - az mRNS sejtmagból való kijutását segíti elő, ami szintén emeli a P450B mRNS szintjét (Kumar és munkatársai, 1980).

A PCN/glukokortikoid típusú indukciónál az indukálószer hatására nemcsak a transzkripció folyamatok sebessége nő meg, de jelentős szerepet kapnak a poszttranszkripció folyamatok is, amelyekben a P450 enzim, illetve maga az mRNS stabilizálódik (Hardwick és munkatársai, 1983; Schuetz és munkatársai, 1986).

Az etanol típusú indukciónál a poszt-transzkripció folyamatoknak jut a fő szerep, az induktorok nem hatnak az mRNS szintézisére, hanem az enzimet védik a degradációval szemben (Song és munkatársai, 1986; Eliasson és munkatársai, 1988). Azok a vegyületek, melyek az mRNS vagy az enzim stabilitásának növekedését okozzák és így növelik meg az enzimaktivitást nem tekinthetők valódi induktoroknak. A fenti hatásmechanizmusok mindegyikét megfigyelték már a citokróm P450 és a konjugációs enzimek esetében is.

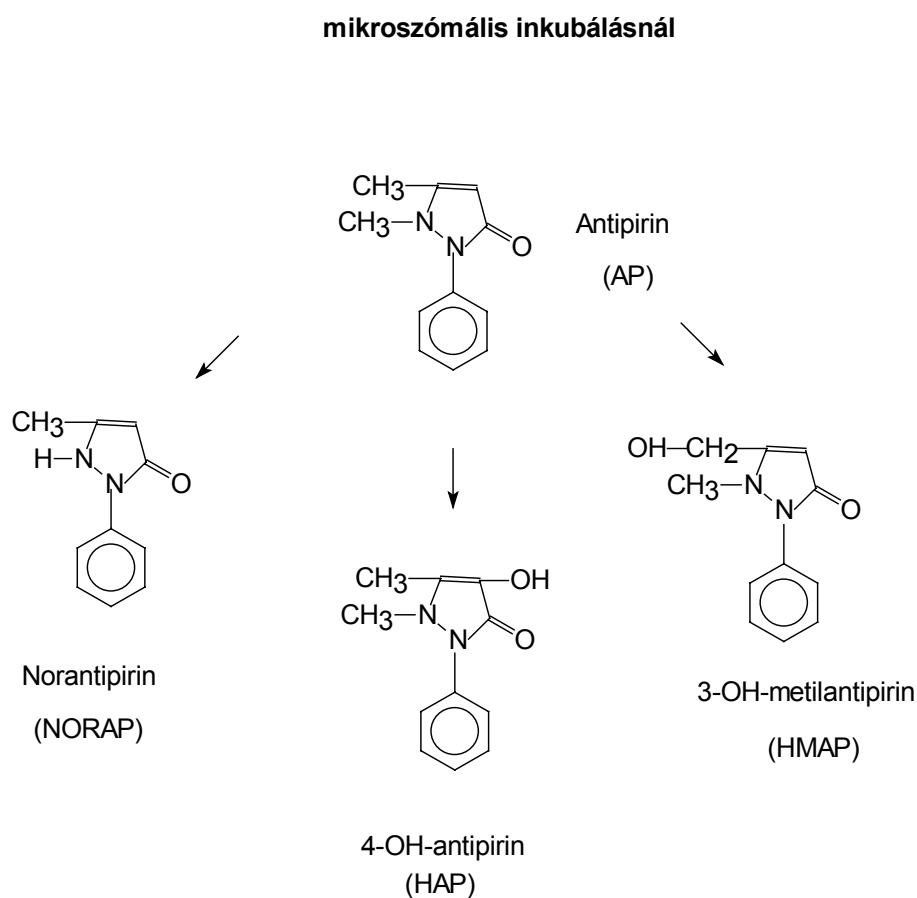
Napjainkban kiemelt jelentősége van a gyógyszerterápiában alkalmazott farmakonok okozta indukciós hatás vizsgálatának. Ennek ismeretében információt nyerhetünk az esetleg fellépő gyógyszer interakciókról, amelyeknek káros következményei is lehetnek.

Nemcsak a P450 induktorok gyógyszerként való alkalmazásakor fellépő enzimindukció okozhat problémát, hanem az enzimgátló tulajdonságú molekulák is. A specifikus P450 enzimgátlók kovalens kötés révén módosíthatják az enzim fehérje részét vagy a hem részt, esetleg mindkettőt (mechanism based inactivator), ily módon visszafordíthatatlanul csökkentik a katalitikus aktivitást.

## 4.2. Az antipirin alkalmazási területei

Az antipirint vagy fenazont Azophen néven hozták forgalomba (1. ábra). A molekulát, mint hatékony láz- és fájdalomcsillapító szert, igen elterjedten alkalmazták. A toxikus mellékhatások, mint pl. hányás, émelygés, valamint a fehérvérsejtképző rendszert károsító hatása miatt vonták ki a forgalomból. Egy humán vizsgálatsorozat azonban - melyben egészséges felnőttektől és különböző májbetegségben szenvedő paciensektől is vettek májmintát - bebizonyította, hogy az antipirin igen jó tesztanyag a máj metabolizáló funkciójának ellenőrzésére, ezért a molekulát *in vitro* enzimaktivitás mérésre továbbra is alkalmazzák. Az *in vivo* és *in vitro* metabolizmus vizsgálatok eredményeképpen ismertté váltak az antipirinből a különböző fajokban keletkező metabolitok, viszont az egyes metabolitok előállításáért felelős enzimek teljes körű azonosítása még nem történt meg. A vizsgálatok alapján a 3 fő metabolit a 3-hidroximetil-antipirin (HMAP), a norantipirin (NORAP) és a 4-hidroxiantipirin (HAP), szerkezeti képletüket az 1. ábra mutatja.

1. ábra Az antipirin és fő metabolitjai





### 4.3. Lipid peroxidáció

Lipid peroxidáció - a körülményektől függően - szinte minden kísérleti elrendezésben előfordulhat. Ezen gyökös folyamatok lehetnek enzimátikusak és nem enzimátikusak. Az enzimátikus folyamatok NADPH-függők és a láncreakció elindulásához elegendő a vegyszerekben található vas szennyezés.

Kísérleteink során lettünk figyelmesek a lipid peroxidációra. Mivel a vizsgálatok során olyan jelenségeket tapasztaltunk, amelyekért valószínűleg ez a folyamat a felelős, tanulmányozása elkerülhetetlenné vált.

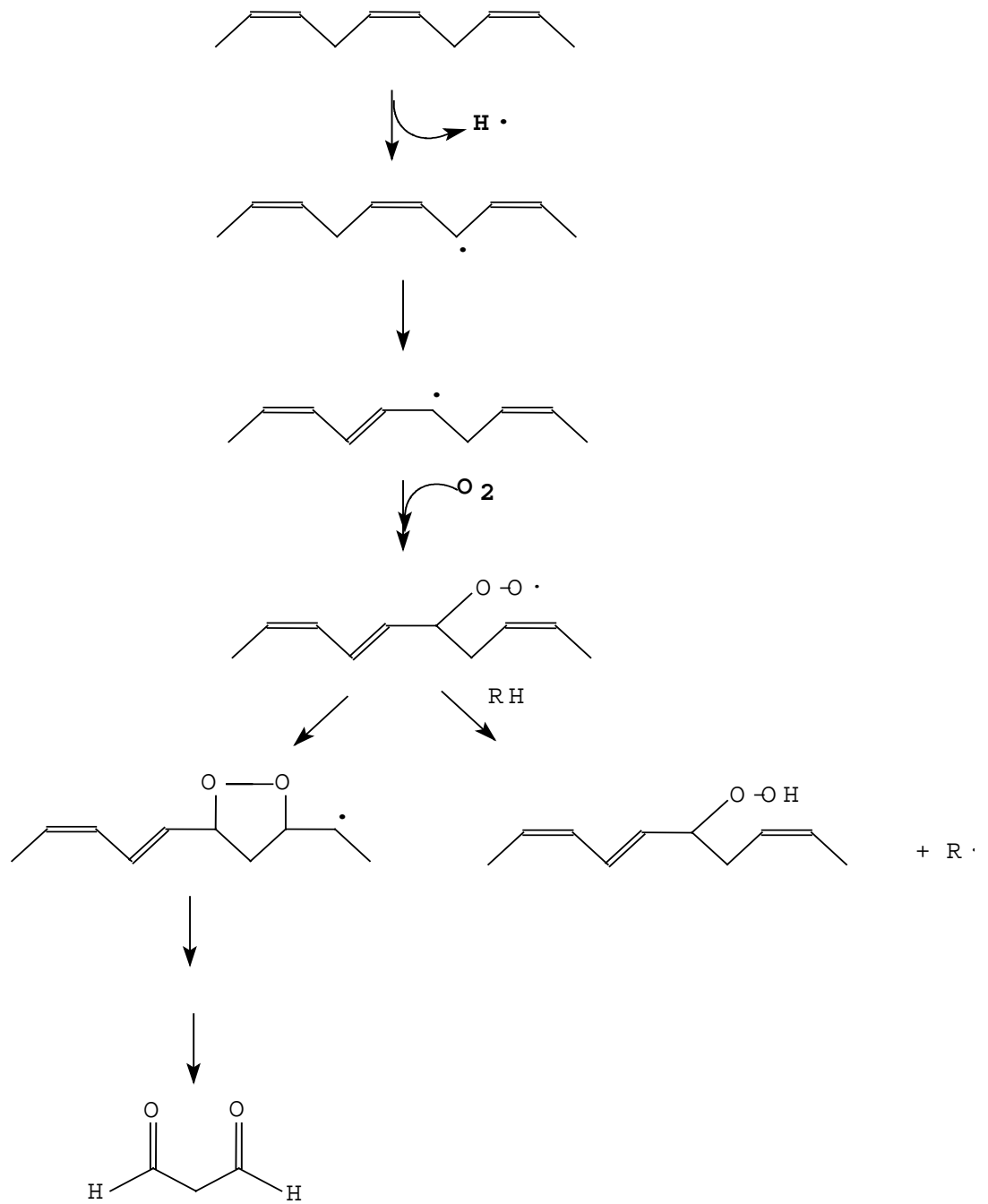
A lipid peroxidáció mechanizmusát az irodalomban megjelent cikkek alapján a következőképpen lehet összefoglalni (2. ábra):

A lipid peroxidáció kezdeti szakaszában a telítetlen zsírsav egy H atomot vesz el, ezzel lipid gyök jön létre. A kettős kötések átrendeződésével konjugált dién szerkezet alakul ki. Az oxigén ezzel a molekulával lép reakcióba és ennek eredményeképpen lipid peroxid gyök keletkezik, amely két úton stabilizálódhat. Az egyik mód, hogy a lipid peroxid gyök egy hidrogént von el egy másik lipid molekulából és így lipid hidroperoxiddá alakul, míg a másik molekula lipid gyökké. A másik út a stabilizálódásra a gyűrűzáródás, amely során lipid endoperoxid gyök jön létre. Ez az endoperoxid gyök több lépésen keresztül malondialdehiddé alakul, ami a tiobarbitursavval reagáló szubsztrátok (TBARS) jelentős részét teszi ki.

Az iniciáló lépéshez szükséges a vas ionon kívül a szuperoxid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) vagy a hidroxil gyök ( $OH^{\cdot}$ ) jelenléte. A folyamat befejező lépéseiben pedig a reakcióelegyben jelenlévő lipid gyökök illetve lipid hidroperoxid gyökök reakciója játszódik le, aminek eredményeképpen nem gyökös termékek keletkeznek.

Ez a láncreakció szerepet játszik abban, hogy az *in vitro* kísérletekben az enzimek aktivitása megváltozhat, ami azt eredményezi, hogy a modellrendszer nem megfelelően működik. Ennek a jelenségnek nemcsak az *in vitro* vizsgálatoknál van jelentősége, hanem az élő szervezetekben is, ahol a jelenlévő szabad gyökök többféle betegség kialakulásában is közrejátszhatnak, mint pl. atherosclerosis, rák.

## 2. ábra A lipid peroxidáció folyamata

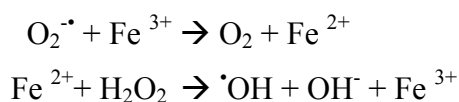


Munkánk során a NADPH-függő, enzimatis lipid peroxidációt tanulmányoztuk, így néhány ezzel kapcsolatos irodalmat ismertetünk.

Kamataki és Kitagawa már 1973-ban felismerte, hogy a lipid peroxidáció és a patkány máj mikroszómában lévő gyógyszermetabolizáló enzimek aktivitása között összefüggés van. A vizsgált rendszerbe inkubálás alatt vas iont juttatva lipid peroxidációt hoztak létre, ami az etil-morfin N-demetiláció sebességének csökkenését okozta.

Fong és munkatársai szerint (1973) a folyamat a vas katalizálta Haber-Weiss reakció szerint megy végbe, amelyben a lipid peroxidáció függ a vas ion, a szuperoxid anion, a hidrogén peroxid és a hidroxil gyök jelenlététől. A szerzők iniciáló ágensnek a hidroxil gyököt tartották.

A vas katalizálta Haber-Weiss reakció a következő:



A NADPH-tól függő lipid peroxidáció egy másik lehetséges mechanizmusát Svigen és munkatársai írták le 1979-ben. A szerzők szerint a folyamat iniciáló lépését a perferril ion katalizálja, ami lipid hidroperoxid képződést eredményez. A második lépésben a lipid hidroperoxidok vas ion katalizálta lebomlása következik be, ami reaktív köztitermékeket hoz létre és végső soron a TBARS megjelenését vonja maga után.

A folyamat mechanizmusa teljes egészében még ma sem ismert, de reaktív oxigén fészeségek és nem-hem vas mindenképpen szükséges feltételei a lipid peroxidáció iniciálásának (Ekström és Ingelman-Sundberg, 1989, Minotti, 1992; Afanas'ev és munkatársai, 1993).

Hanna és munkatársai 1994-ben vizsgálták az MA-631-es jelű komplex növényi keveréket, ami gátolta a human low-density lipoprotein (LDL) oxidációját. Az LDL oxidációjának jelentős szerepe van az atherosclerosis kialakulásában. Kísérleteikben *in vivo* és *in vitro* is tanulmányozták a vegyület hatékonyságát. Azt találták, hogy patkány máj mikroszómában mind az alkoholos, mind a vizes MA-631-es kivonat koncentrációtól függően gátolta az enzimatis és a nem enzimatis lipid

peroxidációt is. Az eredmények arra utaltak, hogy a kivonat hasznos lehet a szabad gyökök okozta megbetegedések megelőzésében.

Ubeda és munkatársai 1995-ben munkájuk során arra a felismerésre jutottak, hogy a vizsgált flavonoidok képesek mind az enzimátikus mind a nem enzimátikus lipid peroxidációt gátolni patkány máj mikroszómában. Ha inkubáció során ezen flavonoidokat is tartalmazta a reakcióelegy, akkor azok megvédték a vizsgált P450 enzimeket a degradációtól. A vizsgált enzimreakciók az aminopirin N-demetiláció és az anilin hidroxiláció volt.

Yosiko és Masanori (1995) igazolták, hogy patkány máj mikroszómában nemcsak a vas ion felelős a lipid peroxidációért, hanem a NADPH citokróm P450 reduktáz is szerepet játszik a folyamatban.

Scholtz és munkatársai (1997) a glutation (GSH) lipid peroxidációra gyakorolt hatását vizsgálták patkány máj mikroszómában és arra a felfedezésre jutottak, hogy a GSH és a glutation diszulfid gátolják a NADPH-függő lipid peroxidációt, míg a nem enzimátikus folyamatra nincs hatásuk. A jelenséget azzal magyarázták, hogy a GSH gátolja a NADPH citokróm P450 reduktázt.

#### 4.4. Farmakokinetika

A farmakokinetika az élő szervezetbe jutott vagy juttatott farmakon koncentráció változásának időbeli lefolyását tanulmányozza. Vizsgálja a farmakon felszívódását, kiürülését, megoszlását és fehérjékhez való kötődését. Gyakran a metabolizmus vizsgálatokat is a farmakokinetika körében tárgyalják, hiszen egy molekula metabolizmusának ismerete nagymértékben elősegíti a farmakokinetikai folyamatok megértését.

A gyógyszerfejlesztés során a farmakokinetikai vizsgálatok fontos és értékes információt szolgáltatnak a molekuláról, az *in vitro* adatokból *in vivo* paramétereket becsülhetünk, így következtethetünk a gyógyszer *in vivo* viselkedésére. Ehhez a következőket kell figyelembe venni:

- Mivel humán toxikológiai vizsgálatokat morális okokból nem lehet végezni, tesztállatok alkalmaznak a toxicitás mértékének megállapítására. Ezekből az eredményekből következtetni lehet az emberre gyakorolt hatásra. A toxikus dózis megállapítása a helyes dózis kialakításában játszik fontos szerepet. Azért, hogy

biztosak lehessünk az állatkísérletek alapján becsült érték jóságában, megerősítésképpen szükséges a metabolizmus vizsgálatokat azokon a fajokon is elvégezni, amelyeken a toxikológiai hatást tanulmányozták. Ha a metabolizmus hasonló a tesztfajok és az ember esetében, akkor tudunk a toxikológiai eredményekből jó következtetéseket levonni az emberre vonatkoztatva. Ember esetében májsejtek, S9 frakció és mikroszóma alkalmazásával tudunk a metabolizmusról információt szerezni, és ezeket az eredményeket lehet az állatkísérletek adataival összevetni.

- Általánosságban véve jó összefüggés található a plazma (vér, szérum) koncentráció és a farmakológiai (toxikológiai) hatás között.
- A terápiás koncentrációban végzett *in vitro* vizsgálatok információt adnak az elimináció kinetikájáról, annak rendűségéről.

#### 4.5. Gyógyszerkutatás és gyógyszerfejlesztés

A modern gyógyszerkutatás- és fejlesztés célja az, hogy minél hatékonyabb gyógyszerek kerüljenek forgalomba.

A gyógyszerkutatás feladata a kívánt receptorokra specifikusan ható molekula megkeresése biokémiai és farmakológiai módszerekkel.

A gyógyszerfejlesztés feladata a kutatás során talált vegyületek biztonságos alkalmazhatóságának bizonyítása, a megfelelő kisserelési forma kidolgozása kémiai analitikai, biztonsági és klinikofarmakológiai módszerekkel.

Egy gyógyszer forgalomba kerüléséhez bizonyítani kell, hogy a gyógyszer:

- megfelelő minőségű
- hatékony
- alkalmazása biztonságos.

A megfelelő minőséget kémiai analízissel, míg a hatékonyságot farmakológiai, klinikofarmakológiai és biokémiai vizsgálatokkal bizonyítják.

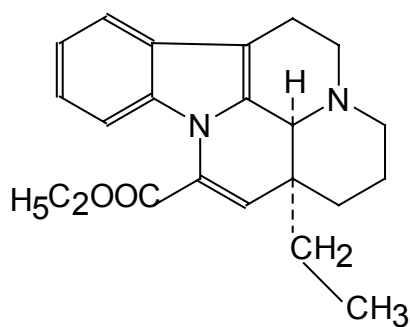
A preklinikai vizsgálatok nagy segítséget adnak ahhoz, hogy a gyógyszermolekula hatásosságáról és metabolizmusáról információt szerezhessünk. Ehhez nemcsak a megfelelő állatmodellek kellene, hanem azok a technikák is, amelyekkel ezek a vizsgálatok elvégezhetőek. Valamint szükségesek még azok a kiértékelő rendszerek/modellek, amelyek segítségével az eredményekből értékelhető következtetést lehet levonni.

Munkánkhoz az általánosan elterjedt becslési módszereken kívül még Obach és munkatársainak 1997-ben megjelent munkáját is felhasználtuk. Dolgozatunkban több általánosan használt és újonnan leírt kinetikai és becslési módszert hasonlítottak össze. Az összehasonlítás alapjául a Pfizer gyógyszergyár 1981-1994 között fejlesztés alatt álló molekulái szolgáltak, amelyekkel már a fázis 1 klinikai vizsgálatokat is elvégezték. Becsléseikben a humán intravénás és orális vizsgálatok adatait is felhasználták. Számos gyógyszerhatóanyag esetén, többféle fehérjekötődési modellt is figyelembe vettek. Megállapították, hogy a humán *in vitro* eredményekből az *in vivo* clearance érték becslés szempontjából az „allometric scaling” modell a legjobb abban az esetben, ha nem számoltak a molekulák fehérjekötődésével. Kihangsúlyozták, hogy az *in vitro* vizsgálatok jelentősége egyre nagyobb lesz. Minél több humán intravénás és orális farmakokinetikai adat áll a rendelkezésre, annál pontosabban becsülhető a jelenleg még fejlesztés alatt álló molekulák *in vivo* viselkedése és biológiai hasznosíthatósága.

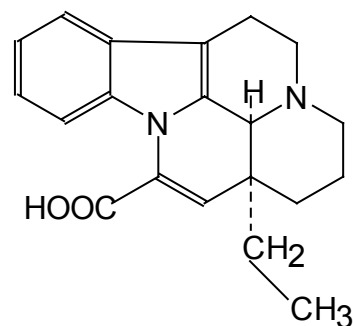
Ezek az adatok eldönthetik a molekula további sorsát, így nemcsak időt, hanem felesleges anyagi beruházásokat is megtakaríthat az a gyógyszerfejlesztő cég, amely időben elvégzi vagy elvégezteti az *in vitro* farmakokinetikai vizsgálatokat.

Az *in vitro* farmakokinetikai vizsgálatokat a vinpocetin (apovinkaminsav etil-észter, Cavinton®) vegyülettel végeztük el. A vegyület a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt terméke, és az elmúlt több mint 20 évben széles körben alkalmazták cerebrovascularis betegségek kezelésére. A vinpocetin főbb alkalmazási területei: belgyógyászat, neuropszichiátria, szemészet, fül-orr-gégészet és gerontológia (Szobor és Klein 1976, Ribáry és munkatársai. 1976, Hadjiev és Yancheva 1976). A molekula *in vivo* kinetikáját már több fajban több szerző is vizsgálta (Vereczkey és munkatársai 1979 a, b, Grandt és munkatársai 1989, Yao és munkatársai 1994, Szeleczy és Vereczkey 1986). Az észter molekula (3. ábra) farmakokinetikája nagyon különbözik a vizsgált fajokban. A patkány az egyetlen faj, amelyben az észterhidrolízis a plazmában is végbemegy.

3. ábra A vinpocetin és az apovinkaminsav szerkezeti képlete



Vinpocetin



Apovinkamin sav

Annak ellenére, hogy a teljes test clearance érték minden fajban magas, a biológiai hasznosíthatóságban mégis nagy különbségek tapasztalhatók. A biológiai hasznosíthatóság patkány esetében  $54,54 \pm 3,77\%$  (Yao és munkatársai, 1994), kutya esetében  $21,5 \pm 19,3\%$  (Polgár és Vereczkey, 1984) ember esetében pedig  $6,2 \pm 1,9\%$  (Miskolczi és munkatársai, 1990). A vizsgálatok alapján meghatározták a metabolizmus során keletkezett vegyületek szerkezetét, a különböző kinetikai paramétereket pl. felezési idő, megoszlási tér, eliminációs sebesség, *in vivo* biológiai hasznosíthatóság. Azt találták, hogy a vinpocetin fő metabolitja minden vizsgált fajban az apovinkaminsav és kisebb mennyiségben hidroxivinpocetin és dihidroxivinpocetinsav-glicin amid is keletkezik (minor metabolitok).

## 5. Célkitűzés

Az *in vitro* módszerek alkalmazása a gyógyszerkutatásban és fejlesztésben egyre nagyobb jelentőségre tesz szert. A P450 enzimek kutatása már az 1940-es években elkezdődött és a szervezetbe kerülő idegen és endogén anyagok eltávolításában játszott szerepükre is rövid időn belül fény derült. Ezért - és különösen ember esetében, ahol nincs lehetőség erkölcsi okokból a toxikológiai vizsgálatok elvégzésére - nő meg az *in vitro* primer májsejtkultúrával és májsejt frakcióval (citoszol, mikroszóma, S9 frakció) végzett vizsgálatok jelentősége.

A dolgozatban egyrészt a gyógyszerkutatás szempontjából lényeges, xenobiotikumok által létrehozott kölcsönhatásokat tanulmányoztuk *in vitro* módszerek felhasználásával (I.). Másrészt az *in vitro* adatokból becsült *in vivo* farmakokinetikai paraméterek és az irodalomban található *in vivo* mért adatok korrelációját vizsgáltuk (II.).

I.) Az  $\alpha$ -metildopa egy jelenleg is forgalomban lévő vérnyomáscsökkentő szer. Tanulmányozásakor, az irodalomban megjelent két megfigyelést vettünk alapul. Az egyik Szabó és munkatársai (1995) közleménye, akik - az antipirin *in vivo* felezési idejének változását vizsgálva induktorok és  $\alpha$ -metildopa jelenlétében - azt tapasztalták, hogy ha patkányt  $\alpha$ -metildopával és spironolaktonnal kombinálva kezelték elő, akkor a spironolakton által egyedül okozott felezési idő csökkenés nem következett be. Ugyanezt a jelenséget a fenobarbitál induktor és az  $\alpha$ -metildopa együttadása esetében nem tapasztalták. A felezési idő megváltozásának oka a metabolizmus sebességének változása lehet, ezért kezdtük tanulmányozni az antipirin *in vitro* metabolizmusát.

Munkánk során kezeletlen, fenobarbitállal, illetve spironolaktonnal *in vivo* előkezelt állatokból származó mikroszóma frakciók felhasználásával kerestük a választ arra a kérdésre, hogy az induktorok és az  $\alpha$ -metildopa hogyan befolyásolják az antipirin metabolizmusát. Kísérleteinkben szelektív citokróm P450 enzimgátlókat is alkalmazva vizsgáltuk az antipirin 3 fő metabolitjának képződési sebességét. Tanulmányoztuk, hogy az  $\alpha$ -metildopának van-e citokróm P450 enzim gátló, az antipirin metabolizmust befolyásoló hatása.



A másik  $\alpha$ -metildopával kapcsolatos irodalmi megfigyelés (Dybing és munkatársai, 1976), amit munkánk során figyelembe vettünk az, hogy a molekula NADPH jelenlétében kovalensen képes kötődni a mikroszómális fehérjékhez. Feltételezhető, hogy ezzel befolyásolja más anyagok metabolizmusának sebességét. Ennek a lehetőségnek a tanulmányozására két mikroszómális reakciót választottunk: az aminopirin N-demetilációt és a 7-pentoxirezorufin O-dezalkilációt.

II.) Az *in vitro* metabolizmus vizsgálatok mellett a farmakokinetikai vizsgálatok is egyre jelentősebb szerepet töltenek be a gyógyszerfejlesztés folyamatában. Az *in vitro* vizsgálatok eredményeiből *in vivo* kinetikai paramétereket becsülhetünk. Ezek a paraméterek utalnak arra, hogy a hatóanyag miként viselkedik az élő szervezetben, és milyen mértékű a biológiai hasznosíthatósága.

A kísérleteinkhez egy olyan forgalomban lévő gyógyszermolekulát választottunk, aminek *in vivo* farmakokinetikai adatai már ismertek voltak, de az *in vitro* vizsgálatokat előttünk még nem végezték el. A célunk az volt, hogy ellenőrizzük, hogy a jelenleg alkalmazott becslési módszerekkel megfelelő információt tudunk-e adni a vizsgált molekula *in vivo* viselkedéséről. Munkánk során primer szuszpenziós májsejt kultúrát használva tanulmányoztuk a vinpocetin (Cavinton®) *in vitro* eltűnési kinetikáját, és a „well stirred” farmakokinetikai modellt alkalmaztuk a molekula *in vivo* clearance értékének és biológiai hasznosíthatóságának meghatározására (becslésére).

A vinpocetin már ismert, különböző fajokban mért *in vivo* farmakokinetikai paraméterei egy másik kérdést is felvetettek. Az összes vizsgált fajban (patkány, kutya és ember) a teljes test clearance nagy értéket mutatott, vagyis kb. azonos volt a máj vérátáramlási sebességével. Ennek ellenére a biológiai hasznosíthatóság értékekben nagy különbségeket tapasztaltak (patkány: kb. 50%, kutya: kb. 20%, ember: kb. 6%). Ezt az ellentmondást szeretnénk volna feloldani azzal, hogy *in vitro* kísérletekkel felderítjük a fent említett jelenség hátterét.

## **6. Anyagok és módszerek**

### **6.1. Felhasznált anyagok és oldatok**

A Sigma Chemical Company (St. Louis, Montana) cég termékeiből a következő vegyszert használtuk fel: 7-pentoxi-rezorufin, aminopirin,  $\alpha$ -metildopa, L-3,4-dihydroxifenilalanin (L-dopa), 3-hidroxitiramin hidroklorid (Dopamin), 2,[6]-di-tercier-butyl-p-krezol (BHT), tiobarbitursav, troleandomicin, klorámfenikol, fenobarbitál, cimetidin, kollagenáz, nutrient mixture F-12 (HAM), Williams' medium E, tripán kék oldat.

A 3-metoxitiramin hidroklorid (3-O-metildopamin) és az etilén glikol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA) a Fluka Chemie GmbH (Buchs, Svájc) cégtől származtak.

Triklórecetsavat a Carlo Erba Reagenti-től (Rodano, Olaszország) rendeltünk. A malonaldehid bis (dimetil acetál) a Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Németország) terméke. NADPH-t a Reanal-tól (Budapest, Magyarország) rendeltünk. A vinpocetin a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT (Budapest, Magyarország) terméke. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, a D-glükóz 6-foszfát, a 3-amino-1,2,4-triazol, valamint az oldószerek a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől származtak.

A kísérletekben felhasznált oldatokat a következő törzsoldatokat hígításával állítottuk elő:

#### **10x tömény perfúziós sóoldat EBSS-hez**

34 g NaCl  
2 g KCl  
500 ml ioncserélt víz

#### **100x tömény foszfát-oldat EBSS-hez**

2,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
200 ml ioncserélt víz

#### **25 mM EGTA/0.1M NaOH-oldatban**

950 mg EGTA  
100 ml 0,1M NaOH

#### **10xtömény szuszpendáló oldat**

5,96 g HEPES  
20,75 g NaCl  
1,3 g KCl  
250 ml ioncserélt víz

**EBSS-oldat**

50 ml perfúziós sóoldat  
 5 ml 100x tömény foszfát-oldat  
 14,67 ml 7,5%-os NaHCO<sub>3</sub>-oldat  
 1,85 ml 1,5 M glukóz-oldat  
 500 ml-re feltölteni ioncserélt vízzel  
 pH 7,4 1 M-os sósav-oldattal beállítani

**Nash reagens**

30,83 g NH<sub>4</sub>-acetát  
 600 µl jégecet  
 400 µl acetyl-aceton  
 100 ml-re kiegészíteni  
 ioncserélt vízzel

**6.1.1. Törzsolatok a tápoldat készítéséhez****1000x tömény dexametazon oldat**

0,039 mg dexametazon  
 1 ml DMSO

**1000x tömény inzulin oldat**

3 mg inzulin  
 1 ml 0,01 M sósav oldat  
 szűrni: 0,22 µm-es Durapore szűrővel

**100x tömény glukóz-oldat**

54 g glukóz  
 200 ml ioncserélt víz

**100x tömény kalcium-klorid-oldat**

3,68 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 100 ml ioncserélt víz

**7.5%-os nátrium-hidrogénkarbonát-oldat**

75 g NaHCO<sub>3</sub>  
 1 l ioncserélt víz

**100x tömény amfotericin B oldat**

100 mg Amfotericin B  
 400 ml ioncserélt víz  
 A-9528 Sigma 45%

**gentamicin injekció**

40 mg/ml-es kiserelés  
 1,25 ml/l-es végkoncentráció

**100x tömény glutamin**

730 mg glutamin  
 25 ml ioncserélt víz

**10000x tömény nátrium-szelenát**

0,259 mg nátrium-szelenát  
 5 ml ioncserélt víz

### 6.1.2. A tápoldat összetétele

#### **500 ml tápoldat összetétele (W-H tápoldat) :**

2,71 g Williams' medium E 235 ml ioncserélt vízben

4,05 g F-12 [HAM] 235 ml ioncserélt vízben

50 µl 10000x tömény nátrium-szelenát

14,7 ml 7,5 %-os NaHCO<sub>3</sub>

pH-t 7,2-re állítani 1 M-os NaOH-dal, utána szűrni.

#### **Mix I:**

#### **Végkoncentráció**

100 µl Etanol-amin/5 ml ioncserélt víz	66,8 µM
35,7 mg Linolénsav-albumin/10 ml ioncserélt víz	0,04 µM
5 mg Glukagon/5 ml ioncserélt víz+150 µl 1N NaOH	57,4 nM

#### **Piruvát**

1,1 g Na-piruvát

25 ml ioncserélt víz

#### **Kiegészítők:**

#### **Végkoncentrációk a tápoldatban**

2,5 ml	200x tömény Amfotericin B	2,5 mg/l
6,25 µl	Gentamicin	50 mg/l
2,3 ml	Glukóz	6,9 mM
500 µl	Inzulin	0,6 µg/ml
500 µl	Dexametazon	100 nM
500 µl	Piruvát	0,4 mM
500 µl	Mix I	
50 ml	FCS	10%
300 µl	Glukagon	57,4 µM

## **6.2. Májsejt preparálás**

### **6.2.1. A patkány májsejt preparálás műtéti technikája**

A májsejteket 150-250 g súlyú hím Wistar patkányokból izoláltuk. A sejtek életképessége minden esetben 90% felett volt. A sejteket steril körülmények között nedvesített légterű CO<sub>2</sub> termosztátban (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) tartottuk. A lehetőségekhez képest a műtétet is sterilen végeztük.

#### **6.2.1.1. Altatás**

Mivel a cél életképes, fiziológiás struktúrájukat megőrző hepatociták izolálása volt, ezért az altatás során nem használhattunk olyan hatékonyabb, de májkárosító altatószereket, mint pl. halotán, kloroform, valamint nem alkalmazhattunk indukáló hatású farmakonokat sem, mint pl. fenobarbitál. Az altatás során az állatot először egy zárt légterű edénybe tettük, amelybe étert jutattunk. A légtérből az éter gőzöket az állat belélegezte, kb. két perc alatt beállt a vérben az elalváshoz szükséges éter koncentráció, melynek állandóságát a műtét alatt is folyamatosan fenntartottuk. A műtétet megelőzően az állatot rögzítettük a műtőasztalon.

#### **6.2.1.2. A hasüreg feltárása**

A has és a mellkas tájékáról a kültakarót téglalap formájában eltávolítottuk. A szemérem csonttól kb. 2 ujjnyira bemetsztük a hashártyát és a fehér vonal mentén a mellüregig felvagtuk vigyázva, hogy ne sértsük meg a rekeszizomot, valamint a hashártyára felfekvő májlebenyt. Középtájon a rekeszizomtól kb. 1 ujjnyira mindkét oldal irányába elvagtuk a hashártyát és pean segítségével rögzítettük.

#### **6.2.1.3. Kanülök bekötése**

Két érbe, a véna cava superior-ba és a véna portae hepatis-ba a következő módon helyeztünk kanült (4. ábra): a hashártya megnyitása után a v. portae-t és a v. cava inferior-t kiproparáltuk és ligatúrát helyeztünk a vénák köré. Először a v. cava inf.-ra helyeztünk lazán egy ligatúrát a veseleágazás felett. A második ligatúra a v. portae-ra került a májba történő beszájadzás és a portális érről leágazó pankretikus-duodenális ér közé. A laza ligatúrák felhelyezése után a ligatúra alatt kb. 45 fokos szögben bevágtuk a v. portae-t és behelyeztük a kanült, amelyhez csatlakoztattuk a perfúziós pumpa nyomó ágát. A kanült ligatúra segítségével erősen rögzítettük. A

nyomó ág bekötésével a keringési rendszerben a folyadékmennyiség növekedése nyomás növekedést okozott, ezért átvágtuk a v. cava inf.-t a ráhelyezett ligatúra alatt, hogy a nyomás csökkenjen.

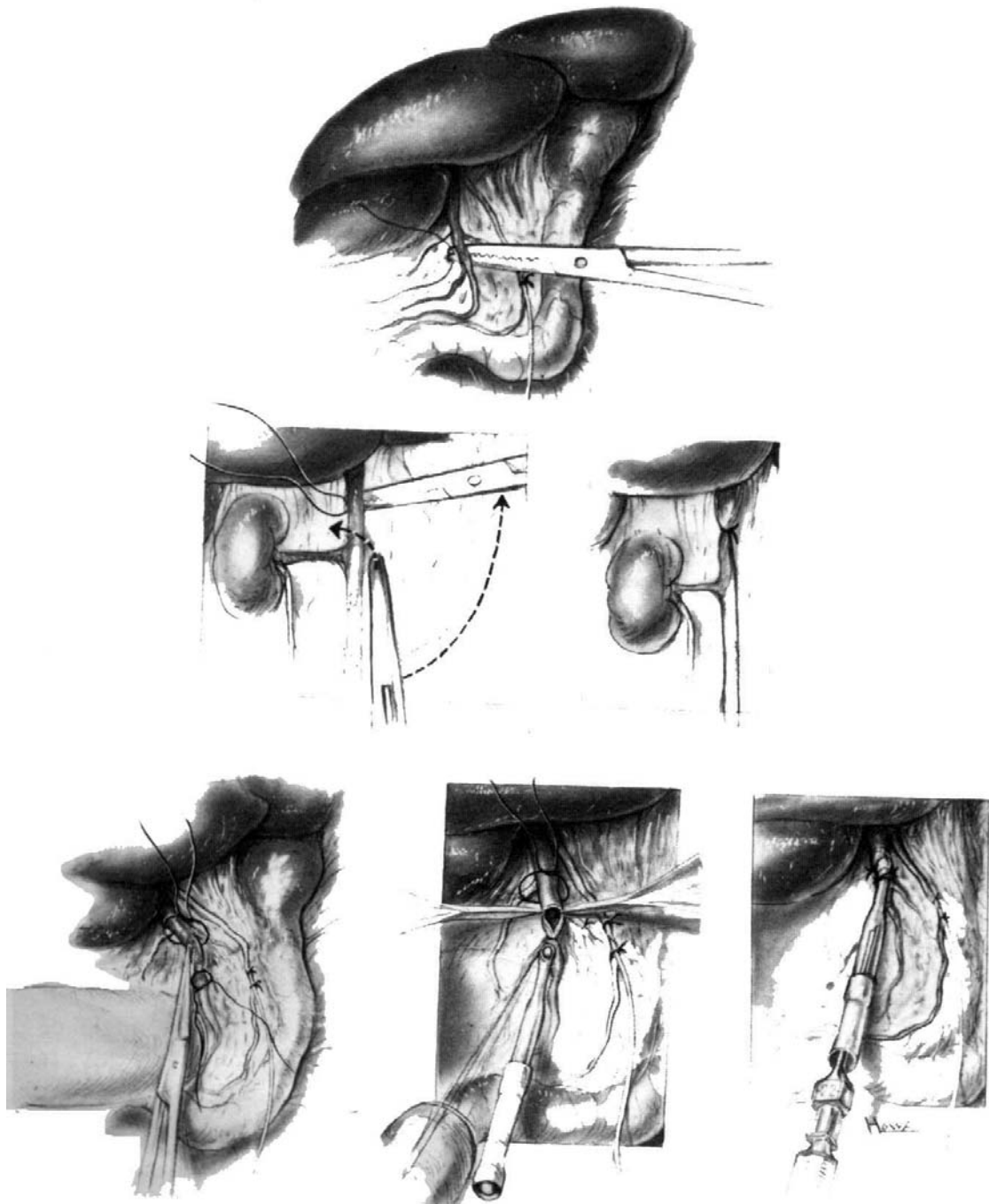
#### **6.2.1.4. A mellüreg feltárása**

A rekeszizom bevágásával légmell alakul ki és a tüdő elválik a rekeszizomtól is és a mellhártyától is. A mellkas feltárásával hozzáférünk a szívhez és a v. cava superiorhoz (5. ábra). Ligatúrát helyeztünk fel a jobb pitvartól kb. egy ujjnyira a v. cava sup.-ra. A szívet csipesz segítségével óvatosan kiemeltük, majd ollóval bemetsztük a jobb pitvar felől, majd a kanült felcsúsztattuk a ligatúráig és azzal rögzítettük. Ezután a v. cava inf.-on lévő ligatúrával az eret elkötöttük, és így zárt rendszert hozunk létre, megakadályozva a perfúziós folyadék további elszivárgását.

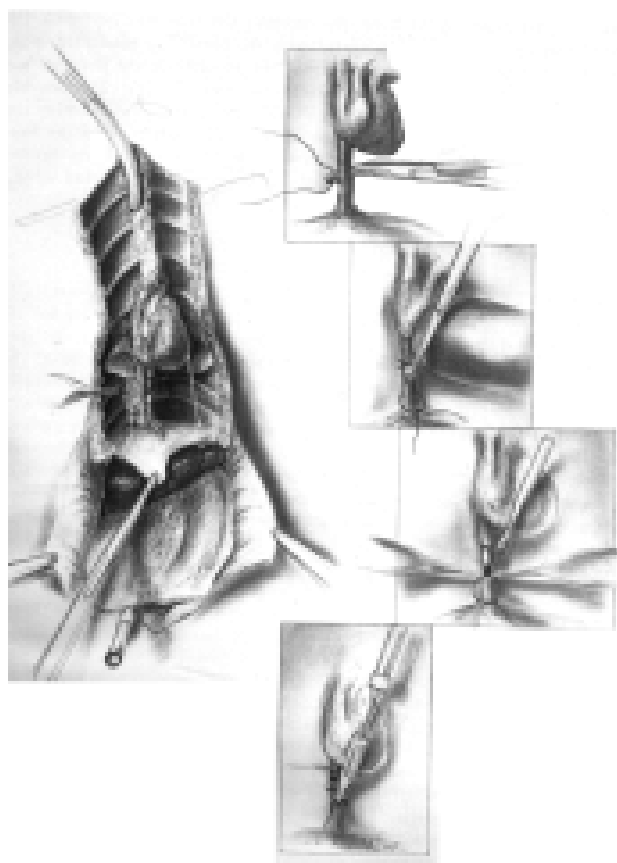
#### **6.2.2. Májsejt preparálás kutya és humán májból**

Az emberi és a kutya máj kioperálása nem az osztályunkon történt. A humán májakat a Semmelweis Egyetem Sebészeti és Transzplantációs Klinikától, míg a kutya májakat a Gyógyszerkutató Intézetől kaptuk. Vizsgálatainkat a helyi Etikai Bizottság engedélyével végeztük. A májmintákon a vizsgálatokhoz szükséges májsejt mennyiségnek megfelelően választottuk ki azt az eret, amibe a kanült kötöttük, majd az alábbiakban ismertetett perfúziós módszert alkalmaztuk. Mivel mind a humán mind a kutya máj jóval nagyobb méretű, mint a patkányé, ennek megfelelően a perfúzió során alkalmazott perfúziós folyadékok térfogata, valamint a kollagenáz mennyisége is nagyobb, a perfúzió ideje pedig hosszabb volt, mint a patkány esetében. A patkány májsejt preparálásától eltérő mennyiségi, térfogati és idő értékeket a módszer ismertetésekor - kutya és emberi máj esetére vonatkoztatva - zárójelben tüntettük fel.

4. ábra. Ligatúra felhelyezése a v. cava inferior-ra és a v. portae kanülözésének folyamata



**5. ábra. A mellkas feltárása és a v. cava superior kanülözésének folyamata**





### 6.2.3. Perfúziós módszer

A májperfúzió során két oldatot használtunk, amelyeket termosztátban 41 °C-ra melegítettünk fel. Az oldatok vékony csövekben áramlova éppen 37 °C-ra hűltek le, mire eljutottak a májhoz. A két tárolóedénybe egy-egy steril porlasztó merült, amelyeken karbogén gáz (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) áramlott az oldatokba, így beállítva az optimális oxigén koncentrációt és pH-t. A perisztaltikus pumpa szívó ága az első oldatba merült, a nyomó ág pedig egy buborékfogóban végződött. Ebből műanyag csövön keresztül – a perisztaltikus pumpa segítségével - jutott a folyadék a kanülbe. Az oldatot a perfúzió megkezdéséig az első tárolóedénybe recirkuláltattuk. A perfúzió megkezdése előtt, a fenti elrendezésben egy órán át működtettük a rendszert, hogy a kívánt paraméterek beálljanak.

A perfúziós folyadék áramlási sebessége a második kanül bekötéséig 10 ml/perc volt, a v. cava. in. elkötése után ezt 40 ml/percre növeltük. A perfúzió célja a hepatociták közötti sejtkapcsoló struktúrák megszüntetése, hogy végül májsejt szuszpenzióhoz jussunk. Az első fázis a máj kelátképzővel történő átmosása. Az EBSS oldatból, amely 0,5 mM EGA-t tartalmazott, 250 ml-t (kutya és ember esetében 500 ml-t) folytattunk át a májon. Az EGTA komplexbe viszi a kalcium ionokat, így a kalcium-függő sejtkapcsoló struktúrák irreverzibilisen megszűnnek. A második fázis a kelátképző kimosása. EBSS oldatból [350 ml] (kutya és ember esetében 700 ml) kb. 220 ml [500 ml] mosta át a májat. A harmadik fázisban a maradék 130 ml-t (kutya és ember esetében 200 ml-t) visszaforgattuk a tárolóedénybe. A recirkuláló rendszerhez 1,3 ml (1,6 ml) 0,25 M-os CaCl<sub>2</sub>-oldatot és 25 mg (kutya és ember esetében 50 mg) EBSS-ben oldott kollagenáz enzimet adtunk. 5 percig (kutya és ember esetében 30 percig) tartottuk fenn az áramlást, ezalatt az idő alatt a kollagenáz feloldotta a sejtek közötti sejtkapcsoló struktúrákat, így a sejtek elváltak egymástól. A májat kívülről borító tok nem emésztődik, így a képlékeny máj viszonylag könnyen kiemelhető.

#### **6.2.4. A májsejtek tisztítása, kinyerése:**

A májat borító tokot 6.1. pontban feltüntetett szuszpendáló oldatban szétszakítottuk (kutya és emberi máj esetében a májat ollóval vágtuk fel), majd a sejtsuszpenziót steril gézen szűrtük, és a fenti oldattal kb. 40 ml-re kiegészítettük, felsuszpendáltuk majd 900 1/perc fordulatszám mellett egy percig centrifugáltuk. A sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, majd a fent említett oldattal ismét először 20 ml-re, majd 40 ml-re kiegészítve felsuszpendáltuk a sejteket. Centrifugálás után a mosási eljárást a W-H tápoldattal is kétszer megismételtük. A második tápoldattal történő mosás után csak 15 ml-re hígítottuk a sejteket. Alapos szuszpendálás után, ebből az oldatból történt az életképesség meghatározása.

Az életképesség %-os meghatározását tripánkék oldat felhasználásával végeztük el. A meghatározásához mintát vettünk a homogén sejtsuszpenzióból és tápoldattal ötszörösre hígítottuk, majd további kétszeres hígítást végeztünk a tripánkék oldattal. A hígított szuszpenziót Bürker kamrába juttattuk és meghatároztuk az élő és a tripánkék oldat hatására kékre színeződött életképtelen sejtek számát.

A sejtszám adatok és a hígítás ismeretében megállapítottuk a sejt-sűrűséget, majd ez után olyan hígítást végeztünk, hogy a kísérleteinkben alkalmazott 2 millió élő sejt/ml-es sejtsűrűség alakuljon ki.

### **6.3. Mikroszóma preparálás**

A májat NaCl oldattal (0,9 %) mostuk, majd ollóval összevágtuk. Ezután jégfürdőben 4-szeres térfogatú Tris-HCl pufferben (7,4 pH, 0,1 M) homogenizáltuk (Potter-Elvehjem homogenizátor). A puffer még 0,15 M KCl-t is tartalmazott. A durva homogenizátumot 10000 x g-vel 30 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A mikroszóma frakciót a felülúszóból preparáltuk 100000 x g-vel történő (1 óra, 4 °C) centrifugálással (Janetzky WAC 602). A kiülepedett mikroszómát a homogenizáló pufferben felsuszpendáltuk, majd újra 100000 x g-vel centrifugáltuk. Végül a mikroszómát úgy szuszpendáltuk fel a homogenizáló pufferben, hogy a fehérje koncentráció körülbelül 10 mg/ml legyen, és ezután felhasználásig -80 °C-on tároltuk (Kelvinator Series 500 Manitowoc, WIC., U.S.A.). A fehérje koncentrációt Lowry és munkatársai (1951) módszere alapján mértük, standardként bovine szérum albumint alkalmazva. A vizsgálatoknál használt mikroszóma mennyiséget a fehérje tartalom alapján adtuk meg.

## 6.4. Homogenizátum készítés

A szerveket NaCl oldattal (0.9 %) mostuk, majd ollóval összevágtuk. Ezután jégfürdőben olyan 4-szeres térfogatú, Tris-HCl pufferben (7,4 pH, 0,1 M) homogenizáltuk (Potter-Elvehjem homogenizátor), amely még 0,15 M KCl-t is tartalmazott. Az így nyert durva homogenizátumot használtuk a továbbiakban a farmakokinetikai vizsgálatainkhoz. A homogenizátumok fehérje koncentrációját szintén Lowry és munkatársai (1951) módszere alapján határoztuk meg.

## 6.5. Szérum készítése

A vért levétele után 1-1,5 órán keresztül hűtőszekrényben tároltuk. Ezt követően 2400 x g -vel 10 percig centrifugáltuk. A vizsgálatokhoz a felülúszó frakciót hígítatlanul használtuk.

## 6.6. Enzimindukció vizsgálata

### 6.6.1. *In vivo* előkezelés az enzimaktivitások változásának tanulmányozására

A 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkiláció, az aminopirin N-demetiláció valamint a lipid peroxidáció méréséhez fenobabitállal (PB) előkezelt patkányokból származó mikroszómát használtunk. Három napig, naponta 80 mg/kg PB-lal i.p. kezeltük a 3 állatból álló csoportot. A kontroll csoport kezelésként izotóniás sóoldatot kapott. A 4. napon az állatok máját eltávolítottuk, egyesítettük majd a 6.3. pontban leírtak szerint a májából mikroszómát preparáltunk. A kontroll csoporthoz képest 35 szörös CYP2B indukciót kaptunk.

### 6.6.2. *In vivo* előkezelés az antipirin metabolizmus tanulmányozására

Az antipirin (AP) metabolizmusának vizsgálatához 40 mg/kg PB vagy spironolakton (SP) 1%-os Tween 80-nal készült szuszpenziójával per os 3 napig kezeltük elő a 3-3 állatból álló csoportokat. A kontroll csoport az előkezelésnek megfelelő térfogatú izotóniás sóoldatot kapott. Az állatok máját a 4. napon kioperáltuk, csoportonként egyesítettük és a 6.3. pontban leírtak szerint mikroszómát preparáltunk belőle, majd ellenőriztük az indukció mértékét. PB esetén 22,5-szeres CYP2B és 2-szeres CYP3A, míg SP esetén szintén 2-szeres CYP3A enzimindukciót mértünk.

## 6.7. *In vitro* antipirin metabolizmus

Az antipirinből származó metabolitok képződésének vizsgálatához 1 mg/ml fehérje koncentrációt alkalmaztunk. Az állatok *in vivo* előkezelése a 6.6.2. pontban leírt módon történt, a mikroszóma frakciókat a kezeletlen és az előkezelt állatok májából preparáltuk. A mikroszómát 37 °C-on 15 percig olyan 0,8 ml térfogatú 0,1 mM-os Tris-HCl (pH 7,4) pufferben inkubáltuk elő, amely 2,5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-ot, 1,25 mM NADPH-t, 6,25 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 6,25 mM glükóz 6-foszfátot és 1,25 egység glükóz 6-foszfát dehidrogenázt tartalmazott a szelektív P450 enzimgátlók jelenlétében vagy hiányában. Az inhibitorokat szintén 0,1 M-os Tris-HCl pufferben oldottuk a troleandomicin (TAO) kivételével, aminek etanolos oldatát először a kémcső aljára bepároltuk. Ezt követően a TAO-t mikroszómával oldottuk fel, majd ezután adtuk a többi komponest a reakcióelegyhez. Az antipirin oxidációt 200 µl AP (80 mM) oldat hozzáadásával indítottuk, a reakcióelegyben a végső AP koncentráció 16 mM lett. A reakciót 7,5 perc után 0,335 ml 20%-os triklórecetsavval állítottuk le. A mintákat 10 percig 2400 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóhoz 200 µl 4N NaOH-ot és 40 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-ot adtunk, majd 3 x 10 ml toluollal extraháltuk, hogy a változatlan formában megmaradt AP feleslegtől megszabaduljunk. Az extahálás eredményeképpen az oldatban lévő AP kb. 95%-át távolítottuk el. A vizes fázis pH-ját 2 ml, 1 M-os kálium-foszfát (pH 6,0) pufferrel állítottuk be 7,0-re, majd 660 mg NaCl-ot adtunk hozzá, és a só feloldódásáig kevertük. A metabolitokat 10 ml kloroform/etanol 9:1 (v/v) összetételű oldattal történő extrahálással nyertük ki a vizes fázisból (Teunissen és munkatársai, 1983), majd az extrakciót újabb 5 ml kloroform/etanol 9:1 eleggyel megismételtük. A szerves fázisokat egyesítettük, majd szárazra pároltuk. A bepárlás maradékát 100 µl metanol/víz 1:1 elegyben oldottuk fel, ebből 20 µl-t használtunk fel a HPLC-s analízishez.

## 6.8. Enzimaktivitás mérés

### 6.8.1. 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkiláció (PROD) mérése

A 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkilációt (PROD) Burke és munkatársai (1985) módszere alapján, a keletkezett rezorufin fluoreszenciájának mérésével határoztuk meg. A kísérletekhez a 6.6.1. pontban leírt módon PB-lal előkezelt állatokból származó mikroszómát használtunk.

A PROD tanulmányozásakor 0,075 mg/ml mikroszómális fehérjét alkalmaztunk, amit az  $\alpha$ -metildopa (AMD) vagy más a táblázatokban feltüntetett anyagok jelenlétében, illetve hiányában 37 °C-on 0-10 percig olyan Tris-HCl pufferben (0,1 M, pH 7,4) inkubáltuk elő, ami 0,5 mM NADPH-t, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 5,0 mM glükóz 6-foszfátot és 1,2 egység glükóz 6-foszfát dehidrogenázt is tartalmazott. A szubsztrátoxidációt a 6  $\mu$ l DMSO-ban oldott 7-pentoxi-rezorufin hozzáadásával indítottuk. A 7-pentoxi-rezorufin végkoncentrációja a reakció-elegyben 6  $\mu$ M volt. A reakciót 5 perc után 2 ml jéghideg etanol hozzáadásával állítottuk le. A kontrollt úgy készítettük, hogy leállítás után adtuk a reakcióelegyhez a NADPH-t. Leállítás után a mintákat 10 percig 2400 x g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszó fluoreszcenciáját 550 nm gerjesztő fény és 589 nm analizátor fény beállítással vizsgáltuk Shimadzu RF-5301PC spectrofluoriméter alkalmazásával.

#### **6.8.2. Aminopirin N-demetiláció (APND) mérése**

Az aminopirin N-demetilációt (APND) Nash (1953) módszere alapján, a reakcióban keletkezett formaldehid mennyiségének mérésével határoztuk meg. A vizsgálatokhoz a 6.6.1. pontban leírt módon PB-lal előkezelt állatokból származó mikroszómát alkalmaztunk. Az APND tanulmányozásakor 0,1 mg/ml mikroszómális fehérjét alkalmaztunk, amit 37 °C-on 0-10 percig inkubáltuk elő olyan Tris-HCl pufferben (0,1 M, pH 7,4), ami 0,5 mM NADPH-t, 6 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 7,5 mM glükóz 6-foszfátot, 1 egység glükóz 6-foszfát dehidrogenázt és 5  $\mu$ M EDTA-t tartalmazott AMD, illetve a táblázatokban feltüntetett más anyagok jelenlétében vagy hiányában. A kontrollt úgy készítettük, hogy leállítás után adtuk a reakcióelegyhez a NADPH-t. A szubsztrátoxidációt 200  $\mu$ l 50 mM-os aminopirin törzsoldat hozzáadásával indítottuk. Az aminopirin végkoncentrációja az oldatban 10 mM volt. A leállítás 10 perc után 0,335 ml 20%-os TCA-val történt. Ezután 10 percig 2400 x g-vel centrifugáltuk a mintákat, majd 1 ml felülúszóhoz 1 ml Nash reagenst adtunk. A reakcióelegyet 37 °C-on 40 percig állni hagytuk, majd az abszorbanciáját 412 nm-en spektrofotométerrel vizsgáltuk (Milton Roy Spectronic 401).

## 6.9. A lipid peroxidáció mérése

A lipid peroxidáció mértékét Buege és Aust (1978) módszere alapján határoztuk meg, ami a tiobarbitursavval komplexet képző szubsztrátok (TBARS) (nagy részt a malondialdehid) kolorimetriás mérésén alapszik.

A kísérletekhez a 6.6.1. pontban leírt módon PB-lal előkezelt állatokból származó mikroszómát alkalmaztunk. A lipid peroxidációt a NADPH oldat hozzáadásával indítottuk. Az inkubációs elegyben 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl puffer (pH 7,4) volt, amely 0,075 mg/ml mikroszómát, 0,5 mM NADPH-t, 3 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 5 mM glükóz 6-foszfátot, 0,6 egység glükóz 6-foszfát dehidrogenázt és 5 μM EDTA-t tartalmazott AMD, illetve a táblázatokban feltüntetett anyagok jelenlétében vagy hiányában. A reakciót leállító elegy 15% TCA - 0,375 % tiobarbitursav - 0,25 M HCl volt, amelybe használat előtt 0,01% (w/v) BHT-t adtunk. Ebből a leállító folyadékból 1 ml került 0,5 ml reakció elegyhez. A kontrollt úgy készítettük, hogy leállítás után adtuk a reakcióelegyhez a NADPH-t. Ezután a mintákat összekevertük és 95 °C-os vízfürdőben 25 percig forraltuk. Hűtés után 2400 g-vel 10 percig centrifugáltunk majd 535 nm-en spektrofotométerrel (Milton Roy Spectronic 401) mértük meg a felülúszó abszorbanciáját. Standardként malondialdehid bis(dimetil acetál)-t alkalmaztunk.

## 6.10. *In vitro* vinpocetin metabolizmus

### 6.10.1. Vinpocetin inkubációja májsejtszuspenzióban

A vinpocetin DMSO-val készült oldatából (500 μM) 60 μl-t adtunk 6 ml a 6.2. pontban leírt módon elkészített human (n=3), kutya (n=2) vagy patkány (n=4) májsejtszuspenzióhoz. A vinpocetin végső koncentrációja a reakcióelegyben így 5 μM lett. Az inkubációt 37 °C-on, nedvesített légtérű széndioxid termosztátban (5% CO<sub>2</sub>, 95% levegő) végeztük. Mintákat 0, 5, 15 és 30 percen vettünk és leállítás céljából azonnal azonos térfogatú jéghideg acetonitrilhez kevertük. Centrifugálás után (2400 x g, 4 °C, 10 perc) a felülúszót 0,45 μm-es (Shandon hypersil) szűrővel megszürtük és 20 μl-t használtunk fel a HPLC-s analízishez.

### **6.10.2. Vinpocetin inkubációja szérumban, szervhomogenizátumokban és májsejt frakciókban**

A vinpocetin DMSO-val készült oldatából (500  $\mu\text{M}$ ) 60  $\mu\text{l}$ -t adtunk 6 ml, emberi májból, kutya májból vagy különféle patkány szervekből származó biológiai mintákhoz, amiket a 6.3., 6.4., illetve a 6.5. pontokban leírtak szerint készítettünk el. A vinpocetin végső koncentrációja a reakcióelegyben 5  $\mu\text{M}$  volt. Az inkubációt 37 °C-on végeztük. Az alkalmazott fehérje koncentráció mikroszóma és citoszol frakciók esetén 5 mg/ml, patkány tüdőből, veséből, izomból és vékonybél mucosa-ból készült homogenizátumok esetében 1 mg/ml volt, míg a szérumokat hígítás nélkül (70 mg/ml) használtuk.

A mintavételek időpontjai és a minták analízishez történő feldolgozása megegyeztek a 6.10.1. pontban leírtakkal.

## **6.11. HPLC vizsgálatok**

### **6.11.1. A HPLC vizsgálatokhoz használt berendezés**

A folyadékkromatográfiás méréshez ISCO (ISCO, Lincoln, Nebraska) folyadékkromatográfot használtunk, amely két ISCO 2350 típusú pumpát és ISCO V<sup>4</sup> típusú UV detektort tartalmazott.

### **6.11.2. Az antipirin metabolitjainak vizsgálata HPLC alkalmazásával**

Szilárd fázisként LiChrosphereR 100, 125x4 mm 5  $\mu\text{m}$ -es szemcseméretű, fordított fázisú oszlopot alkalmaztunk (Merck, Darmstadt, Németország). Az izokratikus mozgó fázis 13,5% acetonitrilből, 86,5% 0,02M foszfát pufferből és 0,1 % trietil-aminból állt (pH 7,3). Amennyiben a minta klorámfenikolt is tartalmazott a zavaró klorámfenikol metabolit miatt ugyanezt a mozgó fázist 6,9-es pH-n használtuk. 1,5 ml/perc folyási sebesség mellett 254 nm-en detektáltunk.

### **6.11.3. Vinpocetin vizsgálata HPLC alkalmazásával**

Szilárd fázisként LiChrosphereR 100, 125x4 mm 5  $\mu\text{m}$ -es szemcseméretű, fordított fázisú oszlopot alkalmaztunk (Merck, Darmstadt, Németország). A mozgó fázis a vinpocetin esetében 90% acetonitrilt 10% vizet és 0,1 % trietil-amint tartalmazott (pH 7,5). A detektálás 275 nm-en történt.

Az eluens pH-ját tömény  $H_3PO_4$ -val (85 %) állítottuk be és 1 ml/perces áramlási sebességgel szobahőmérsékleten kromatografáltunk. Az analízisig a mintákat  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk, ahol több hónapig stabilak voltak. A vinpocetin koncentrációja sejtmentes közegben nem változott. Az anyagmentes kontrollokban zavaró csúcsokat nem észleltünk.

## 6.12. A farmakokinetikai adatok értékelése

A farmakokinetikai adatok értékelésénél a "well stirred" modellt alkalmaztuk (Pang és Rowland, 1977), a következő egyenleteket felhasználásával:

$$Cl_{\text{vér(becsült)}} = \frac{Cl_{\text{int}} \times fu \times Q_H}{(Cl_{\text{int}} \times fu) + Q_H}$$

- Ahol  $Cl_{\text{vér(becsült)}}$  : a teljes test-vér clearance (ml/perc/kg)  
 $Q_H$  : a máj vérátáramlási perctérfogata  
 $Cl_{\text{int}}$ : a teljes szervre vonatkoztatott clearance (ml/perc/kg)  
 $fu$ : a fehérjéhez nem kötődött (szabad) vegyület aránya

A  $Q_H$  a máj vérátáramlási perctérfogata az irodalmi adatok szerint (Chou és munkatársai, 2000):emberben 19 ml/perc/kg; kutyában 43 ml/perc/kg és patkányban 60 ml/perc/kg.

Innen

$$Cl_{\text{in vivo becsült}} = Cl_{\text{vér(becsült)}} \times (\text{plazma / vér hányados})$$

A plazma/vér hányados a fajok között eltérést mutat: patkányban 0,63; kutyában 0,64; emberben 0,57.

### 6.12.1. $Cl_{\text{int}}$ számítása

Májsejtszuszpenzió esetén  $2 \times 10^6$  sejt/ml sejtsűrűséggel dolgoztunk. Az *in vitro* clearance értéket a vinpocetin koncentrációjának csökkenéséből számoltuk ki. Az időben csökkenő koncentráció értékekhez exponenciális görbét illesztettünk, majd a kapott  $\beta$  értéket 1 ml reakció térfogatra számoltuk át.



$$AUC = \int_0^{\infty} c dt = \frac{B}{\beta}$$

$$Cl = \frac{D}{AUC} = \frac{5\mu M \times \beta \times V}{5\mu M} \equiv \beta$$

ahol  $B = 5 \text{ nmol/ml (} 5\mu\text{M)}$

$D = 5 \text{ nmol/ml (} 5\mu\text{M)}$

$V = \text{a reakcióelegy térfogata, azaz } 1 \text{ ml}$

Ahhoz, hogy 1 g májra vonatkoztathassuk a Cl értéket figyelembe vettük azt, hogy 1 g máj  $1,35 \times 10^8$  sejtet tartalmaz (Houston, 1994). A kapott értéket ( $Cl_{in vitro}$ ) beszoroztuk a máj teljes súlyával, majd elosztottuk a vizsgált faj teljes testtömegével. Az ilyen módon számított érték nem más, mint a  $Cl_{int}$  ml/perc/kg egységben kifejezve.

Szérum esetén az  $Cl_{in vitro}$  értéket a vinpocetin koncentráció csökkenéséből közvetlenül határoztuk meg a fent leírt módon, majd az inkubációhoz használt plazma mennyiséget szoroztuk a vizsgált faj teljes plazmamennyiségével és elosztottuk a testtömegével, így megkaptuk a  $Cl_{int}$  értéket (ml/perc/kg).

A patkányból származó szervhomogenizátumok esetén pedig a  $Cl_{in vitro}$  értéket a szérum esetében leírt módon határoztuk meg, majd szoroztuk a teljes szerv súlyával, elosztottunk a teljes test tömeggel, ami megadta a  $Cl_{int}$  értéket (ml/perc/kg).

### 6.12.2. A biológiai hasznosíthatóság számítása

A biológiai hasznosíthatóság (F) kiszámításához az

$$F=1-E$$

egyenletet használtuk fel,

ahol E az extrakciós hányados:

$$E = \frac{Cl_{int} \times fu}{(Cl_{int} \times fu) + Q_H}$$

ahol  $Q_H$  : a máj vérátáramlási perctérfogata  
 $Cl_{int}$ : a teljes szervezetre vonatkoztatott clearance (ml/perc/ kg)  
fu: a fehérjéhez nem kötődött (szabad) vegyület aránya

### **6.13. Statisztikai analízis**

A prezentált adatok  $\pm$  szórás minden egyes esetben minimum három független kísérlet eredményének átlagából származtak. Minden kísérletet három párhuzamossal végeztünk. A szignifikancia megállapításához variancia analízist, illetve Student-féle  $t$ -tesztet alkalmaztunk.

## **7. Eredmények és értékelésük**

I. A gyógyszerkutatás szempontjából lényeges, xenobiotikumok által létrehozott kölcsönhatások tanulmányozása *in vitro* módszerek felhasználásával

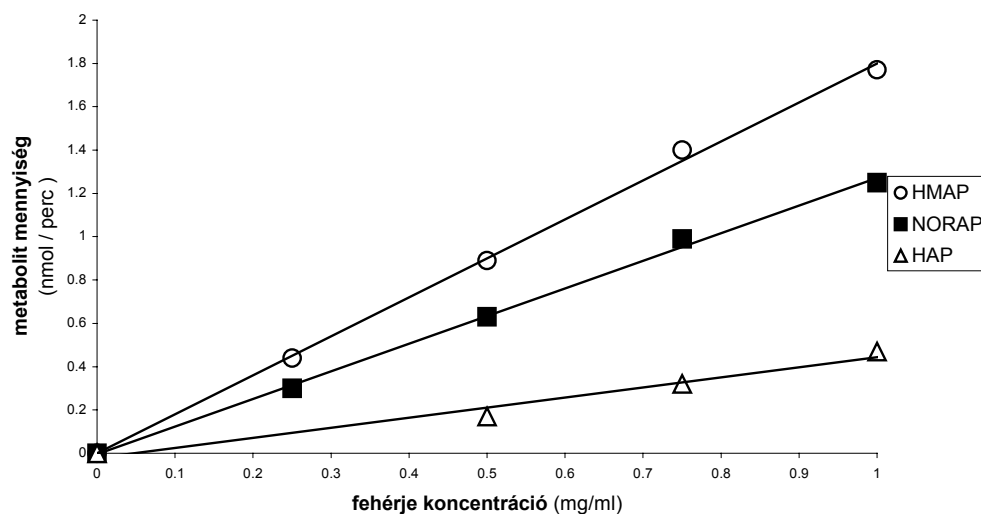
### **7.1. Az $\alpha$ -metildopa és más xenobiotikumok hatásai *in vitro* tesztrendszerekben**

#### **7.1.1. Az antipirin metabolizmusának változása xenobiotikumok hatására**

Az antipirin széles körben alkalmazott tesztanyag a máj oxidáló funkciójának ellenőrzésére (Butters és Reichen, 1990; Butters és munkatársai, 1993; Groen és munkatársai, 1992; Poulsen és Loft, 1988). Szabó és munkatársai (1985) azt a jelenséget tapasztalták, hogy az  $\alpha$ -metildopa gátolta a SP által előidézett felezési idő csökkenést, amit az antipirin *in vivo* tanulmányozása közben figyeltek meg. PB-lal végzett indukció után ellenben nem történt változás az  $\alpha$ -metildopa hatására az antipirin felezési idejében. A felezési idő csökkenés oka lehet a metabolizmus sebességének változása, ezért kezdtük tanulmányozni az antipirin *in vitro* metabolizmusát olyan mikroszóma frakciók segítségével, melyeket SP-nal vagy PB-lal előkezelt állatok májából készítettünk. Meghatároztuk mindhárom fő metabolit (HMAP, NORAP, HAP) keletkezési sebességét és vizsgáltuk azt is, hogy mely CYP enzimek vesznek részt az egyes metabolitok képzésében.

Előkísérletekben választottuk ki azt a fehérje koncentráció tartományt, amely biztosítja, hogy a metabolitok keletkezési sebessége és a fehérje koncentráció között lineáris összefüggés legyen. A 6. ábra mutatja, hogy 1 mg/ml fehérje koncentrációig mindhárom metabolit keletkezési sebessége lineáris függvény szerint változik, ezért választottuk vizsgálatainkhoz az 1 mg/ml-es mikroszóma koncentrációt.

6. ábra Az antipirin metabolitjainak képződése a fehérje koncentráció függvényében kontroll mikroszóma esetén



#### 7.1.1.1. Az *in vivo* előkezelések hatása az antipirin metabolitok mennyiségére

PB és SP előkezelés hatására a képződött metabolitok aránya megváltozott. A kontroll mikroszómaéhoz képest a HMAP metabolit mennyisége a felére csökkent, a NORAP mennyisége 1,5-szeresre, míg a HAP mennyisége 3-szorosra nőtt mind a PB mind a SP kezelést kapott állatokból származó mikroszóma frakciókban. Irodalmi adatok és saját méréseink alapján a SP a CYP3A enzimet indukálja, tehát a kezelés hatására bekövetkező NORAP és HAP mennyiségi növekedés a CYP3A részvételére utal ezen metabolitok képzésében (1. táblázat).

1. táblázat Az *in vivo* előkezelések hatása az antipirin metabolitok mennyiségére

	HMAP	NORAP	HAP
	nmol/mg/perc		
<b>Kezeletlen</b>	1,55 ± 0,10	1,04 ± 0,12	0,78 ± 0,11
<b>PB</b>	0,85 ± 0,07 <sup>***</sup>	1,73 ± 0,23 <sup>**</sup>	2,68 ± 0,41 <sup>***</sup>
<b>SP</b>	0,87 ± 0,17 <sup>***</sup>	1,50 ± 0,25 <sup>**</sup>	2,00 ± 0,45 <sup>***</sup>

\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001

Azért hogy valószínűsíthessük, hogy mely enzimek felelősek a megváltozott arányokért, különböző, szelektív P450 enzimgátlókat alkalmaztunk: cimetidint (Cim), klorámfenikolt (Kl) és troleandomicint (TAO). A felsorolt enzimgátlók mellett az  $\alpha$ -metildopa antipirin metabolizmusra gyakorolt esetleges hatását is vizsgáltuk.

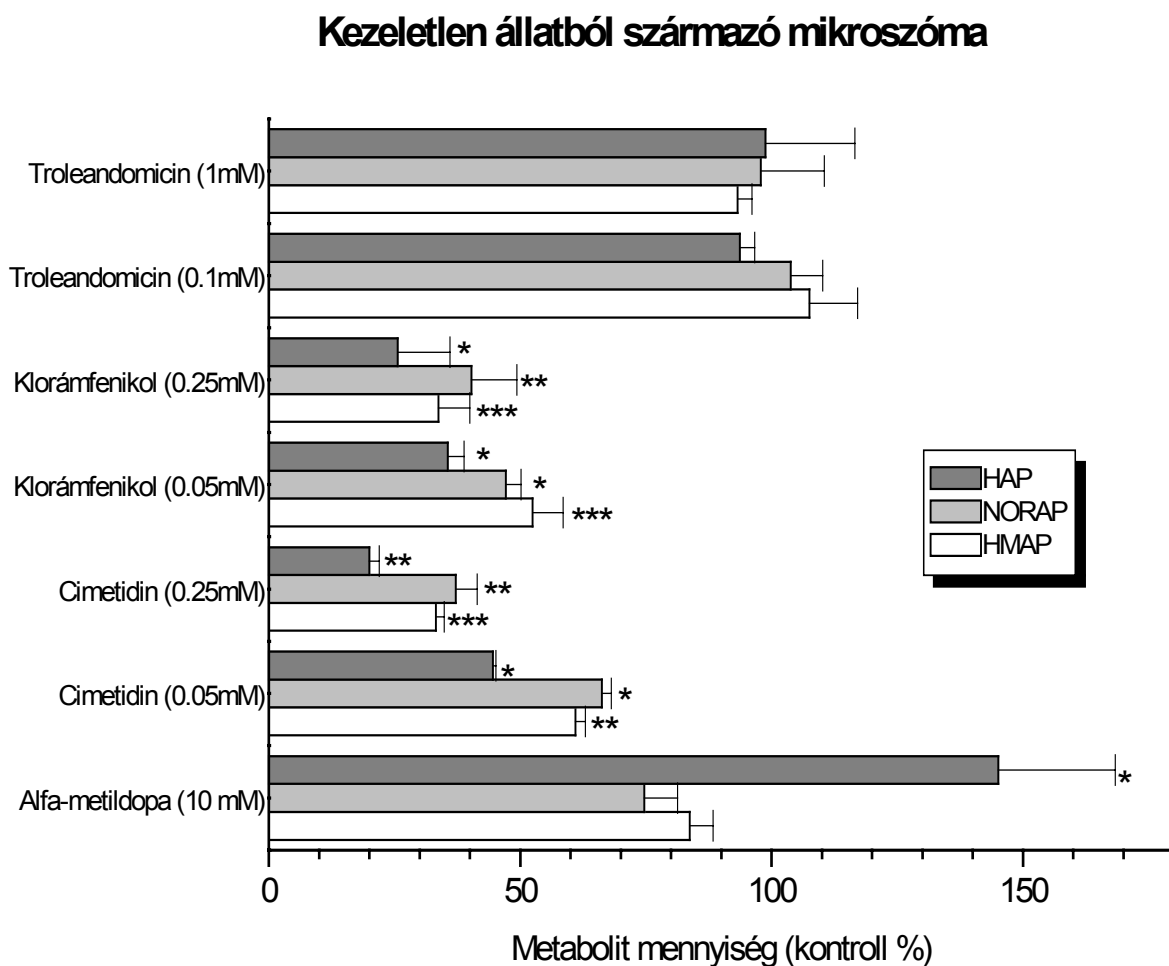
#### **7.1.1.2. Az antipirin metabolizmusának gátlása troleandomicinnel**

Az enzimgátlókkal végzett vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a TAO, ami specifikus gátlója a CYP3A izoenzimeknek, a PB és SP előkezelés után nyert mikroszómákban nem befolyásolta a HMAP, viszont gátolta a NORAP és a HAP metabolitok keletkezését, ami a CYP3A szerepére utal ezen metabolitok képzésében, összhangban a 7.1.1.1. pontban ismertetett eredményekkel. Kontroll mikroszómában a TAO egyik metabolit képződését sem befolyásolta szignifikánsan, ami a konstitutív CYP2C izoenzimek szerepére utalhat a kezeletlen állatok esetén (7., 8., 9. ábrák).

#### **7.1.1.3. Az antipirin metabolizmusának gátlása cimetidinnel**

A Cim, ami kis koncentrációban (0,05 mM) csak a konstitutív CYP2C11/C6 - izoenzimeket gátolja, szintén csökkentette mindhárom vizsgált metabolit mennyiségét, ez a konstitutív enzimek jelentőségére utal a folyamatban. Nagyobb dózist alkalmazva (0,25 mM) a Cim a CYP2C11/2C6 enzimek mellett a CYP2B és CYP3A izoenzimeket is gátolja. Ebben a koncentrációban a Cim a 0,05 mM koncentrációban előidézett gátláshoz viszonyítva a NORAP képződését szignifikánsan nagyobb mértékben befolyásolta a PB-lal előkezelt állatokból nyert mikroszómában, mint a SP előkezelés után nyert mikroszómában, ami összhangban van a CYP2B izoenzimek ezen metabolit képzésében való részvételével. A következtetésnél figyelembe vettük, hogy a kétféle mikroszóma között a fő különbség az, hogy a PB-lal előkezelt állatokból származó mikroszómában a CYP2B izoenzimek is indukálódnak nemcsak a CYP3A enzimek mint a SP előkezelés után nyert mikroszómában (7., 8., 9. ábrák).

7. ábra. Az antipirin metabolizmusa kezeletlen állatokból származó mikroszóma esetén P450 enzimgátlók és az  $\alpha$ -metildopa jelenlétében



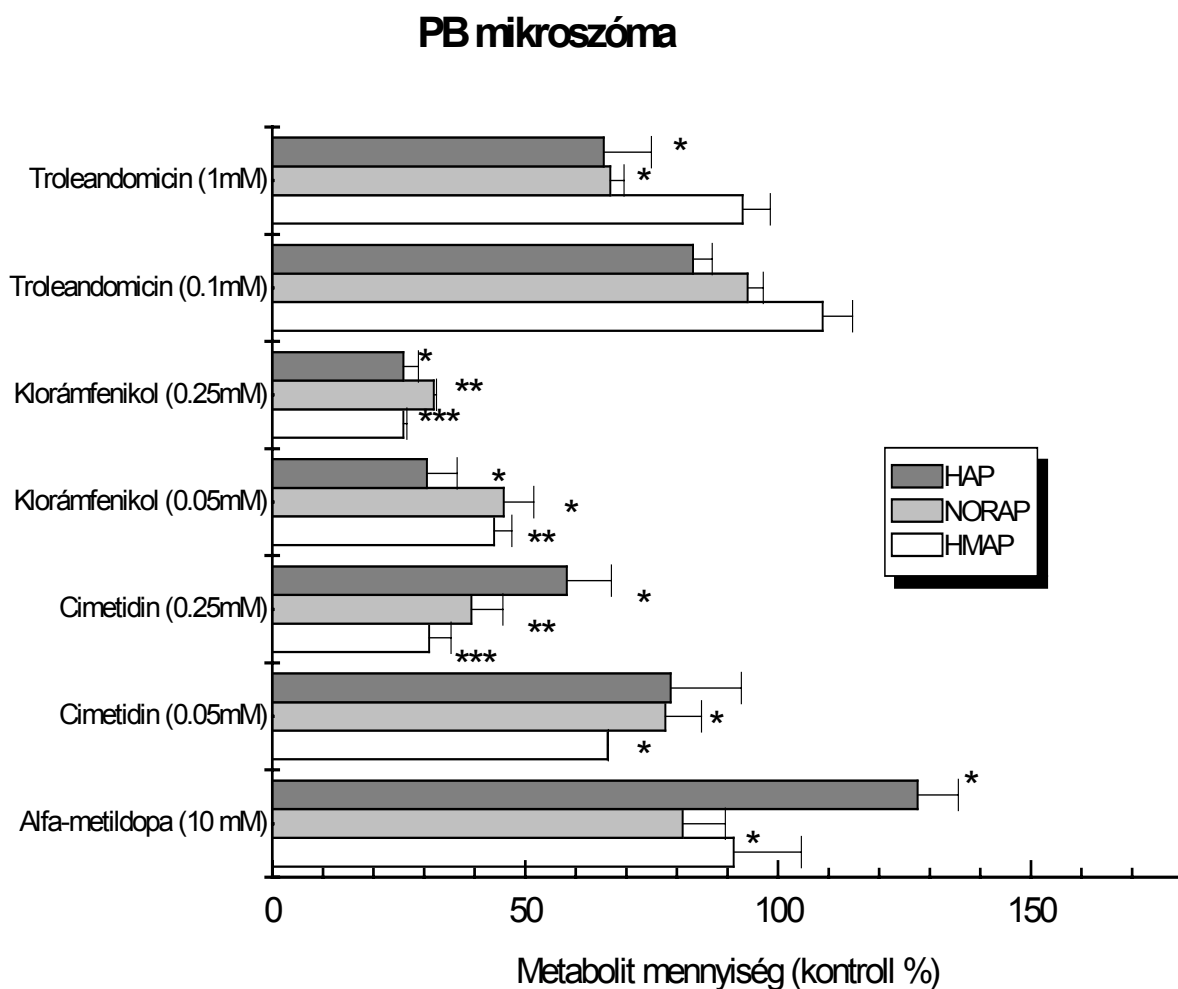
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 7.1.1.4. Az antipirin metabolizmusának gátlása klorámfenikollal

A KI elsősorban a CYP2B izoenzimeket, de kisebb mértékben a CYP3A-t és a konstitutív CYP2C11-et is gátolja. E vegyület mindhárom AP metabolit mennyiségét csökkentette minden vizsgált mikroszóma típus esetén (7., 8., 9. ábrák). A NORAP és a HAP keletkezésének sebessége jobban csökkent 0,05 mM KI mint azonos koncentrációjú Cim hatására a PB-lal előkezelt állatok májából nyert mikroszómában. A SP előkezelés után izolált mikroszóma frakció esetén a két gátlószer hatása kevésbé különbözött. Ez a megfigyelés alátámasztja, hogy a CYP2B izoenzimek szerepet

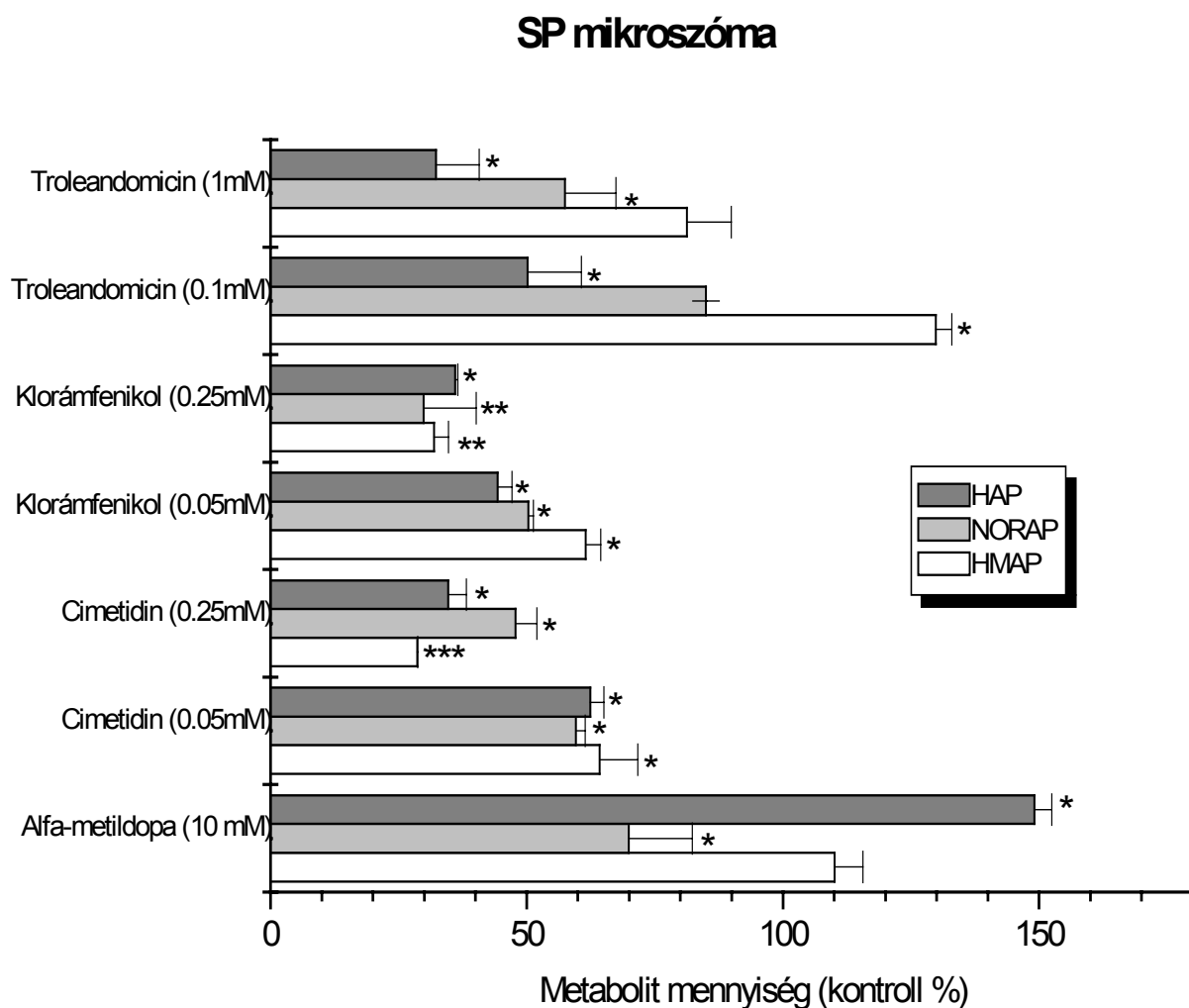
játszanak a NORAP és a HAP szintézisében PB indukció esetén. E következtetéshez figyelembe kell venni, hogy a kétféle mikroszóma CYP3A aktivitása azonos volt, míg a CYP2B aktivitás egy nagyságrenddel nagyobb a PB indukció hatására. Figyelembe kell venni továbbá azt is, hogy 0,05 mM Cim kevésbé csökkentette a NORAP és a HAP képződés sebességét PB indukció után.

8. ábra. Az antipirin metabolizmusa fenobarbitállal előkezelt állatokból származó mikroszóma esetén P450 enzimgátlók és az  $\alpha$ -metildopa jelenlétében



\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

9. ábra. Az antipirin metabolizmusa spironolaktonnal előkezelt állatokból származó mikroszóma esetén P450 enzimgátlók és az  $\alpha$ -metildopa jelenlétében



\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 7.1.1.5. Az $\alpha$ -metildopa hatása az antipirin metabolizmusra

A 7., 8., 9. ábrák alapján az is megállapítható, hogy az  $\alpha$ -metildopa szignifikánsan csak a NORAP mennyiségét csökkentette az indukált patkányokból származó mikroszóma frakciók esetén, ami valószínűleg a CYP3A enzim gátlására utal. A NORAP mennyiségének csökkentésén túl a HAP mennyiségét kb. másfélszeresére emelte mindhárom mikroszóma féleségben. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy az  $\alpha$ -metildopa gátolta a HAP továbbalakulását katalizáló enzimet.



*In vivo* a 4,4'-dihidroxi-antipirin szulfát konjugátumának keletkezését is kimutatták. A 4,4'-dihidroxi-antipirin a mikroszómális inkubálás körülményei között nem stabil, mert nem konjugálódhat.

Megállapíthatjuk tehát, hogy az  $\alpha$ -metildopa enzimgátló hatásán keresztül képes az antipirin metabolizmusának sebességét befolyásolni.

#### 7.1.1.6. Az antipirin metabolizmusának összefoglalása

A 2. táblázat adatai azt mutatják, hogy vizsgálataink alapján mely CYP enzimek játszanak szerepet az antipirin metabolizmusában. A konstitutív enzimek mellett jelentős az indukálható enzimek részvétele is. A konstitutív CYP2C11/C6 enzimek mindhárom metabolit képződését katalizálják, míg az indukálható CYP2B és 3A enzimek főleg a NORAP és a HAP előállításában vesznek részt. Az adatok alapján az antipirin metabolizmusa több enzimen keresztül is végbe mehet, ezért nem valószínű, hogy egy metabolikus út telítődése (enzimgátlás, enzim hiány vagy alacsony enzimaktivitás) miatt az anyag felhalmozódik a szervezetben. E jelenség magyarázhatja, hogy a súlyos kimenetelű gyógyszer kölcsönhatások előfordulása viszonylag ritka.

2. táblázat. Az antipirin metabolitokat képző citokróm P450 enzimek

	kezeletlen	PB	SP
<b>HMAP</b>	2C6, 2C11	2C6, 2C11	2C6, 2C11
<b>NORAP</b>	2C6, 2C11	2B, 2C6, 2C11, 3A	2C6, 2C11, 3A
<b>HAP</b>	2C6, 2C11	2B, 2C6, 2C11, 3A	2C6, 2C11,3A

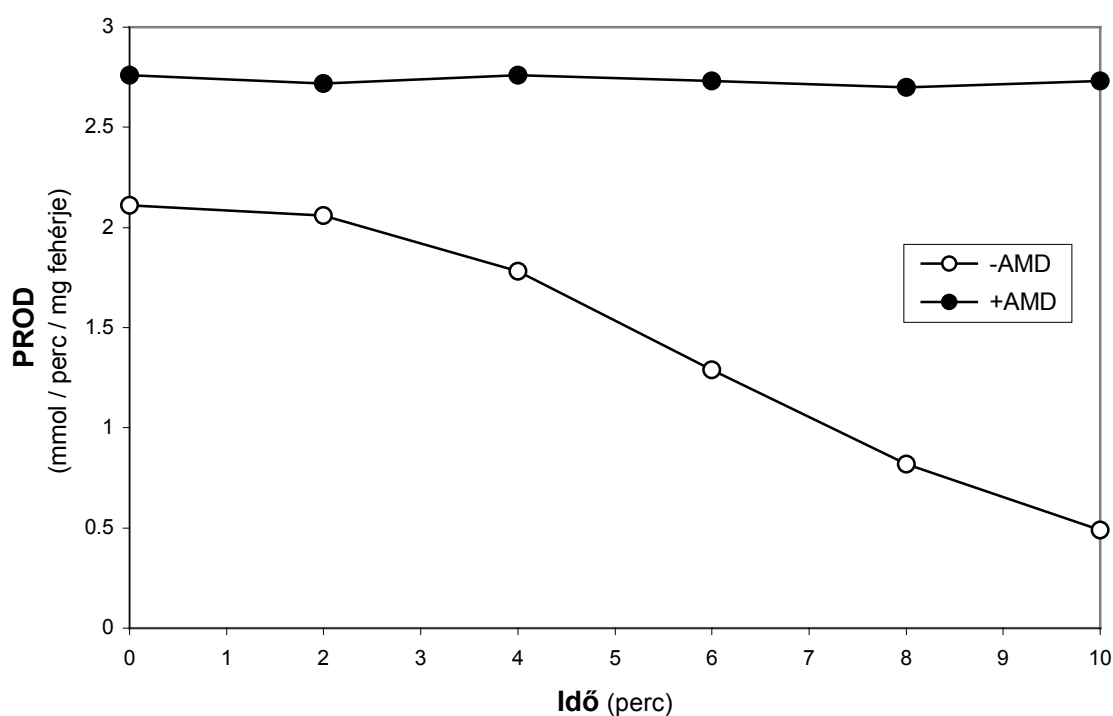
Az  $\alpha$ -metildopával végzett kísérleteink során nemcsak a molekula enzimgátló és metabolizmus sebességet befolyásoló hatását tanulmányoztuk, hanem az is kiderült, hogy képes gátolni a NADPH jelenlétében, szubsztrát hiányában bekövetkező enzimaktivitás csökkenést. Az erre vonatkozó eredményeket a 7.1.2. fejezet tartalmazza.

## 7.1.2. Az $\alpha$ -metildopa és a lipid peroxidáció kapcsolata

### 7.1.2.1. A NADPH jelenlétében végzett előinkubálás hatása a CYP enzimaktivitásra

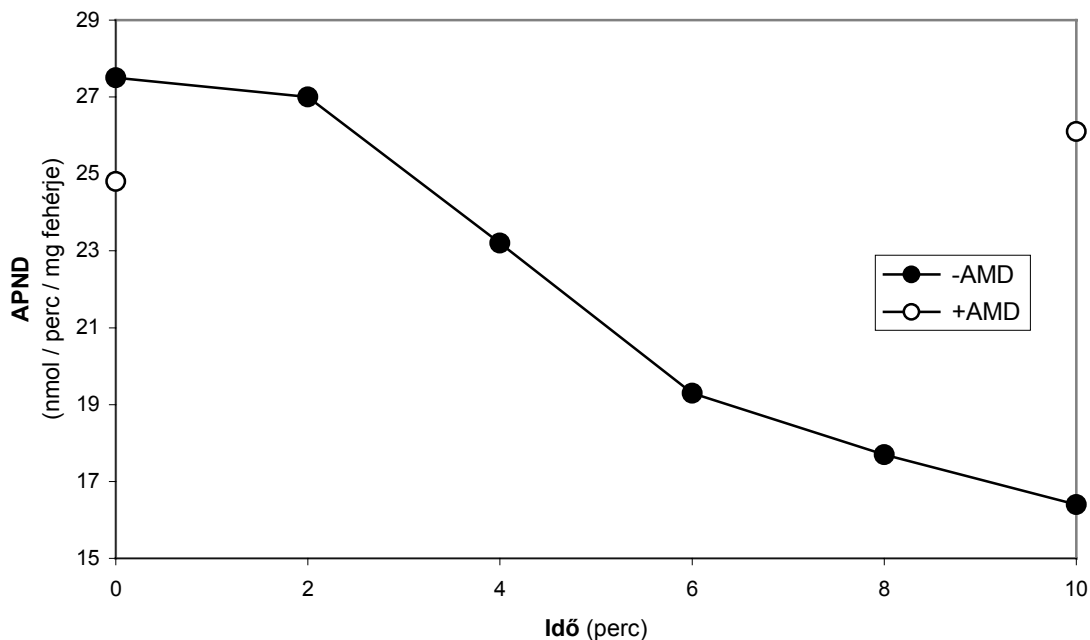
Ha a mikroszómát NADPH jelenlétében és szubsztrát hiányában előinkubáltuk, akkor az előinkubáció időtartamától függő enzimaktivitás csökkenést tapasztaltunk. Ez a csökkenés PROD esetében 70-80%, míg APND esetében 30-50% között változott (10. és 11. ábrák). 50  $\mu$ M  $\alpha$ -metildopa hozzáadása a reakcióelegyhez az enzimaktivitás csökkenés megszűnését eredményezte. Az előinkubálás után a szubsztráttal együtt adott  $\alpha$ -metildopa viszont nem befolyásolta az enzimaktivitás alakulását.

10. ábra A 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció csökkenése NADPH-val történő előinkubáció alatt  $\alpha$ -metildopa (AMD) jelenlétében és hiányában



Az ábra 2 független kísérlet adataiból származik, amelyeknél a megfelelő mérési pontok egyezése 84-93%.

**11. ábra Az aminopirin N-demetiláció csökkenése NADPH-val történő előinkubáció alatt  $\alpha$ -metildopa jelenlétében és hiányában**



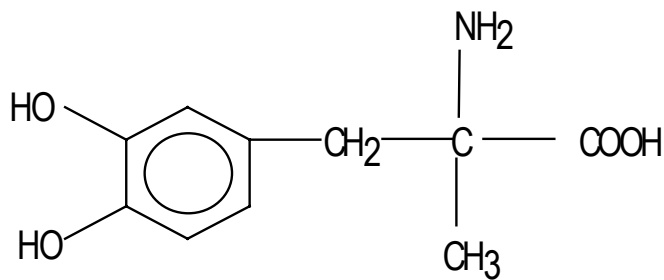
Az ábra 2 független kísérlet adataiból származik, amelyeknél a megfelelő mérési pontok egyezése 85-93%.

Az  $\alpha$ -metildopa koncentrációjának függvényében különbözőképpen viselkedett a PROD és az APND esetében. Míg a PROD reakciónál nem találtunk szignifikáns változást 0,01 és 2 mM között, addig az APND-t az AMD a mM-os koncentráció tartományban már gátolta (3. táblázat).

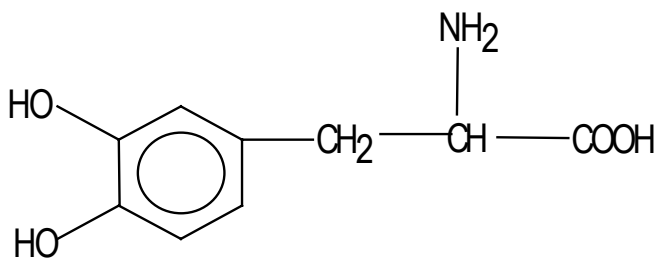
#### **7.1.2.2. Az $\alpha$ -metildopa szerkezeti analógjainak vizsgálata**

Azért, hogy eldönthessük, hogy az AMD mely funkciós csoportja vagy csoportjai felelősek a fent említett hatásokért a molekula szerkezeti analógjainak (L-dopa, dopamin, 3-O-metil dopamin) hatását is megvizsgáltuk (12. ábra).

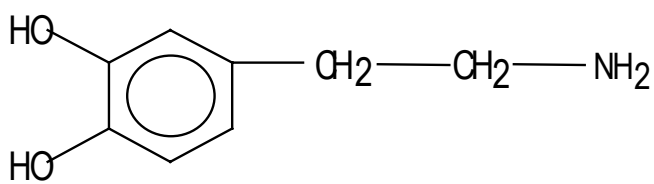
## 12 ábra Az $\alpha$ -metildopa és szerkezeti analógjai



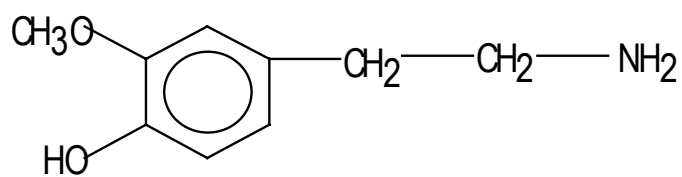
$\alpha$ -metildopa



L-dopa



Dopamin



3-O-metil-dopamin

3.táblázat A 7- pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció és az aminopirin N-demetiláció változása az  $\alpha$ -metildopa (AMD) koncentráció függvényében

AMD (mM)	7-Pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (nmol / perc / mg fehérje)		Aminopirin N-demetiláció (nmol / perc / mg fehérje)	
	Előinkubáció nélkül	10 perc előinkubáció	Előinkubáció nélkül	10 perc előinkubáció
	0,000	1,80 ± 0,28	0,58 ± 0,10	30,50 ± 0,71
0,002	2,13 ± 0,32	1,16 ± 0,17 <sup>a</sup>	ND	ND
0,005	2,06 ± 0,35	1,63 ± 0,07 <sup>a</sup>	ND	ND
0,010	2,26 ± 0,39	1,92 ± 0,04 <sup>a</sup>	ND	ND
0,050	2,12 ± 0,34	2,03 ± 0,35 <sup>a</sup>	26,02 ± 3,42	30,07 ± 2,73 <sup>a</sup>
0,500	2,08 ± 0,46	1,89 ± 0,28 <sup>a</sup>	22,67 ± 2,50 <sup>a</sup>	20,86 ± 1,01
1,000	2,23 ± 0,42	1,81 ± 0,32 <sup>a</sup>	22,35 ± 2,33 <sup>a</sup>	18,72 ± 0,21
2,000	2,12 ± 0,49	1,70 ± 0,21 <sup>a</sup>	17,85 ± 2,04*	15,57 ± 0,81 <sup>a</sup>

ND: nincs mérési adat

<sup>a</sup>: p<0,05 az AMD nélküli kontroll értékhez képest

4. táblázat. A 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (PROD) és az aminopirin N-demetiláció (APND) változása az  $\alpha$ -metildopa (AMD) és szerkezeti analógjainak jelenlétében

Enzim aktivitás	Kontroll	AMD	L-dopa	Dopamin	3-O-metil dopamin
(nmol / perc / mg fehérje)					
PROD					
(előinkubáció nélkül)	1,83 ± 0,08	2,52 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,02	1,65 ± 0,14
PROD					
(10 perc előinkubáció)	0,63 ± 0,06	2,41 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,08
APND					
(előinkubáció nélkül)	21,30 ± 0,49	14,08 ± 0,90 <sup>a</sup>	8,90 ± 0,49 <sup>a</sup>	5,84 ± 0,87 <sup>a</sup>	17,06 ± 1,92 <sup>a</sup>
APND					
(10 perc előinkubáció)	10,73 ± 0,60	8,61 ± 0,60 <sup>a</sup>	4,78 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,80 <sup>a</sup>	13,28 ± 1,76 <sup>a</sup>

AMD és analógjainak koncentrációja a PROD tesztnél 0,05 mM és az APND tesztnél 2 mM.

<sup>a</sup>: p<0,05 a katekol analógok nélküli kontroll értékhez képest

A hiányzó  $\alpha$ -helyzetű metil csoport (L-dopa) és az amino csoport jelenléte a karboxi csoport helyett (dopamin) nem befolyásolta a molekula PROD-ra gyakorolt védő hatását. Az aromás gyűrű 3-as pozíciójában lévő hidroxil csoportjának metilezése (3-O-metil-dopamin) viszont azt eredményezte, hogy a molekula teljesen elvesztette a PROD aktivitást védő hatását (4. táblázat).

Az APND esetén az AMD, az L-dopa és a dopamin már előinkubáció nélkül is gátolta az reakciót. A gátló hatás a 10 perces előinkubáció után még szembetűnőbb lett. A legnagyobb mértékben a dopamin csökkentette az enzimaktivitást, sokkal hatékonyabban mint az AMD. A 3-O-metil-dopamin nem befolyásolta az enzimaktivitást, sem az előinkubáció nélküli esetben, sem az előinkubáció során (4. táblázat).

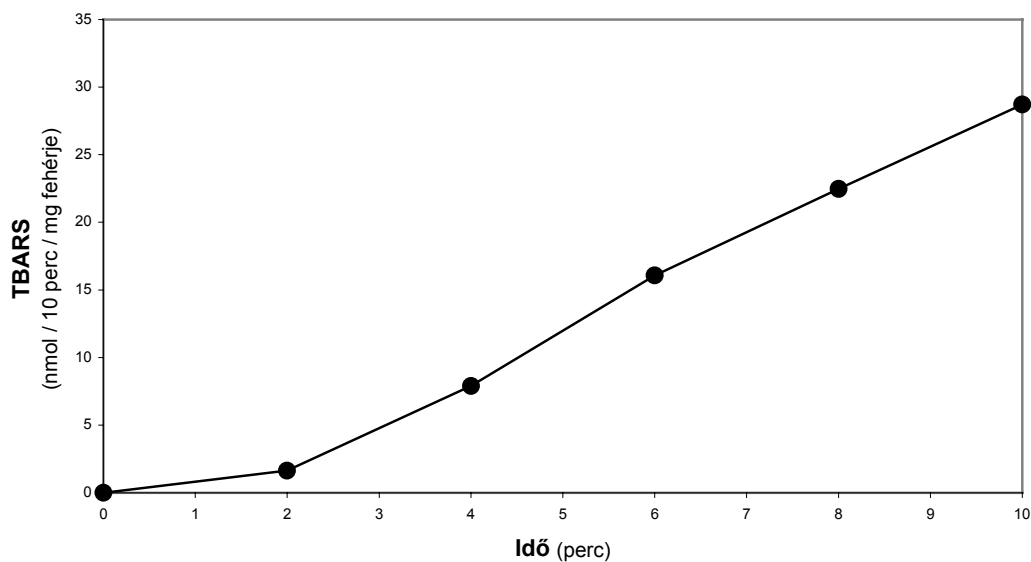
Az eredményből arra következtethetünk, hogy a gyűrű 3-as helyzetben lévő hidroxil csoportjának jelentős szerepe van a PROD aktivitás megőrzésében és az APND aktivitás gátlásában is.

#### **7.1.2.3. Az enzimaktivitás csökkenés és a lipid peroxidáció kapcsolata**

A lipid peroxidáció az emberi szervezetben egyes gyulladáisos, valamint rákos megbetegedések kialakulásában is szerepet játszik. Ezen folyamat tanulmányozása azért indokolt, mert egyes szerzők úgy találták, hogy a NADPH-val történő előinkubáció alatt bekövetkezett enzimaktivitás változásokért a lipid peroxidáció a felelős. A lipid peroxidációt vagy a citokróm P450 reduktáz egyedül (Pederson és munkatársai, 1973) vagy a citokróm P450 enzimmel együtt hozza létre (Ekström és Ingelman-Sundberg, 1984; Sevanian és munkatársai, 1990).

A mikroszóma NADPH jelenlétében történt előinkubálása jelentős TBA reaktív produktum képződést okozott, ami a lipid peroxidáció előrehaladását mutatta (13. ábra).

13. ábra A lipid peroxidáció időfüggése

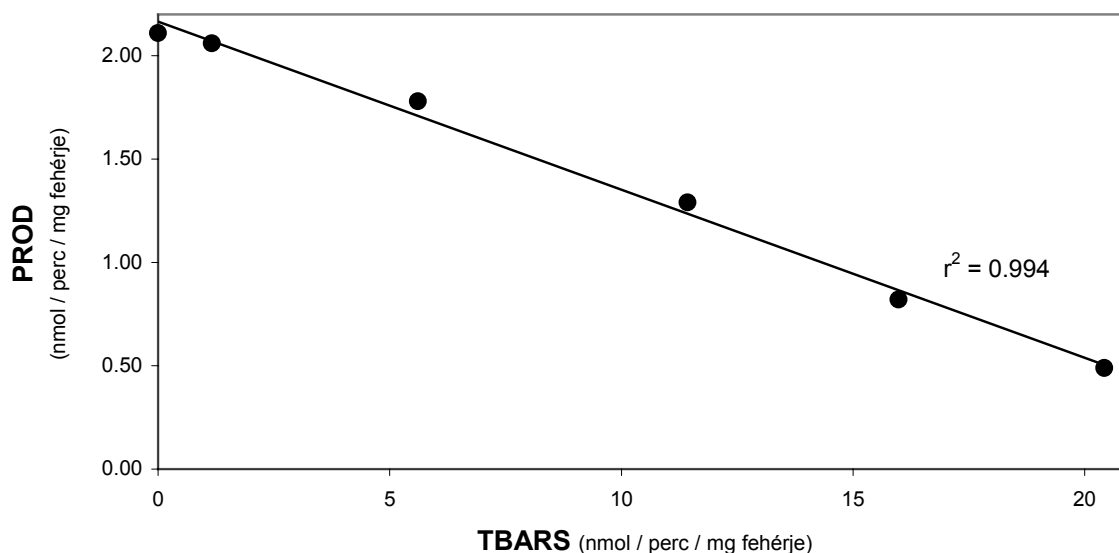


Az ábra 2 független kísérlet adataiból származik, amelyeknél a megfelelő mérési pontok egyezése 84-95%.

Szoros korrelációt találtunk mind a PROD ( $r^2=0,994$ ; 14. ábra) mind az APND ( $r^2=0,970$ ) aktivitás csökkenés és a lipid peroxidáció előrehaladása között.



14. ábra A 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (PROD) és a lipid peroxidáció közötti összefüggés



A 14. ábra a 10 és 13 ábrák transzformálásával jött létre.

#### 7.1.2.4. Az $\alpha$ -metildopa és szerkezeti analógjainak hatása a lipid peroxidációra

Amennyiben a lipid peroxidáció az a folyamat, amely a NADPH-val történő előinkubáció során a PROD és az APND aktivitás csökkenését okozza, akkor az AMD védő hatásának magyarázata az lehet, hogy képes gátolni a lipid peroxidációt. E feltételezés igazolására megvizsgáltuk, hogy az AMD és szerkezeti analógjai miként hatnak a lipid peroxidációra. Azt tapasztaltuk, hogy az L-dopa és a dopamin hasonlóan viselkedett mint az AMD - azaz csökkentették a lipid peroxidáció mértékét - míg a 3-O-metil dopamin, ami nem növelte a PROD aktivitást (4. táblázat) nem védett a lipid peroxidációtól sem (5. táblázat).

5. táblázat. Az  $\alpha$ -metildopa (AMD) és szerkezeti analógjainak hatása a lipid peroxidációra

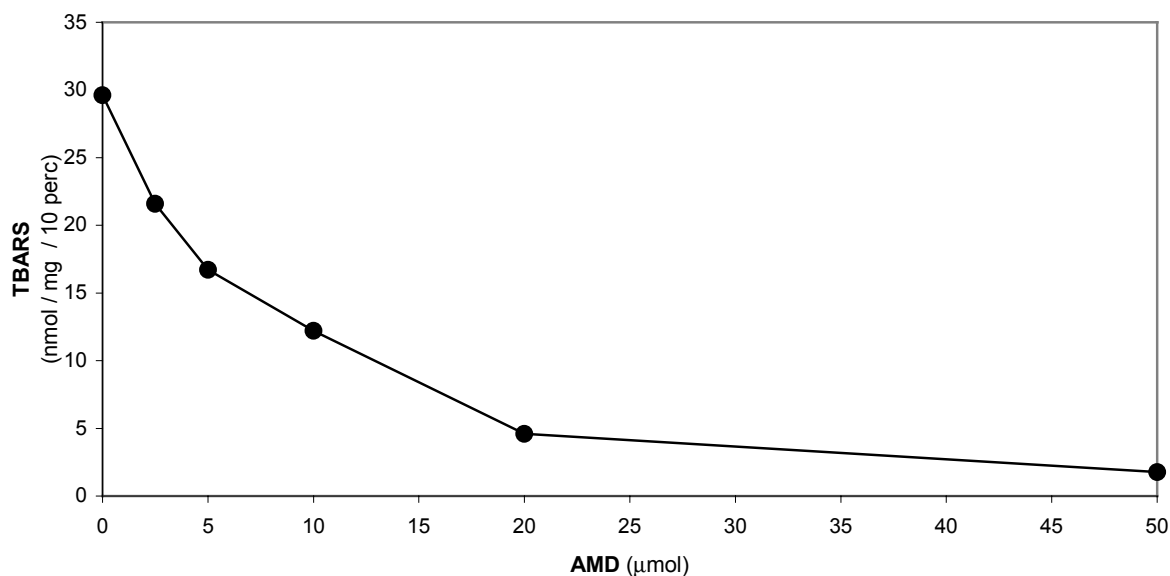
Kontroll	AMD	L-DOPA	Dopamin	3-OMe-Dopamin
TBA reaktív produktum (nmol / 10 perc / mg fehérje)				
27,51 $\pm$ 2,26	0,63 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	1,90 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	0,63 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	22,65 $\pm$ 2,04

Az alkalmazott koncentráció: 0,05 mM.

<sup>a</sup>: p<0,05 a katekol analógok nélküli kontroll értékhez képest

Az AMD antioxidáns tulajdonsága már 2,5  $\mu\text{M}$  koncentrációban jelentkezett (15. ábra).

15. ábra Lipid peroxidáció az  $\alpha$ -metildopa (AMD) koncentráció függvényében



Az ábra 2 független kísérlet adataiból származik, amelyeknél a megfelelő mérési pontok egyezése 82-97%.

Hasonlóan az irodalomban közölt adatokhoz (Melikian és munkatársai, 1990; Zhao és munkatársai, 1997, Mordente és munkatársai, 1998), ez az eredmény is alátámasztja azt, hogy a katekol származékok, valamint a hidrokinon és a kinon szerkezetű metabolitok hatékonyan gátolják a TBARS képződését.

#### 7.1.2.5. A citokróm P450 enzimek szerepe a lipid peroxidációban

A CYP2E1 enzimről már ismert, hogy NADPH jelenlétében és szubsztrát hiányában képes reaktív oxigén-féleségeket (szuperoxid aniont és hidrogén peroxidot) létrehozni (Ekström és Ingelman-Sundberg, 1989; Dai és munkatársai, 1993; Kukioka és Cederbaum, 1996; Sakurau és Cederbaum, 1998). Azért, hogy eldönthessük van-e még olyan citokróm P450 enzim, amelynek hasonló szerepe lehet a lipid peroxidáció elősegítésében, különféle P450 enzimgátlókat alkalmaztunk, hatásait a 6. táblázatban összegeztük.

A vizsgált gátlószerekre vonatkozóan a Rövidítések fejezetben feltüntettük, hogy az alkalmazott koncentrációban mely enzimet vagy enzimeket és milyen sorrendben gátolják.

A 3-amino-1,2,4, triazol esetében, ami CYP2E1 gátlószert, a feltevésünkkel összhangban álló jelenséget tapasztaltunk mind a mikroszómák NADPH-val történő előinkubálásakor mért PROD aktivitásnál mind a lipid peroxidációnál. A triazol 10 perces előinkubáció után a kontroll PROD aktivitás értékét 100%-al megnövelte, miközben a lipid peroxidációt 50%-al visszaszorította. A többi vizsgált enzimgátló sem a PROD aktivitást nem növelte sem a lipid peroxidációt nem befolyásolta.

Ez az eredmény is alátámasztja, hogy a CYP2E1 enzimnek szerepe van a lipid tartalmú membránok degradációjában.

#### 6. táblázat. Citokróm P-450 enzim gátlók hatása a 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkilációra és a lipid peroxidációra

	7-Pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (nmol / perc / mg fehérje)	TBA reaktív produktum (nmol / 10 perc / mg fehérje)
	10 perc előinkubáció	
Kontroll	0,59 ± 0,08	33,17 ± 2,58
ATZ (50 mM)	1,19 ± 0,21 <sup>a</sup>	15,88 ± 2,99 <sup>a</sup>
TAO (0,1 mM)	0,74 ± 0,04	34,71 ± 2,08
Cim (0,025mM)	0,54 ± 0,17	36,65 ± 2,42
KI (0,025 mM)	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	38,41 ± 3,44

<sup>a</sup>: p<0,05 a citokróm P450 enzimgátlók nélküli kontroll értékhez képest

#### 7.1.2.6. A vas-ion, az $\alpha$ -metildopa valamint együttadásuk hatása a 7-pentoxi-rezorufin O-dezalkilációra és a lipid peroxidációra

FeSO<sub>4</sub>-ot adva a reakció elegyhez, az nemcsak a lipid peroxidációt fokozta, hanem PROD aktivitás csökkenést is eredményezett. Az AMD kivédte a FeSO<sub>4</sub> mindkét hatását (7. táblázat). Ennek egyik magyarázata lehet, hogy az AMD kelát formában megköti a Fe<sup>3+</sup> ionokat (Stevens és Halpert, 1988; Campbell és munkatársai, 1990) ezzel gátolva a lipid peroxidáció iniciáló lépését, ami valószínűleg a Fe<sup>2+</sup> /Fe<sup>3+</sup> arányától függ (Minotti és Aust, 1992; Tang és munkatársai, 1997). A másik magyarázat, az lehet, hogy az AMD reakcióba lép reaktív oxigénfélésekkel, miközben kinonná vagy szemikinonná oxidálódik és ezzel megállítja a membrán lipidek degradációs folyamatát.

7. táblázat. A FeSO<sub>4</sub> és az AMD hatása a 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkilációra és a lipid peroxidációra

	Pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (nmol / perc / mg fehérje)		TBA reaktív produktum (nmol / 10 perc / mg fehérje)
	Előinkubáció nélkül	10 perc előinkubáció	
Kontroll	1,90 ± 0,15	0,79 ± 0,02	31,41 ± 1,72
FeSO <sub>4</sub> (20 μM)	1,51 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	52,49 ± 5,69 <sup>a</sup>
AMD (50 μM)	2,48 ± 0,35	2,20 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,12 ± 1,19 <sup>a</sup>
FeSO <sub>4</sub> + AMD	1,94 ± 0,41	1,66 ± 0,06 <sup>a, b</sup>	2,12 ± 0,88 <sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>: p<0,05 a kontroll értékhez képest

<sup>b</sup>: p<0,05 az AMD-t tartalmazó előinkubáció nélküli értékhez képest

<sup>c</sup>: p<0,05 a FeSO<sub>4</sub> tartalmazó előinkubáció nélküli értékhez képest

#### 7.1.2.7. Az aszkorbinsav, a glutation valamint az α-metildopával történő együttadásuk hatása a 7-pentoxirezorufin O-dezalkilációra

Abból a célból, hogy igazoljuk a 7.1.2.6. pontban felvetett lehetőséget, miszerint az AMD oxidációja szükséges a hatásának kifejtéséhez, aszkorbinsavat (AA) és glutationt (GSH) is alkalmaztunk a PROD aktivitás mérésénél. Amennyiben 10 perces, NADPH jelenlétében történő előinkubáció alatt 1 mM aszkorbinsav volt jelen a reakcióelegyben, akkor kb. fele akkora PROD aktivitást mértünk, mint az AMD-t tartalmazó reakcióelegyben. Ha az AMD-t együtt adtuk az AA-val, ugyanilyen mértékű aktivitás csökkenést tapasztaltunk a csak AMD-t tartalmazó reakcióelegyben található képest. Az aszkorbinsav – redukálószer lévén – részlegesen védte az enzimeket a lipid peroxidáció káros hatásától, de együtt adva az AMD-val megakadályozta annak oxidációját, így az AMD védő hatását nem tudta kifejteni (8. táblázat).

Az irodalomban közölt adatok szerint (van Ommen és munkatársai, 1986; Boatman és munkatársai, 2000) a GSH az oxidálódott katekol származékokkal konjugátumokat képez. A következő kísérleti elrendezésben (8. táblázat) a GSH és az AMD együttes hatását vizsgáltuk a PROD-ra. A GSH az alkalmazott koncentrációban (15 μM) a 10 perces NADPH jelenlétében történő előinkubáció után nem befolyásolta az enzimaktivitást, a kontroll értéket mértük. Az AMD 5 μM-ban már védett az enzimaktivitás csökkenéstől. Ha együtt alkalmaztuk a két vegyületet akkor a GSH jelentősen csökkentette az AMD enzimaktivitás védő hatását, a GSH és az AMD jelenlétében mért enzimaktivitási adatok közé eső értéket

kaptunk. Ez összhangban van azzal a lehetőséggel, hogy az aktiválódott katekol származék reagált a GSH-val.

**8. táblázat. Az aszkorbinsav (AA) a GSH és az  $\alpha$ -metildopa (AMD) hatása a 7-pentoxi-rezorufin-O-dezalkilációra**

	Pentoxi-rezorufin-O-dezalkiláció (nmol / perc / mg fehérje)	
	Előinkubáció nélkül	10 perc előinkubáció
Kontroll	2,39 ± 0,23	0,64 ± 0,18
AA (1 mM)	2,34 ± 0,33	1,76 ± 0,09 <sup>a</sup>
AMD (50 $\mu$ M)	3,00 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,27 <sup>a</sup>
AA + AMD	2,20 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,66 ± 0,38 <sup>a, b</sup>
Kontroll	2,05 ± 0,17	0,68 ± 0,11
GSH (15 $\mu$ M)	2,07 ± 0,10	0,81 ± 0,13
AMD (5 $\mu$ M)	2,06 ± 0,05	1,75 ± 0,11 <sup>a</sup>
GSH + AMD	2,10 ± 0,03	1,29 ± 0,18 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>:  $p < 0,05$  a kontroll értékhez képest

<sup>b</sup>:  $p < 0,05$  az AMD-t tartalmazó előinkubáció nélküli értékhez képest

#### 7.1.2.8. A glutation és az $\alpha$ -metildopa hatása az aminopirin N-demetilációra

Az APND-nál az AMD és szerkezeti analógjai (kivéve a 3-O-metil dopamint) a mM-os koncentráció tartományban gátolták az enzimaktivitást (4. táblázat). A következő kísérleti elrendezésben azt vizsgáltuk, hogy a GSH befolyásolja-e az AMD APND-ra gyakorolt hatását. (9. táblázat)

Abban az esetben, ha a 10 perces előinkubáció alatt GSH jelen volt a reakció elegyben, akkor az enzimaktivitás az előinkubáció nélküli kontroll értéket mutatta. A vizsgált katekol származékok pedig gátolták az APND-t: az AMD kb. 60%-ban, míg a dopamin kb. 90%-ban az előinkubáció nélkül nyert kontroll értékhez képest. A katekol származék és a GSH együttadása esetén a GSH csökkentette a katekol származék enzimaktivitás gátló hatását. Ennek lehetséges magyarázata, hogy versengés alakul ki a fehérjék és a GSH szulfhidril csoportjai között az aktiválódott katekol származékért, emiatt mérséklődik a katekol származékok enzimaktivitás gátló hatása. Az általunk tapasztalt jelenség összhangban van azzal, amit Dybing és munkatársai (1976) közöltek, akik a mikroszómához NADPH jelenlétében AMD-t adva a katekol származék kovalens kötődését észlelték a mikroszómális fehérjékhez.

9.táblázat. Az  $\alpha$ -metildopa (AMD), dopamin és GSH hatása az aminopirin N-demetilációra

	Aminopirin N-demetiláció (nmol / perc / mg fehérje)	
	Előinkubáció nélkül	10 perc előinkubációval
Kontroll	22,24 ± 1,40	11,35 ± 0,93
GSH (2 mM)	18,94 ± 1,17	19,64 ± 1,65
AMD (2 mM)	13,93 ± 0,80 <sup>a</sup>	9,12 ± 1,19 <sup>a</sup>
GSH + AMD	15,26 ± 1,74 <sup>a</sup>	13,57 ± 1,58 <sup>a, b</sup>
Kontroll	21,26 ± 0,49	10,73 ± 0,53
GSH (2 mM)	18,53 ± 1,01	19,08 ± 1,60
DOPAMIN (2 mM)	5,84 ± 0,87 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,80 <sup>a</sup>
GSH + DOPAMIN	10,11 ± 0,47 <sup>a</sup>	7,40 ± 1,49 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>: p<0,05 a kontroll értékhez képest

<sup>b</sup>: p<0,05 az catechol származékot tartalmazó előinkubáció nélküli értékhez képest

Azt, hogy az AMD a mM-os koncentráció tartományban ellentétes hatást gyakorolt a PROD és az APND aktivitásokra az magyarázhatja, hogy a fenti két reakcióban részt vevő enzimek különbözőképpen helyezkednek el a membránban, így az AMD kötődés hatékonysága is változik. Érdekességképpen említhető, hogy a glutation S-transzferáz esetében az aktiválódott AMD és az enzim reakciója nem aktivitás csökkenést, hanem fokozódott enzimaktivitást eredményezett (Balvers és munkatársai, 1992).

#### 7.1.2.9. A lipid peroxidációra vonatkozó kísérletek eredményeinek összefoglalása

A PROD és az APND aktivitás csökkenése a mikroszóma NADPH-val történő szubsztrát nélküli előinkubációja alatt szoros összefüggést mutat a lipid peroxidáció előrehaladtával. Az AMD már a mikromólos koncentráció tartományban gátolja a lipid peroxidációt. Az AMD lipid peroxidáció gátló hatásának egyik magyarázata, reakcióba lép a – többek között a citokróm P4502E1 enzim által létrehozott - reaktív oxigénfélésekkel, amelyek a lipid peroxidáció iniciációjáért felelősek. Az AMD kinonná vagy szemikinonná oxidálódik a reaktív oxigénfélésekkel, így védi a lipid membránt a degradációtól.

## II. *In vivo* farmakokinetikai paraméterek becslése *in vitro* nyert adatok alapján

### 7.2. A vinpocetin farmakokinetikájának vizsgálata

#### 7.2.1. A vinpocetin *in vivo* farmakokinetikai vizsgálatainak eredményei az irodalmi közlések alapján

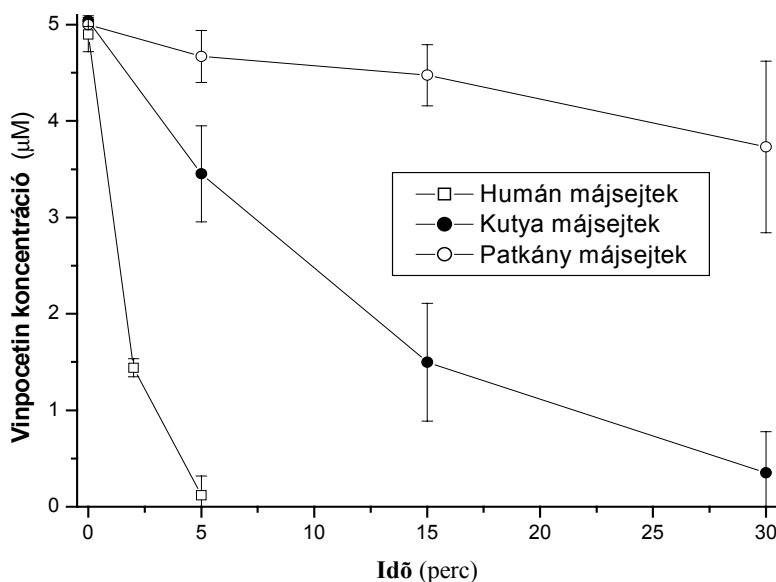
Munkánk során elvégeztük az *in vitro* metabolizmus vizsgálatokat és az így nyert adatokból becsültük az *in vivo* kinetikai paramétereket. Az adatok feldolgozásakor a clearance értéken túl a biológiai hasznosíthatóságot is becsültük. Ezeket a paramétereket a jelenleg is elterjedt „well-stirred” modell segítségével számoltuk ki. A gyógyszer már korábban közölt *in vivo* vizsgálatainak irodalmi adatait (Vereczkey és munkatársai 1979 a, b, Szelezky és Vereczkey 1986, Grandt és munkatársai 1989, Yao és munkatársai 1994) használtuk fel a becslésünk jóságának ellenőrzésére.

A vinpocetin minden vizsgált fajban metabolizálódik, az anyag változatlan formában nem ürül a szervezetből. A metabolizmus fő útja a hidrolízis, melynek terméke az apovinkaminsav. Annak ellenére, hogy a gyógyszer minden fajban teljes mértékben metabolizálódik, a biológia hasznosíthatóságban nagy különbségeket találtak. A biológiai hasznosíthatóság patkány esetében  $54,54 \pm 3,77\%$  (Yao és munkatársai, 1994),  $52\%$  (Vereczkey és munkatársai, 1979 a); kutya esetében  $21,5 \pm 19,3\%$  (Polgár és Vereczkey, 1984) ember esetében pedig  $6,2 \pm 1,9\%$  (Miskolczi és munkatársai, 1990). Azért, hogy ezt a látszólagos ellentmondást tisztázzuk megvizsgáltuk a vegyület metabolizmusát primer májsejtszuszpenzióban, majd különféle szervekből készített homogenizátumokban is.

#### 7.2.2. A vinpocetin metabolizmusának vizsgálata májsejt szuszpenzióban

A vinpocetin bomlását ember (n=3), kutya (n=2) és patkány (n=4) májból származó májsejt szuszpenzióban tanulmányoztuk. Az anyag metabolizmusában a fajok között sebesség különbséget tapasztaltuk. A vinpocetin koncentrációjának időbeli csökkenése emberi májsejt szuszpenzióban volt a leggyorsabban, míg a patkány májsejt szuszpenzióban a leglassabb (16. ábra).

16. ábra A vinpocetin koncentrációjának változása az időben patkány, kutya és humán májsejtszuspenzióban.



Vinpocetin koncentráció: 5 µM, sejtdenzitás:  $2 \times 10^6$  sejt/ml.

Vizsgálataink során a 6.11.3. pontban megadott módszer szerint HPLC alkalmazásával ellenőriztük a keletkezett metabolitok mennyiségét is. Minden fajban az apovinkaminsav volt a fő metabolit, amelynek keletkezése szoros összefüggésben állt a vinpocetin fogyasztásával.

### 7.2.3. A „well stirred” modell alkalmazása a vinpocetin *in vivo* kinetikai paramétereinek becslésére a fehérjekötődés figyelembe vételével

Mindhárom vizsgált faj esetében a vinpocetin fogyási sebességének adataiból a „well-stirred” farmakokinetikai modell felhasználásával *in vivo* kinetikai paramétereket becsültünk. Mivel ismert, hogy patkányban a szérum is bontja a vinpocetint, ezért a vizsgálatot a különböző fajokból nyert szérumokra is kiterjesztettük. A 10. táblázatban a mérési adatokból becsült intrinsic Cl ( $Cl_{int}$ ) adatok szerepelnek. Megállapítható, hogy a patkány szérum  $Cl_{int}$  értéke meglehetősen kicsi, az anyag metabolizmusában való részvétele elhanyagolhatónak látszik.



A 11. táblázatban a 10. táblázat  $Cl_{int}$  értékeiből számolt *in vivo*  $Cl$  értékeket tüntettük fel három, nagyságrendileg különböző szabad gyógyszerkoncentráció ( $f_u$ ) figyelembevételével:

1.  $f_u=1$ : A gyógyszermolekula nem kötődik fehérjékhez, a teljes gyógyszer mennyiség hozzáférhető a metabolizáló enzimek számára.
2.  $f_u=0,1$  A gyógyszer 90%-ban kötődik fehérjékhez
3.  $f_u=0,01$  A molekula 99%-ban kötődik a fehérjékhez

A 11. táblázat adatai azt mutatják, hogy ember és kutya esetében az *in vitro* májsejt szuszpenzióval végzett vizsgálatok eredményei alapján akkor becsültük jól az *in vivo* kinetikai paramétereket - összehasonlítva az *in vivo* mért értékekkel - ha nem vettük figyelembe a fehérjekötődés mértékét. Amíg patkány májsejt kultúrában az *in vivo* clearance értéket meglehetősen alulbecsültük, addig a becsült biológiai hasznosíthatóság jól közelítette a mért értéket (14. táblázat). Ennek oka, hogy a biológiai hasznosíthatósághoz az intrinsic clearance értéket használjuk, amely patkány esetében a máj vérátáramlási sebességéhez közeli érték.

Azért hogy kiderítsük, hogy patkány esetében miért becsültük alá a vizsgálatainkban az *in vivo*  $Cl$  értéket tovább tanulmányoztuk a metabolizmus útját, azt feltételezve, hogy esetleg más szervek is részt vesznek az anyag bontásában. Ezért kiegészítettük a 10. táblázatot a patkányból származó különböző szervhomogenizátumok vizsgálatának tájékoztató adataival. Az eredményeket a 12. táblázat mutatja, amiből megállapítható, hogy a vinpocetin metabolizmusa patkányban nemcsak a májban megy végbe, hanem igen jelentős szerepe van a veséknek is. Az anyag a tüdőben és a vékonybél mucosa-ban is bomlik, míg az izomban nem. A teljes máj homogenizátum ugyanolyan mértékben bontja a vinpocetint, mint a primer májsejt szuszpenzió. A teljes metabolizmusban a szérum csak igen jelentéktelen szerepet játszik, a metabolizmus főleg a májban és a vesékben megy végbe.





10. táblázat A vinpocetin becsült intrinsic clearance értéke patkányban, kutyaiban és emberben

Faj	Cl <i>in vitro</i> <sup>a</sup>	Cl <i>in vitro</i> <sup>b</sup>	Cl int <sup>c</sup> (teljes szerv)
<b>patkány</b>			
májsejt	0,0103 ± 0,0087	0,695 ± 0,586	26,28 ± 22,15
szérum	0,0054 ± 0,00065	0,0054 ± 0,00065	0,24 ± 0,029
<b>kutya</b>			
májsejt	0,067 ± 0,0062	4,53 ± 0,415	180,0 ± 16,49
szérum	nincs aktivitás		
<b>ember</b>			
májsejt	0,52 ± 0,14	35,42 ± 9,637	839,8 ± 228,5
szérum	nincs aktivitás		

<sup>a</sup> (ml / perc / 2x10<sup>6</sup> sejt) májsejt esetében, (ml / perc) szérum esetében

<sup>b</sup> (ml / perc / g szövet)

<sup>c</sup> (ml / perc / kg)

11. táblázat A vinpocetin becsült *in vivo* plazma clearance értéke patkány, kutya és ember májsejtszuszpenzióval végzett kísérletek alapján.

Faj	Cl <i>in vivo</i> becsült <sup>a</sup> fu =1	Cl <i>in vivo</i> becsült <sup>a</sup> fu =0,1	Cl <i>in vivo</i> becsült <sup>a</sup> fu =0,01	Cl <i>in vivo</i> mért <sup>a</sup>
<b>patkány</b>				
májsejt	11,43 ± 5,61	1,553 ± 1,239	0,164 ± 0,138	33 <sup>b</sup> ; 48,2 ± 6,2 <sup>c</sup>
<b>kutya</b>				
májsejt	22,20 ± 0,40	8,113 ± 0,525	1,105 ± 0,097	21,7 ± 11,8 <sup>d</sup>
<b>ember</b>				
májsejt	10,58 ± 0,08	8,754 ± 0,528	3,282 ± 0,660	13,16 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> (ml / perc / kg)

<sup>b</sup> Vereczkey és munkatársai (1979)

<sup>c</sup> Yao és munkatársai (1994)

<sup>d</sup> Szeleczy és Vereczkey (1986)

<sup>e</sup> Vereczkey és munkatársai (1979)

12. táblázat A vinpocetin becsült intrinsic clearance értéke patkány májsejtekben és szervhomogenizátumokban

Szerv	Cl <i>in vitro</i> <sup>a</sup>	Cl <i>in vitro</i> <sup>b</sup>	Cl int <sup>c</sup> (teljes szerv)
májsejt	0,0103 ± 0,0087	0,695 ± 0,586	26,28 ± 22,15
máj homogenizátum	0,0176	0,587	24,41
tüdő homogenizátum	0,0076	0,335	1,52
vese homogenizátum	0,0540	1,727	12,09
vékonybél mucosa	0,0118	0,433	1,73
izom homogenizátum	nincs aktivitás		
szérum	0,0054 ± 0,00065	0,0054 ± 0,00065	0,24 ± 0,029

<sup>a</sup> (ml / perc / 2x10<sup>6</sup> sejt) májsejt esetében, (ml / perc) szérum és homogenizátum esetében

<sup>b</sup> (ml / perc / g szövet)

<sup>c</sup> (ml / perc / kg)



A vinpocetin bontásáért felelős karboxil-észteráz (E.C. 3.1.1.1) megtalálható a kutya, az emberi és a patkány májban, valamint a patkány tüdő alveolusok sejtjeiben, a vékony és vastagbélben és a vese tubulusaiban (Morgan és munkatársai, 1994; Nikiado és munkatársai, 1991; Sato és Hosokawa, 1995; Sone és munkatársai, 1994). A 12. táblázatban összegzett adatok jó egyezést mutatnak a fent említett irodalmi eredményekkel.

#### 7.2.4. A vinpocetin metabolizmus vizsgálata májsejt frakciókkal

A 13. táblázat szemlélteti, hogy a májsejten belül milyen sejtfrakciók felelősek a molekula metabolizmusáért.

13. táblázat A májsejt frakciók aktivitása patkány, kutya és ember esetében

Faj	CI in vitro <sup>a</sup>	CI in vitro <sup>b</sup> (1 g máj)
<b>patkány</b>		
májsejt	0,0103 ± 0,0087	0,695 ± 0,586
mikroszóma	0,0041 ± 0,00025	0,185 ± 0,011
10000 x g üledék	0,000805	0,123
citoszol	nincs aktivitás	
<b>kutya</b>		
májsejt	0,067 ± 0,0062	4,530 ± 0,415
mikroszóma	0,011 ± 0,00056	0,500 ± 0,026
citoszol	0,0164	3,220
<b>humán</b>		
májsejt	0,520 ± 0,140	35,10 ± 9,637
mikroszóma	0,0393 ± 0,0298	1,766 ± 1,340
citoszol	0,0425	35,85

<sup>a</sup> (ml / perc / mg fehérje), májsejt esetén (ml / perc / 2x10<sup>6</sup> sejt)

<sup>b</sup> (ml / perc / g máj)

Kutya és emberi májmintákból származó sejtfrakciók esetében az aktivitás a citoszolban található, míg patkány esetén a mikroszómában és a 10000 x g üledékben, azaz a sejtmagban és a mitokondriális frakciókban (Miyazawa és munkatársai, 1985). Az irodalomban közölt adatok igazolják, hogy a szérumban és a májban talált aktivitások különbsége patkány esetében abból ered (10. táblázat), hogy a reakciót a szérumban más észteráz katalizálja, mint a májban (Nousiainen és Torronen, 1984). Ember esetében az észteráz aktivitást ugyanúgy a citoszol frakcióban találtuk meg, mint ahogyan Klengest és

munkatársai (1998). Az emberi citoszol és mikroszóma frakció közötti aktivitás különbséget Williams és munkatársai (1989) azzal magyarázták, hogy ebben az esetben is két különböző enzim katalizálja a reakciót. Ugyanígy két különböző észterázt mutattak ki az emberi máj és szérum esetében is (Tsujita és Okunda, 1983), és ez magyarázhatja azt, hogy az emberi szérum vizsgálatokor nem tapasztaltunk anyagbomlást.

### 7.2.5. A fehérjekötődések figyelembe vétele a biológiai hasznosíthatóság becslésekor

Az irodalmi adatok szerint a vinpocetin igen nagy mértékben kötődik plazmafehérjékhez, (kutya esetében kb. 97%, embernél kb. 90%; Szeleczy és Vereczkey, 1984; Benakis, 1983). Ezért a becslési eljárásaink során megvizsgáltuk a biológiai hasznosíthatóság alakulását 0, 90 és 99%-os fehérjekötődést feltételezve. A biológiai hasznosíthatóság becsült értékeit a 14. táblázatban összegeztük.

14. táblázat A becsült és mért *in vivo* biológiai hasznosíthatóság patkány, kutya és ember esetében három szabad gyógyszerkoncentráció figyelembevételével

Faj	Becsült <i>in vivo</i> biológiai hasznosíthatóság <sup>a</sup>			Mért <i>in vivo</i> biológiai hasznosíthatóság <sup>a</sup>
	fu=1	fu=0,1	fu=0,01	
<b>patkány</b>	45,61 ± 9,35	60,41 ± 2,26	62,73 ± 0,23	52 <sup>b</sup> ; 54,54 ± 3,77 <sup>c</sup>
<b>kutya</b>	12,38 ± 0,91	45,13 ± 1,22	61,43 ± 0,23	21,5 ± 19,3 <sup>d</sup>
<b>ember</b>	1,34 ± 0,42	10,92 ± 2,78	39,72 ± 3,48	6,7 <sup>e</sup> ; 6,2 ± 1,9 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> (%)

<sup>b</sup> Vereczkey és munkatársai (1979 a)

<sup>c</sup> Yao és munkatársai (1994)

<sup>d</sup> Polgár és Vereczkey (1984)

<sup>e</sup> Grandt és munkatársai (1989)

<sup>f</sup> Miskolczi és munkatársai (1990)

A 14. táblázat becsült adatait összevetve az *in vivo* mért biológiai hasznosíthatóságokkal látható, hogy akkor kapjuk az *in vivo* mért értékhez legjobban közelítő kinetikai paramétert, ha nem számolunk a fehérje kötődéssel. Ennek a jelenségnek az lehet a magyarázata, hogy annak ellenére, hogy a molekula igen nagy mértékben kötődik a



plazmafehérjékhez (Szeleczy és Vereczkey, 1986; Benakis, 1983), onnan pillanatszerűen leválhat, így hozzáférhetővé válik a metabolizmusban résztvevő enzimek számára.

#### **7.2.6. A vinpocetinre vonatkozó *in vivo* kinetikai paraméter becslésének összefoglalása**

A vinpocetin metabolizmus vizsgálatának során a tanulmányozott fajok között több különbséget találtunk. A kutya és a humán májsejtszuspenzióval végzett kísérletekből meglehetősen pontosan tudunk következtetni a molekula *in vivo* viselkedésére, míg patkány esetében alulbecsültük a clearance értéket. Ennek oka az, hogy az utóbbi fajban a metabolizmus nemcsak a májban megy végbe, hanem igen jelentős szerepet játszanak még a vesék is. Ezen szervek mellett kisebb mértékben még más szövetek: a tüdő, a vékonybél mucosa és a szérum is részt vesz a vinpocetin bontásában. A kutya és az emberi májsejtekből származó sejtfrakciókat vizsgálva megállapítható, hogy az aktivitás a citoszolban van, míg patkány esetében a mikroszómában és a 10000 x g üledékben, azaz a mikroszómális és a mitokondriális frakcióban. A becslési eljárás során akkor közelítjük meg a legjobban az *in vivo* clearance értéket és a biológiai hasznosíthatóságot, ha nem számolunk a molekula fehérjekötődésével.

## **8. Összefoglalás**

Az *in vitro* vizsgálatok jelentősége a modern gyógyszerkutatásban és fejlesztésben egyre nő. Munkánk során egyrészt metabolizmus vizsgálat segítségével az  $\alpha$ -metildopa *in vitro* tesztrendszerben kifejtett hatásait tanulmányoztuk, másrészt az *in vitro* adatokból becsült *in vivo* farmakokinetikai paraméterek és az irodalomban található *in vivo* mért adatok korrelációját vizsgáltuk.

1. Az antipirin (AP) metabolizmusát patkány máj mikroszómában kezeletlen, fenobarbitállal és spironolaktonnal előkezelt állatok májából származó mikroszóma frakcióban tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy kezeletlen állatok esetén az AP oxidációjában a konstitutív CYP2C6/C11 enzimek vesznek részt, míg az indukált állatokból származó mikroszóma frakciókban az indukált enzimeknek is jelentős szerepük van az anyag metabolizmusában. Így a fenobarbitál indukció eredményeképpen a CYP2B és 3A enzimek, míg a spironolakton előkezelés hatására a CYP3A enzimek szerepe állapítható meg.
2. Az egyes enzimek szerepének tisztázása érdekében specifikus P450 enzimgátlókat (troleandomicint, klorámfenikolt, cimetidint) és  $\alpha$ -metildopát alkalmaztuk.

A troleandomicin gátolta a norantipirin és a 4-hidroxiantipirin képződését az indukált állatokból származó mikroszóma frakciókban, alátámasztva a CYP3A szerepét e két metabolit képzésében, valamint utalva arra is, hogy kezeletlen állatokban a CYP3A enzim szerepe elhanyagolható.

A cimetidin, amely kis koncentrációban (0,05 mM) irodalmi adatok alapján csak a konstitutív CYP2C6/C11 enzimeket gátolja, mindhárom vizsgált metabolit mennyiségét csökkentette, ami arra utal, hogy ezen enzimek mindhárom metabolit képzésében részt vesznek. A magasabb koncentráció tartományban (0,25 mM) végzett kísérletek szerint a norantipirin képződését szignifikánsan nagyobb mértékben befolyásolta a fenobarbitállal előkezelt állatok májából származó mikroszóma frakcióban, mint a spironolaktonnal előkezelt állatok esetén, alátámasztva a CYP2B enzimek szerepét.

A klorámfenikol mindhárom metabolit mennyiségét csökkentette minden vizsgált mikroszóma frakció esetén, mert gátolta a CYP2B, 2C11 és 3A enzimeket.

Az  $\alpha$ -metildopáról megállapítottuk, hogy enzimgátló hatása révén képes az AP metabolizmusának sebességét befolyásolni. A molekula valószínűleg gátolja a 4,4'-dihidroxiantipirin képződését, ami a 4-hidroxiantipirin felhalmozódását eredményezte a rendszerben.

3. Megállapítottuk, hogy az AP több enzimen keresztül metabolizálódik, így egyetlen enzim gátlása nem okozhatja az anyavegyület vagy az abból származó metabolit felhalmozódását a szervezetben.
4. A 7-pentoxirezorufin-O-dezalkiláz és az aminopirin N-demetiláz aktivitás csökkenése és a lipid peroxidáció előrehaladása között szoros összefüggést tapasztaltunk. Valószínűsíthető, hogy a két enzimaktivitás eltérő mértékű csökkenése, azaz a lipid peroxidációra való érzékenység között tapasztalható különbségek az enzimek membránban való különböző elhelyezkedésével magyarázhatók.
5. Az  $\alpha$ -metildopa már a mikromólos koncentráció tartományban képes volt gátolni a lipid peroxidációt. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy az  $\alpha$ -metildopa reakcióba lép azokkal a reaktív oxigénfélésekkel, amelyek a lipid peroxidációért felelősek. A vegyület kinonná vagy szemikinonná oxidálódik a reaktív oxigénfélésekkel, így védi a membránt a degradációtól.
6. Az *in vitro* kísérletekből *in vivo* farmakokinetikai paraméterekre történő becslést (clearance, biológiai hasznosíthatóság) a vinpocetin esetében végeztük el 3 különböző fajból származó májsejt szuszpenzióval és különféle májsejt frakciókkal. A kutya és a humán májsejtsuszpenzióval végzett kísérletekből meglehetősen pontosan tudtunk következtetni a molekula *in vivo* viselkedésére, míg patkány esetében alulbecsültük a clearance értéket. Ennek oka az, hogy az utóbbi fajban a metabolizmus nemcsak a májban megy végbe, hanem igen jelentős szerepet játszanak még a vesék is. Ezen

szervek mellett kisebb mértékben még más szövetek: a tüdő, a vékonybél mucosa és a szérum is részt vesz a vinpocetin bontásában.

7. A kutya és az emberi májsejtekből származó sejtfrakciókat vizsgálva megállapítható, hogy az aktivitás a citoszolban van, míg patkány esetében a mikroszómában és a 10000 x g üledékben.
8. A becslési eljárás során akkor közelítjük meg a legjobban az *in vivo* clearance értéket és a biológiai hasznosíthatóságot, ha nem számolunk a molekula fehérjekötődésével.

## **9.Köszönetnyilvánítás**

Disszertációm az MTA Kémiai Kutatóközpont Kémiai Intézetében készült. Köszönettel tartozom az Intézetnek, hogy a ösztöndíjamat támogatta és a kutatói munkámat lehetővé tette.

Személy szerint köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Vereczkey Lászlónak, aki a téma iránt felkeltette az érdeklődésemet és munkámat szakmailag irányította. Köszönettel tartozom még közvetlen kolléganőmnek dr. Veres Zsuzsának, aki az Intézetben eltöltött 3 év alatt mindig lelkiismeretesen és odaadóan segített. A munkám során felmerülő problémák megoldásában mind szakmailag, mind emberileg támogatott. Segítsége nélkül a disszertációm nem készülhetett volna el.

Végül szeretném megköszönni a szüleimnek, hogy tanulmányaimat és terveimet mindvégig támogatták, hogy a segítségükkel az álmaimat a realitások talajára hozhattam.

## **10. Irodalomjegyzék**

- Adesnik, M., Bar-Nun, S., Mashio, F., Zunich, M., Lippman, A., Bard, E. (1981) Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J. Biol. Chem.* **256**: 10340-45.
- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Polozova, N. I., Kuprianova, N. S., Brodskii, A. V., Ostrachovitch, E. A., Korkina, L. G. (1993) Is superoxide an initiator of microsomal lipid peroxidation? *Arch. Biochem. Biophys.* **302**: 200-205.
- Alvares, A. P., Schilling, G., Levin, W., Kuntzman, R. (1967) Studies of the induction of the CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholantrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 521-525.
- Atchison, M., Adesnik, M. (1983) A cytochrome P-450 multigene family. Characterization of a gene activated by phenobarbital administration. *J. Biol. Chem.* **258**: 11285-95.
- Axelrod, J. The enzymatic deamination of amphetamine (Benzedrine). (1955) *J. Biol. Chem.* **214**: 753-763.
- Balvers, W. G., Boersma, M. G., Veeger, C., and Rietjens, I. M. C. M. (1992) Differential cumene hydroperoxide sensitivity of cytochrome P-450 enzymes IA1 and IIB1 determined by their way of membrane incorporation. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**: 179-187.
- Battion, J-P., Fontecave, M., Jaoen, M., Mansuy, D. (1991) Vitamin E derivatives as new potent inhibitors of microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 1103-1108.
- Bayliss, M. K., Skett, P. (1996). In Human Cell Culture Protocols (G.E. Jones ed) Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 369-389.
- Benakis, A.: (1983) Pharmacokinetics study of Cavinton in humans. RGD: 28154.
- Boatman, R. J., English, J. C., Perry, L. G., Fiorica, L. A. (2000) Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 853-860.
- Brown, R. R., Miller, J. A., Miller, E. C. (1954) The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **209**: 211.
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *in* Methods in Enzymology (Fleischer, S., and Packer, L., Eds.), Vol. 52, pp 302-310, Academic Press, New York.

- Burke, M. D., Thompson, S., Elcombe, C. R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R. T. (1985) Etoxy-, pentoxy- and benzoxyloxphenoxazone and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 3337-3345.
- Buters, J. T. M., Reichen, J. (1990) Sex difference in antipyrine 3-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 771-777
- Buters, J. T. M., Zysset, T., Reichen, J. (1993) Metabolism of antipyrine in vivo in two rat models of liver cirrhosis. *Biochem. Pharmacol.* **46**: 983-991
- Chang, T., Levine, M., Bellward, G. D. (1992) Selective inhibition of rat hepatic microsomal cytochrome P-450. II. Effect of the in vitro administration of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 1450-1455
- Campbell, N. R. C., Campbell, R. R. A., Hasinoff, B. B. (1990) Ferrous sulfate reduces methyl dopa absorption: methyl dopa: iron complex formation as a likely mechanism. *Clin. Invest. Med.* **6**: 329-332.
- Chou, R. C., Nick, S., Morgenroth, B., Lausecker, B., Fischer, G. (2000) Integrated prediction of concentration-time profile in man following oral dosing. DMW / ISSX Meeting 2000, St Andrews, Scotland.
- Conney, A. H., Miller, E. C., Miller, J. A. (1957) Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *J. Biol. Chem.* **228**: 753-755.
- Conney, A. H. (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacolog. Rev.* **19**: 317-320.
- Conney, A. H., Levin, W., Jacobson, M., Kuntzman, R. (1969) Specificity in the regulation of the 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$  and 16 $\alpha$ -hydroxylation of testosterone by rat liver *Microsomes and Drug Oxidations*. Gillette, J., Conney, A. H., Cosmides, G. J., Estabrook, R. W., Fouts, J. R., and Mannering, G. J., Eds. Academic Press, New York, 279-285.
- Cooper, D. Y., Estabrook, R. W., Rosenthal, O. (1963) The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J. Biol. Chem.* **238**: 1320-1322.
- Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R. W. (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system. *Science* **147**: 400-402.

- Cooper, D. Y., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R. W. (1965) Spectral and kinetic studies of microsomal pigments, in *Oxidases and Related Redox System*. Vol.2, King, T. E., Mason, H. S. and Morrison, M., Eds. John Wiley & Sons, New York, . 838-855.
- Dai, Y., Rashba-Step, J., Cederbaum, A. I. (1993) Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterisation of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry* **32**: 6928-6937.
- Danhof, M., Krom, D. P., Bremier, D. D. (1979) Studies on the different metabolic pathways of antipyrine in rats: Influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treatment. *Xenobiotica*. **9**: 695-702
- Dybing, E., Nelson, S. D., Mitchell, J. R., Sasame, H. A., Gillette, J. R. (1976) Oxidation of  $\alpha$ -methyldopa and other catechols by cytochrome P-450-generated superoxide anion: possible mechanism of methyldopa hepatitis. *Mol. Pharmacol.* **12**: 911-920.
- Ekström, G., Ingelman-Sundberg, M. (1984) Cytochrome P-450 dependent lipid peroxidation in reconstituted membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 2521-2523.
- Ekström, G., Ingelman-Sundberg, M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1313-1319.
- Eliasson, E., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M. (1988) Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 436-43.
- Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J., Eichelbaum, M. (1996) Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: Identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**: 613-623.
- Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. (1963) The light reversecarbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.* **338**: 741-755.
- Estabrook, R. W (1996) Cytochrome P450: From a single protein to a family of proteins – with some personal reflections. In *Cytochrome P450 metabolic and toxicological aspects* (C. Ionnides ed) CRC Press, New York.



- Gachályi, B., Káldor, A., Szita, M., Tihanyi, K., Vas, Á. (1985) Effect of  $\alpha$ -methyldopa on the activity of the hepatic microsomal mixed function monooxygenase system in rats. *IRCS Med. Sci.* **13**: 126-127.
- Gillette, J. R., Brodie, B. B., LaDu, B. N. (1957) The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**: 532-535.
- Grandt R, Beitlinger H, Schaltenbrandt R Braun W (1989) Vinpocetine pharmacokinetics in elderly subjects. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **39**: 1599-1602.
- Groen, K., Breimer, D. D., Van Bezooijen, C. F. A. (1992) Metabolism of simultaneously administered antipyrine and theophylline in male BN/BiRij rats before and after induction with 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* **20**: 502-506
- Guengerich, F. P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 611-650.
- Hadjiev, D., Yancheva, S. (1976) Rheoencephalographic and psychologic studies with ethyl apovincamate in cerebral vascular insufficiency. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **26**: 1947-1950
- Haenen, G. R. M. M., Jansen, F. P., Vermeulen, N. P. E., Bast, A. (1991) Activation of the microsomal glutathione S-transferase by metabolites of  $\alpha$ -methyldopa. *Arch. Biochem. Biophys.* **287**: 48-52.
- Hanna, A. N., Sharma, H. M., Kauffman, E. M., Newman, H. A. I. (1994) *In vitro* and *in vivo* inhibition of microsomal lipid peroxidation by MA-631. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **48**: 505-510.
- Hannah, R. R., Nerbert, D. W., Eisen, H. J. (1981) Regulatory gene product of the Ah complex. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylchloranthrene binding to several moieties in mouse liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **256**: 4584-90.
- Hardwick, J. P., Gonzalez, F. J., Kasper, C. B. (1983) Cloning of DNA complementary to cytochrome P-450 induced by characterization of its mRNA gene, and induction response. *J. Biol. Chem.* **258**: 10182-86
- Haugen, D. A., van der Hoeven, T.A., Coon, M. J. (1975) Purified liver microsomal cytochrome P-450: Separation and characterization of multiple forms. *J. Biol. Chem.* **250**: 3567.

- Heuman, D. M., Gallagher, E. J., Barwick, J. L., Elshourbagy, N. A., Guzelian, P. S. (1982) Immunochemical evidence for induction of a common form of hepatic cytochrome P450 in rats treated with pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile or other steroidal or non-steroidal agents. *Mol. Pharmacol.* **21**: 753-760
- Hildebrandt, A., Remmer, H., Estabrook, R. W. (1968) Cytochrome P-450 of liver microsomes – one pigment or many. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**: 607-612.
- Hosokawa, M., Maki, T., Sato, T. (1990) Characterisation of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans. *Arch. Biochem. Biophys.* **277**: 219-227.
- Houston, J. B. (1994) Utility of in vitro drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1469-1479.
- Imai, Y., Sato, R. (1966 a) Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 620.
- Imai, Y., Sato, R. (1966 b) Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**: 5-9.
- Kahn, G. C., Boobis, A. R., Blair, I. A., Brodie, M. J., Davies, D. S. (1981) A radiometric high-pressure liquid chromatography assay for the simultaneous determination of the three main oxidative metabolites of antipyrine in studies in vitro. *Anal. Biochem.* **113**: 292-300
- Kahn, G. C., Boobis, A. R., Murray, S., Davies, D. S. (1982) Differential effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbitone treatment on the oxidative metabolism of antipyrine in vitro by microsomal fractions of rat liver. *Xenobiotica.* **12**: 509-516
- Kamataki, T., Kitagawa, H. (1973) Effects of lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 3199-3207.
- Kawabata, T., Schepkin, V., Haramaki, N., Phadke, R. S., Packer, L. (1996) Iron coordination by catechol derivate antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 1569-1577.
- Kitada, M., Komori, M., Ohi, H., Imaoka, S., Funae, Y., Kamataki, T. (1989) Form-specific degradation of cytochrome P-450 by lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **63**: 175-188.
- Kleingeist, B., Bocker, R., Geisslinger, G., and Brugger, R. (1998) Isolation and pharmacological characterization of microsomal human liver flumazenil carboxylesterase. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **1**: 38-46.

- Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **24**: 376-386.
- Kocarek, T. A., Schuetz, E. G., Strom, S. C., Fisher, R. A., Guzelian, P. S. (1995) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **23**: 415-421
- Koop, D. R. (1990) Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1 by 3-amino-1,2,4,-triazole. *Chem Res. Toxicol.* **3**: 377-383.
- Kukieka, E., Cederbaum, A. I. (1996) Ferritin stimulation of lipid peroxidation by microsomes after chronic ethanol treatment: role of cytochrome P4502E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**: 121-127.
- Kumar, A., Rao, S. M. R., Pafmanaban, G. (1980) A comparative study of the early effects of phenobarbital and 3-methylcholantrene on the syntesis and transport of ribonucleinic acid in rat liver. *Biochem. J.* **186**: 81-87.
- LaDu, B. N., Gaudette, L., Trousof, N., Brodie, B. B (1957) Enzymaic dealkylation of aminopyrine (Paramidon) and other alkylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**: 741-744.
- Lave, T., Coassolo, P., Ubeaud, G., Brandt, R., Schmitt, C., Dupin, S., Jaeck, D., Chou, R. C. (1996) Interspecies scaling of bosetan, a new endothelin receptor antagonist and integration of in vitro data into allometric scaling. *Pharmaceut. Res.* **13**: 97-101.
- Levin, W., Lu, A. Y. H., Jacobson, M., Kuntzman, R., Poyer, J. L., McCay, P. B. (1973) Lipid peroxidation and degradation of cytochrome P-450 heme. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**: 842-852.
- Levine, M., Law, E. Y. W., Bandiera, S. M., Chang, T. K. H., Bellward, G. D. (1998) In vivo cimetidine inhibits hepatic CYP2C6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 493-499
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mason, H. S., Yamano, T., North, J.C., Hashimoto, Y., and Sakagishi, P. (1965 a) The structure of oxidase function of liver microsomes in *Oxidases and Related Redox System*. Vol.2, King, T., Mason, H. S. and Morrison, M., Eds. John Wiley & Sons, New York., 889-905.

- Mason, H. S., North, J. C., Vanneste, M. (1965 b) Microsomal mixed function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.* **24**: 1172-1175.
- Melikian, A. A., Bagheri, K., Hoffmann, D. (1990) Oxidation and DNA binding of (+)-7,8,-dihydrobenzol(a)pyrene in mouse epidermis *in vivo* and effects of coadministration of catechol. *Cancer Res.* **50**: 1795-1799.
- Minotti, G., Aust, S. D. (1992) Redox cycling of iron and lipid peroxidation *Lipids* **27**: 219-226.
- Minotti, G. (1992) The role of an endogenous nonheme iron in microsomal redox reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 189-198.
- Miskolczi, P., Kozma, M., Polgár, M., Vereczkey, L. (1990) Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans. *Eur. J. Drug Metab. Pharm.* **15**: 1-5.
- Miyazawa, S., Hashimoto, T., Yokota, S. (1985) Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **98**: 723-33.
- Morgan E. W., Yan B., Greenway D., and Parkinson A. (1994) Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterases isoenzymes: species differences, tissue distribution, and the effect of age, sex and xenobiotic treatment of rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 513-526.
- Mordente, A., Martorana, G. E., Minotti, G., Giardina, B. (1998) Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (Idebenone) *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 54-63.
- Nagababu, E., Lakshmaiah, N. (1994) Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free. Rad. Res.* **20**: 253-266.
- Nakagawa, A., Nakamura, K., Maeda, K., Tamataki, T., Kato, R. (1987) Studies on *in vitro* antipyrine metabolism by <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N double labeled method. *Life Sci.* **41**: 133-143
- Namkung, M. J., Yang, H. L., Hulla, J. E., Juchau, M. R. (1988) On the substrate specificity of cytochrome P450III<sub>A1</sub>. *Mol. Pharmacol.* **34**: 628-637.
- Narasimhulu, S., Cooper, D. Y., Rosenthal, O.: (1965) Spectrophotometric properties of triton-clarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sci.* **4**: 2101-2110.

- Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction. *Biochemistry* **55**: 416-421.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper, B., Levin, W. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**: 1-11.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus I. C., Johnson, E. F. Kemper, B. (1989) The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* **8**: 1-13.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F. (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**: 1-14.
- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**: 1-51.
- Nikaido, H., Hirose, T., Nikaido, O., Yamada, J., Hayakawa, J. (1991) Specificity of sex-influenced esterase. *Biochem. Genet.* **29**: 261-269.
- Nousiainen, U., Torronen, R. (1984) Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition. *Gen. Pharmacol.* **15**: 223-227.
- Obach, R. S., Baxter, J. G., Liston, T. E., Silber, B. M., Jones, B. C., MacIntyre, F., Rance, D. J., Wastall, P. (1997) The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 46-58.
- Okey, A. B., Bondy, G. P., Mason, M. E., Kahl, G. F., Eisen, H. J., Guenther, T. M., Nebert, D. W. (1979) Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **254**: 11636-48.

- van Ommen, B., Adang, A. E. P., Brader, L., Posthumus, M. A., Müller, F., van Bladeren, P. J. (1986) The microsomal metabolism of hexachlorobenzene. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 3233-3238.
- Omura, T., Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**: 1375-1376.
- Pang, K. S., Rowland, M. (1977) Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a 'well stirred' model and a 'parallel tube' model: Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **5**: 625-653.
- Parkinson, A., Clement, R. P., Casciano, C. N., Cayen, M. N. (1992) Evaluation of loratadine as an inducer of liver microsomal cytochrome P450 in rats and mice. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 2169-2180
- Pederson, T. C., Aust, S. D. (1970) Aminopyrine demethylase. Kinetic evidence for multiple microsomal activities. *Biochem. Pharmacol.* **19**: 2221-2230
- Pederson, T. C., Buege, J. A., Aust, S. D. (1973) Microsomal electron transport. *J. Biol. Chem.* **248**: 7134-7141.
- Polgár, M., Vereczkey, L. (1984) Pharmacokinetics of vinpocetine (Cavinton R) in dog. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**: 407-412.
- Poulsen, H. E., Loft, S. (1988) Antipyrine as a model drug to study hepatic drug-metabolising capacity. *J. Hepatol.* **6**: 374-382
- Probst, M. R., Beer M., Beer, D., Jenő, P., Meyer, U. A., Gasser, R. (1994) Human liver arylacetamide deacetylase. *J. Biol. Chem.* **34**: 21650-21656.
- Remmer, H., (1958) Die Beschleunigung des Evipanabbaues unter der Wirkung von Barbitureaten. *Naturwissenschaften.* **45**: 189-196.
- Remmer, H., Merker, H. J. (1965) The effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolising enzymes. *Ann. N.Z. Acad. Sci.* **123**: 79-85.
- Remmer, H., Schenkman, J., Estabrook, R. W., Sasame, H., Gillette, J., Narasimhulu, S., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. (1966) Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* **2**: 187-195.
- Rhodes, J. C., Houston, J. B. (1983) Antipyrine metabolite kinetics in phenobarbital and  $\beta$ -naphthoflavone-induced rats. *Drug Metab. Dispos.* **11**: 131-136

- Ribári, O., Zelen, B., Kollár, B. (1976) Ethyl apovincamate in the treatment of sensorineural impairment of hearing. *Arznem.-Forsch. Drug Res.* **26**: 1977-1980.
- Ryan, D.E., Levin, W. (1990) Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.* **45**: 153-160.
- Sakurai, K., Cederbaum, A. I. (1998) Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nirilotriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol. Pharmacol.* **54**: 1024-1035.
- Satoh, T., Hosokawa, M. (1995) Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicol. Lett.* **82-83**: 439-445.
- Schenkman, J. B., Remmer, H., Estabrook, R. W. (1967) Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* **3**: 113-116.
- Scholz, R. W., Reddy, P. V., Wynn, M. K., Graham, K- S., Liken, A. D., Gumpricht, E., Reddy, C. C. (1997) Glutathione-dependent factors and inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Free. Rad. Biol. Med.* **23**: 815-828.
- Schuetz, E. G., Wrighton, S. A., Safe, S. H., Guzelian, P. S. (1986) Regulation of cytochrome P-450p by phenobarbital and phenobarbital-like inducers in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture and in vivo. *Biochemistry* **25**: 1124-33.
- Sevanian, A., Nordenbrand, K., Kim, E., Ernster, L., Hochstein, P. (1990) Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free. Rad. Biol. Med.* **8**: 145-152.
- Sharer, J. E., Wrighton, S. A. (1996) Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the in vitro oxidation of antipyrine. *Drug Metab. Dispos.* **24**: 487-494
- Sladek, N. E., Mannering, G. J. (1966) Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholantrene treated rats. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **24**: 668.
- Sone, T., Zukowski, K., Land, S. J., King, C. M., Martin, B. M., Pohl, L. R., Wang, C. Y. (1984) Characteristics of a purified dog hepatic microsomal N,O-acyltransferase. *Carcinogenesis.* **15**: 595-599.
- Song, B.-J., Gelboin, H. V., Park, S. S., Yang, C. S., Gonzalez, F. J. (1986) Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s.

- Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J. Biol. Chem.* **261**: 16689-97.
- Soucek, P. (1999) Cytochrome P450 destruction by quinines: comparison of effects in rat and human microsomes. *Chem.-Biol. Interact.* **121**: 223-236.
- Spiteller, P., Spiteller, G. (1998) Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether  $\text{Fe}^{2+} / \text{O}_2$  or  $\text{Fe}^{3+} / \text{O}_2$  is used as oxidant. *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**: 23-40.
- Stevens, J. C., Halpert, J. (1988) Selective inactivation of four rat liver microsomal androstenedione hydroxylases by chloramphenicol analogues. *Mol. Pharmacol.* **33**: 103-110.
- Svingen, B. A., Buege, J. A., O'Neal, F. O., Aust, S. D. (1979) The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **254**: 5892-5899.
- Szabó, I., Renczes, B., Gachályi, B.: (1995) The effect of combined pre-treatment on the metabolism of antipyrine in the rat. *Acta Phys. Hung.* **83**: 51-53.
- Szelezcky, G., Vereczkey, L. (1986) Pharmacokinetic and metabolic studies of vinpocetine on dogs. I. Pharmacokinetics. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **38**: 257-267.
- Szobor, A., Klein, M. (1976) Ethyl apovincamate therapy in neurovascular diseases. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **26**: 1984-1989.
- Tampo, Y., Yonaha, M. (1995) A microsomal membrane component associated with iron reduction in NADPH-supported lipid peroxidation. *Lipids* **30**: 55-62.
- Tang, L. X., Yang, J. L., Shen, X. (1997) Effects of additional iron-chelators on  $\text{Fe}^{2+}$ -initiated lipid peroxidation: evidence to support the  $\text{Fe}^{2+} \dots \text{Fe}^{3+}$  Complex as the initiator. *J. Inorg. Biochem.* **68**: 265-272.
- Teunissen, M. W. E., Meerburg-Van der Torren, J. E., Vermeulen, N. P. E., Bremier, D. D. (1983) Automated high-performance liquid chromatographic determination of antipyrine and its main metabolites in plasma, saliva and urine, including 4,4'-dihydroxyantipyrine. *J. Chromatogr.* **278**: 367-378
- Tsujita, T., Okuda, H. (1983) Human liver carboxylesterase. Properties and comparison with human serum carboxylesterase. *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**: 793-797.



- Ubeda, A., Esteve, M. L., Alcaraz, M. J., Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1995) Effect of flavonoids on cytochrome P-450 from rat liver microsomes: inhibition of enzyme activities and protection against peroxidative damage. *Phytoter. Res.* **9**: 416-20
- Van der Hoeven, T. A., Coon, M. J. (1974) Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **249**: 6302-6310
- Velic, I., Metzler, M., Hege, H. G., Weymann, J. (1995) Separation and identification of phase I and phase II [<sup>14</sup>C]antipyrine metabolites in rat and dog urine. *J. Chromatogr. B* **666**: 139-147
- Vereczkey, L., Szentirmay, Z., Szporny, L. Kinetic metabolism of vinpocetine in the rat. (1979.a) *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **29**: 953-956.
- Vereczkey, L., Czira, G., Tamás, J., Szentirmay, Z., Botár, Z., Szporny, L. Pharmacokinetics of vinpocetine in humans. (1979.b) *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **29**:957-960.
- Waxman, D. J. (1984) Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. *J. Biol. Chem.* **259**: 15481-15490
- Williams, F. M., Mutch, E. M., Nicholson, E., Wynne, H., Wright, P., Lambert, D., Rawlins, M. D.(1989) Human liver and plasma aspirin esterase. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 407-409.
- Wills, E. D. (1971) Effect of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **123**: 983-991.
- Yao, J. H., Su, C. Y., Chu, X. Y. (1994) Pharmacokinetics and disposition of vinpocetine in rats. *Acta Pharm. Sinica* **29**: 81-85.
- Ylikallio, A., Sotaniemi, E. A. (1980) Drug metabolism and liver function after methyldopa withdrawal. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **10**: 115-119.
- Zhao, Z. S., Khan, S., O'Brien, P. J. (1997) The prevention of ferric nitrilotriacetate-induced nephro- and hepatotoxicity by methylenedioxybenzene antioxidants. *Chem.-Biol. Interact.* **108**: 107-118.

## **11. Mellékletek**