

**ZÁRÓJELENTÉS**  
**Neuro- és citoprotektív mechanizmusok kutatása**  
**2003-2006**

**Vezető kutató: Dr. Magyar Kálmán akadémikus**

**1. Bevezetés**

Az OTKA támogatással folytatott kutatás fő vonalában a (-)-deprenyl hatásmódjának további felderítése állt. A (-)-deprenyl a magyar gyógyszerkutatás utóbbi évtizedeinek egyik sikervegyülete, melyet 63 országban hivatalos gyógyszerként használnak a Parkinson kór terápiájában. Több ezren hivatkoztak rá közleményeikben, és mintegy négyezer dolgozat foglalkozik primeren a vegyülettel, melyből a hazai intézetek közleményeinek száma csak töredék, alig több mint száz. A vegyület 40 éves történetét tekintve még mindig rejteget feltáratlan, kutatásra érdemes hatáskvalitásokat. Négy évtizeddel ezelőtt antidepresszív szernek állították elő, de ezen a téren áldozatul esett a többi MAO bénítóval együtt a „sajtreakciónak” és a triciklikus antidepresszánsok vették át a vezető szerepet a depresszió terápiájában. A „sajtreakció” sokkját egyedül a (-)-deprenyl élte túl. Helyét a Parkinson kór gyógykezelésében találta meg, melyben elévülhetetlen szerep jut Birkmayer és munkacsoportjának, akik dopamin potenciózó és antioxidáns hatása mellett, retrospektív klinikai kutatások alapján, még neuroprotektív hatását is feltételezték. Számos közlemény foglalkozik a vegyület metabolizmusával, előnytelen felfogást vetítve a metabolitok (methamfetamin, dezmetil-deprenyl, amfetamin) farmakológiai hatásban való részvételére. Jelenlegi kutatásaink egyik fő irányát a (-)-deprenyl-*N*-oxid (DNO) képződésének és szervezetbeni sorsának vizsgálata képezte.

**2. Metabolizmus vizsgálatok**

**2.1. A deprenyl metabolizmusának vizsgálata kapilláris elektroforézis módszerrel.**

Vizsgáltuk a (-)-deprenyl enantiomerek metabolizmusát, különös figyelmet fordítva azok *N*-oxidációjára. A vizsgálatokhoz királis kapilláris

elektroforézis módszert dolgoztunk ki a (-)-deprenyl és 7 metabolitjának, köztük a deprenyl-*N*-oxid izomereknek egyidejű elválasztására.

A módszert validáltuk az *R*-(-)-deprenyl metabolitjainak patkány vizeletből történő meghatározására. Új szilárdfázisú extrakciós módszert dolgoztunk ki, mely lehetőséget teremtett a metabolitok szelektív, ugyanakkor jó hatásfokú izolálására.

*In vivo* metabolizmus vizsgálatok során igazoltuk patkányokban a deprenyl enantiomerek *N*-oxidációját, és mind az *R*-(-)-deprenyl, mind az antipódja esetén az *NS*-izomer képződését találtuk preferáltnak, az *IR,NS*-deprenyl-*N*-oxid öt-hétszeres feleslegben keletkezett az *IR,NR*-izomerhez képest.

Az *N*-oxidált metabolitok gyorsan ürülnek a vizelettel, mennyiségük egyszeri adagolás után a kezelést követő első hat órában összevethető volt a fő metabolitokéval (methamfetamin, amfetamin, dezmetil-deprenyl), majd mennyisége a többi metabolithoz viszonyítva gyorsan csökkent.

Az *N*-oxid izomerek mennyisége hét napos ismételt adagolást követően is csökkenő tendenciát mutatott. Ebben az esetben a *para*-hidroxilált származékok váltak fő metabolitokká, melyek jelentős része konjugátum formájában ürült.

Megvizsgáltuk a deprenyl-*N*-oxid *in vivo* metabolizmusát is, mely alátámasztotta a vegyület gyors ürülését. Egyszeri kezelést követően a dózis mintegy 60%-a jelent meg az első három órában, változatlan formában a vizeletben. A gyors exkréció mellett metabolizmust is tapasztaltunk, a dózishoz képest körülbelül 10 %-a deprenyl és deprenyl metabolit formában volt jelen a 24 órás vizeletmintákban, amit figyelembe kell venni a deprenyl-*N*-oxid farmakológiai tulajdonságainak *in vivo* vizsgálata során.

Az *N*-oxidáció mechanizmusának jobb megismerésére *in vitro* metabolizmus vizsgálatokat végeztünk humán rekombináns FMO enzimek és humán máj mikroszóma preparátumok felhasználásával. Mind az *R*-(-)-, mind az *S*-(+)-deprenyl az FMO 1 enzim esetében bizonyult jobb szubsztrátnak. Az FMO 3 kevésbé oxidálta a vegyületek *tercier*-amino-csoportját. Jelentős különbséget tapasztaltunk a két enzim sztereoszelektivitása között is. Az FMO 1 esetében az *NS*-, míg az FMO 3 esetében az *NR*-izomer képződése volt preferált. Az eltérés

jelentős fajok közötti különbséget eredményezhet, mivel míg patkányban az FMO 1 az elsődleges izoforma mind a májban, mind az extrahepatikus szövetekben, addig emberben a máj elsősorban FMO 3-at tartalmaz, ugyanakkor a bél és a vese jelentős FMO 1 aktivitással rendelkezik. Az *in vivo* vizsgálataink során patkányokban preferáltnak talált *NS-N*-oxidok képződése jó egyezést mutat az állatfaj magas FMO 1 aktivitásával. Ugyanakkor humán máj mikroszóma preparátum alkalmazása esetén az *N*-oxidáció mértéke jelentősen elmaradt a dezalkilációétól és az *NR*-izomer képződése bizonyult preferáltnak, ami összevág az emberi máj magas FMO 3 és elhanyagolható FMO 1 tartalmával. Az eredmények felvetik, hogy emberben a deprenyl *N*-oxidációja elsősorban extrahepatikusan történhet, akár már a bél nyálkahártyában a felszívódás során.

A deprenyl enantiomerek humán máj mikroszóma preparátummal végzett metabolikus vizsgálatában a sztereoszelektivitás iránya megegyezett a humán májra jellemző FMO 3 szelektivitásával, de mértéke nem érte el azt, ami alapján felvetődik, hogy az FMO mellett citokróm P450 enzimeknek is szerepe lehet az *N*-oxidált metabolit képzésében.

## **2.2. A (-)-deprenylnek és metabolitjainak vérkoncentrációjából számolt farmakokinetikai paraméterek a vegyület iv, po, sc és ip beadása után.**

Az állatokat a különböző beadási módok során 5 mg/kg (-)-deprenyllel kezeltük. Hat órán át, kilenc időpontban gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC/MS) módszerrel meghatároztuk a plazma deprenyl, valamint a metabolitok (methamfetamin, amfetamin, dezmetil-deprenyl) koncentrációját. A plazmakoncentrációból kiszámítottuk a legfontosabb farmakokinetikai paramétereket ( $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}^{\beta}$ ). A (-)-deprenyl – mint a táblázatból látható – jelentős „first pass” metabolizmussal rendelkezik, po beadva a beadott mennyiség mindössze 25%-a jut a szisztémás keringésbe.

## A (-)-deprenyl és metabolitjainak farmakokinetikai paramétereit

*(-)-deprenyl*

farmakokinetikai paraméterek	po	sc	ip	iv
$C_{max}$	137,00	472,00	636,00	-
$t_{max}$	0,25	0,25	0,08	-
$t_{1/2}^{\beta}$	1,78	0,86	1,26	1,25
$AUC_{0-6}$	170,30	619,10	558,00	712,60
$AUC_{0-\infty}$	175,50	623,80	563,80	716,40
$f_{abs}$	24,50	87,10	78,70	100,00

*methamfetamin*

farmakokinetikai paraméterek	po	sc	ip	iv
$C_{max}$	205,00	131,00	260,00	342,00
$t_{max}$	0,25	0,50	0,08	0,25
$t_{1/2}^{\beta}$	2,99	1,98	1,57	1,95
$AUC_{0-6}$	547,50	357,80	449,30	535,70
$AUC_{0-\infty}$	692,40	406,60	483,20	591,5

*dezmetil-deprenyl*

farmakokinetikai paraméterek	po	sc	ip	iv
$C_{max}$	158,00	104,00	306,00	355,00
$t_{max}$	0,25	0,50	0,08	0,02
$t_{1/2}^{\beta}$	1,10	1,11	0,17	0,55
$AUC_{0-6}$	131,20	97,30	103,30	166,10
$AUC_{0-\infty}$	132,80	97,30	103,40	166,50

*amfetamin*

farmakokinetikai paraméterek	po	sc	ip	iv
$C_{max}$	132,00	50,40	192,00	108,00
$t_{max}$	0,50	1,00	0,08	0,50
$t_{1/2}^{\beta}$	1,74	1,47	1,18	1,40
$AUC_{0-6}$	205,40	102,90	191,00	137,80
$AUC_{0-\infty}$	221,70	109,30	191,30	141,00

$f_{abs}$  = biológiai hasznosulás %-ban ( $AUC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty iv} \cdot 100$ )

A metabolizmus vizsgálatokból levonható gyakorlati következtetések konklúziója a jelentés végén található.

### **3. A (-)-deprenyl apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálata**

#### **3.1. MAO-gátlók apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálata**

Az elmúlt időszakban számos eredmény látott napvilágot arra vonatkozóan, hogy a Parkinson-kór kezelésére használt szelektív monoamin-oxidáz-B (MAO-B) gátló (-)-deprenyl olyan alacsony koncentrációban, melyben a MAO-B-t gátolni már nem képes, mind *in vitro*, mind *in vivo* antiapoptotikus hatással rendelkezik. Az antiapoptotikus hatásért többen a deprenyl egyes metabolitjait tették felelőssé [(-)-dezmetil-deprenyl], míg mások metabolitjai miatt támadták a vegyületet [(-)-methamfetamin], azzal az indokkal, hogy az apoptózisra gyakorolt kedvező aktivitását is leronthatják. Ugyanakkor humán melanoma sejtvonalon mind a deprenyl, mind a metabolitjai magas koncentrációban proapoptotikusnak bizonyultak. A fenti eredmények ismeretében felmerül a kérdés, hogy mitől függ a deprenyl apoptózisra gyakorolt hatása (koncentrációtól, szövettípustól, a szövet differenciáltsági állapotától, a metabolitok jelenlététől, a sejthalált kiváltó stimulusoktól, stb.), melynek tisztázásával a vegyület terápiában betöltött szerepe, terápiás dózisa is pontosítható lenne, esetleg új indikációs területtel bővülne.

*Célkitűzéseink között szerepelt:*

*Ad1.* Sejt- és szövettenyésztésre alkalmas laboratórium kialakítása a Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetében, egyetemi forrásból.

*Ad2.* Az antiapoptotikus és proapoptotikus hatás szkrínelésére alkalmas *in vitro* rendszer beállítása.

*Ad3.* Nagy dózisu ( $10^{-3}$  M) (-)-deprenyl és fő metabolitjai [(-)-methamfetamin, (-)-dezmetil-deprenyl, (-)-deprenyl-*N*-oxid] proapoptotikus hatásának vizsgálata tumorigén, differenciálatlan patkány PC-12 sejtvonalon.

*Ad4.* A (-)-deprenyl metabolizmusának vizsgálata szövettényészetben differenciálatlan PC-12 sejtvonalon, a proapoptotikus hatást közvetítő metabolit(ok) azonosítása céljából.

*Ad5.* A Pécsi Egyetem Általános Orvostudományi Karának Biokémiai Intézetével együttműködve a szelektív MAO-B [(-)-deprenyl, (-)-deprenyl-*N*-oxid, (-)-p-F-deprenyl, rasagilin], a szelektív MAO-A (clorgylin), valamint nem szelektív MAO-gátlók (nialamid) a szérum-megvonással kiváltott apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálata differenciált és nem differenciált PC-12 sejtvonalon.

*Ad6.* A (-)-deprenyl sejtadhézióra gyakorolt hatásának vizsgálata.

Sejt- és szövettényésztő laboratóriumot alakítottunk ki és szereltünk fel a Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetében.

Az apoptózis *in vitro* vizsgálatára patkány PC-12 sejtvonalat alkalmaztunk differenciálatlan, vagy NGF-ral idegi irányba differenciáltatott állapotban. Az apoptotikus sejthalál detektálását áramlási citométerrel végeztük. Módszereket állítottunk be a foszfolipid-aszimmetria felbomlásának, a mitokondriális membránpotenciál megváltozásának, a kaszpáz-3 aktiválódásának, illetve a DNS fragmentáció meghatározására. A deprenyl, illetve metabolitjainak esetleges átalakulását a kezelés alatt kapilláris elektroforézis módszerrel követtük.

A  $10^{-3}$  M koncentrációban alkalmazott deprenyl és egyes metabolitjai proapoptotikusnak bizonyultak a vizsgált nem differenciált sejtvonalon, ez a hatás viszont csak akkor volt megfigyelhető, ha valamilyen más behatás (szérum-megvonás) már érzékenyítette a sejteket a metabolitok által közvetített proapoptotikus ingerrel szemben, szérummal támogatott kultúrákon nem figyeltünk meg apoptózist a kezelés hatására. A proapoptotikus hatás mértéke eltérő az egyes metabolitok esetén, legjelentősebb a deprenylnél és a methamfetaminnál, míg legkevésbé jellemző a deprenyl-*N*-oxidra. A deprenyl proapoptotikus aktivitása egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban már nem jelentkezik, utóbbi a methamfetaminra is igaz.

A deprenyl metabolikus átalakulásának vizsgálatát mind szérumból, mind szérummal támogatott kultúrák esetén elvégeztük, de egy eltérés kivételével különbséget nem találtunk a kettő között. Sem a deprenyl, sem a dezmetil-deprenyl nem metabolizálódott a 3 napos kezelés alatt, a deprenyl-*N*-oxidból kb. 10%-ban methamfetamin és 20-25%-ban deprenyl képződött szérummal támogatott kultúrákon, utóbbi azonban nem képződött szérummentes körülmények között. A methamfetaminból egy általunk egyelőre nem azonosított metabolit keletkezett, ami a dezmetil-deprenylnek megfelelő migrációs idővel rendelkezett. Kémiai megfontolás alapján azonban ez nem lehet dezmetil-deprenyl, mivel nincs (nem lehet) *N*-propargyl csoportja.

A metabolizmus vizsgálatokból arra következtethetünk, hogy minden vegyület maga felelős az eltérő mértékű proapoptotikus hatásért, mert vagy nem képződnek belőle metabolitok, vagy a képződő metabolitok az adott koncentrációban nem befolyásolják az anyavegyület hatásait. Vizsgálataink eredményeinek ismeretében felmerül a kérdés, hogy elősegítheti-e a nagy dózisban alkalmazott deprenyl más sublethális ingerrel érzékenyített daganatos sejtek szelektív pusztulását, ezzel hatékonyabbá téve egyes daganatos szövetek kezelését, megőrizve az ép szövetek védelmét.

Az irodalmi adatoktól eltérően, feltehetőleg a szövetkultúra eltérése miatt, nem tudtuk megerősíteni a MAO-B gátlók kifejezett antiapoptotikus hatását ( $10^{-7}$ - $10^{-13}$  M) sem a differenciált, sem a differenciálatlan sejt kultúrában. Nem tapasztaltuk a mitokondrium membránpotenciál csökkenésének védelmét sem. Kizárólag a clorgylin mutatott némi hatást az apoptózis gátlása és a membránpotenciál védelme terén (pécsi vizsgálatok). Az eredmény ellentétes a világirodalmi adatokkal és az okok további vizsgálata folyamatban van.

A beállított módszereink egyaránt alkalmasak más feltételezhetően neuroprotektív vagy neurorescue hatással rendelkező propargilamin típusú vegyületek antiapoptotikus hatásának szkrínelésére, másrészt az esetleges proapoptotikus hatás kimutatására. Az irodalmi adatok megismétlése vagy a sikertelenség okának felderítése azonban elsődleges célunk.

A deprenyl neuroprotektív hatásához hozzájárulhat az is, hogy fokozza a sejtadhéziót  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  M koncentrációban, ami az ilyenkor alkalmazott alacsony dózisban a deprenyl antitumorigén hatásával is összefügghet. A hatás sztereoszelektív.

Feltételezhető, hogy a propargilamin típusú vegyületek neuroprotektív és neurorescue hatása a MAO-n túl más célmolekulákhoz történő kapcsolódást (is) igényel. A deprenyl a MAO-B enzimben a flavin nukleotidhoz kötődik kovalensen, míg az antiapoptotikus hatás kapcsán azonosított szelektív célpontja esetén, a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázban (GAPDH), a  $\text{NAD}^+$ -kötő elemhez. Így valószínűsíthető, hogy a propargilaminok más FAD-, vagy NAD-koenzimmel működő struktúrákhoz is kötődni képesek, befolyásolva azok aktivitását, legyen szó akár a génextpresszióról (flavin tartalmú nukleáris aminoxidáz, poli(ADP-ribóz) polimeráz, GAPDH, NAD-függő hiszton dezacetiláz stb.), akár a sejtet érő oxidatív károsodásról (NADPH-oxidáz). *További célkitűzéseink között szerepel a propargilamin struktúrák mikrogliaiban előforduló flavin-függő NADPH-oxidázra gyakorolt esetleges gátló hatásának vizsgálata, mely működése során szuperoxid gyököt termel, majd ebből számos más reaktív oxigén gyök (ROS) képződik, ami a korai neuronkárosodás egyik kiváltó oka lehet. Az extracellulárisan termelt ROS károsítja a környező neuronokat, míg az intracellulárisan megemelkedő ROS-szint szükséges a glia által termelt proinflammatorikus faktorok, citokinek aktiválásához, melyek szintén toxikusak a neuronokra és fenntartják a gyulladási választ.*

Munkánk során módszert állítottunk be a NADPH-oxidáz aktivitásának vizsgálatára, a reakció kapcsán keletkező reaktív gyökök, valamint  $\text{H}_2\text{O}_2$  fluoreszcens technikával történő detektálása segítségével. A NADPH-oxidáz expressziójának indukciójára LPS-t, valamint csökkentett szérumszintű tápfolyadékot használtunk különböző *in vitro* rendszereken (RAW 264.7 makrofág sejtvonal, bv-2 mikroglia sejtvonal, primer astrocyta tenyészet). Folyamatban van a beállított rendszereken különböző propargilamin vegyületek tesztelése – függetlenül attól, hogy rendelkeznek-e MAO gátló hatással -, az



esetleges NADPH-oxidáz gátló sajátosságuk kimutatása céljából, az ismert NADPH oxidáz-gátló diphenylene iodonium pozitív kontrollja mellett.

#### **4. A sejteket érő oxidatív és nitratív stressz mérésére alkalmas kapilláris elektroforézis módszerek kidolgozása és alkalmazása 1. típusú diabétesz állatmodelleken a nitrát és nitrit koncentráció-arány biomarker szerepének igazolására**

Számos kórkép patomechanizmusában szerepet játszik a reaktív oxigén és nitrogén származékok fokozott képződése. Vizsgáltuk a sejteket ért stressz mértékét, valamint a nitrogén-monoxid (NO) hozzáférhetőségének jelzésére alkalmas biomarker kismolekulák meghatározásának lehetőségét kapilláris elektroforézissel. Módszert dolgoztunk ki a reaktív származékok stabil végtermékeinek; a módosult aromás aminosavaknak, valamint a szöveti nitrát és nitrit mennyiségének mérésére. 1. típusú diabétesz állatmodellen igazoltuk, hogy a szöveti nitrát/nitrit arány alkalmas markere a nitrogén-monoxid biológiai hozzáférhetőségének. A diabéteszes állatok szöveteiben a nitrát és nitrit koncentrációjának aránya a kontrollhoz képest megemelkedett, ami annak a következménye, hogy a betegségre jellemző fokozott oxidatív stressz módosítja a nitrogén-monoxid metabolizmusát. Inzulinkezelés hatására a diabéteszes állatok szöveteiben a nitrát/nitrit arány normalizálódott. A szöveti nitrát/nitrit arány meghatározására alkalmas módszer korai marker lehet az oxidatív stresszt mérséklő gyógyszerjelölt molekulák hatékonyságának mérésére.

#### **5. A szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz (SSAO) enzim fiziológiai és patofiziológiai szerepének vizsgálata**

##### **5.1. Az SSAO szubsztrát benzilamin inzulinszerű hatásának vizsgálata**

Vizsgáltuk, hogy az exogén SSAO szubsztrát, a benzilamin hiperglikémiát csökkentő hatása mellett rendelkezik-e egyéb inzulinszerű hatásokkal. Fellelhetőek-e az ér endothelium esetében is kedvező inzulinszerű hatások, vagy a fokozott enzimaktivitás reaktív termékeinek potenciálisan citotoxikus hatásai figyelhetők meg. Patkányokon streptozotocinnal kiváltott 1. típusú diabétesz

modellen a benzilamin kezelés – vanádium szupplementáció mellett – az inzulinkezeléshez hasonló hatásokat mutatott: csökkentette a szérum SSAO emelkedett aktivitását, normalizálta az emelkedett szöveti nitrit/nitrát arányt és csökkentette a késői glikációs végtermékek (AGE) felhalmozódását.

### **5.2. Az SSAO enzim aktivitásának vizsgálata veseelégtelenségben szenvedő dializált betegekben, illetve krónikus érbetegekben.**

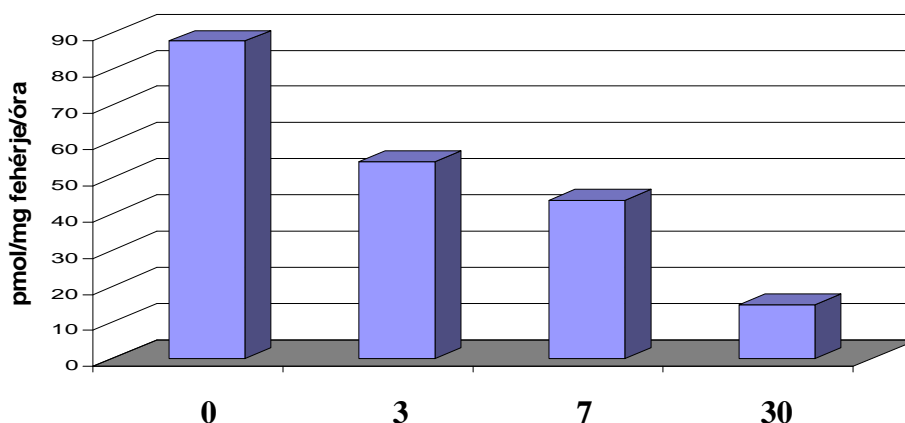
Meghatároztuk a szérum SSAO aktivitását krónikus veseelégtelen *i/* konzervatíván kezelt (n=12), *ii/* haemodializált (n=12) *iii/* peritoneálisan dializált (n=11) betegekben egészséges kontroll csoporttal (n=12) összehasonlítva. Predializált és krónikus peritoneálisan dializált veseelégtelen betegek SSAO aktivitása (117,39±11,44 ill. 98,94±8,06 pmol/ml/h) nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoportban (105,82±5,14) mért értékektől. A nagy kardiovaszkuláris kockázatú haemodializált veseelégtelen betegekben a dialízis kezelés előtt szignifikánsan alacsonyabb SSAO aktivitást találtunk (60,72±11,96), amely a kezelés után tovább csökkent (43,87±5,91). A jelenség magyarázatául szolgálhat valamely gátló hatású gyulladási mediátor felszaporodása (TNF- $\alpha$ ), vagy aktiváló molekula fokozott kiürülése (LPS).

Meghatároztuk a szérum SSAO aktivitást különböző súlyosságú krónikus perifériás artériás érbetegekben is. A betegség viszonylag korai szakaszában emelkedő enzimaktivitást tapasztaltunk, ami a betegség további súlyosbodásával egy maximum elérése után a kontroll alatti értékre csökkent. A korai szakaszban tapasztalt aktivitás növekedés az ér endothelium károsodása során az onnan leszakadó, keringésbe kerülő enzim megjelenésének a következménye lehet. Az ér további súlyos károsodása esetén viszont megszűnik a szérum SSAO lehetséges forrása, ami miatt a szérumban mért enzimaktivitás csökken.

### **5.3. A carbidopa hatása az SSAO aktivitásra Duellinnel kezelt parkinsonos betegeken**

A Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinikájával együttműködésben vizsgáltuk 21, még kezeletlen parkinsonos beteg szérumának SSAO aktivitását, valamint Duellinnel történt kezelést követően a 3., 7. és 30. nap múlva. A hatást a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva pmol/mg fehérje/óra egységben, átlag±S.E. adtuk meg. A carbidopa (perifériás dekarboxiláz gátló) hidrazin szerkezetéből adódóan SSAO gátló hatással rendelkezik és ennek megfelelően gátolta a kezelést követően az SSAO aktivitását.

0 nap	3 nap	7 nap	30 nap
87,72 ± 9,78	54,54 ± 5,50	43,81 ± 6,90	14,88 ± 2,26



Kérdés, hogy az SSAO enzim jelentős mértékű gátlása mennyiben vesz részt a terápiás hatásban. Ennek eldöntése további vizsgálatokra vár. Tény, hogy ez a hatás rejtve van a Parkinson-kór szokványos kezelése során.

## **6. A pre-szinaptikus $\alpha_2$ -receptor gátló hatása a feszültségfüggő $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákra és a fordított $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cserére**

Nyúl izolált fő pulmonáris artéria szimpatikus idegeiből [ $^3\text{H}$ ]noradrenalin-([ $^3\text{H}$ ]NA)-felszabadulást mértek 'uptake'-gátlók (cocain és corticosteron) jelenlétében alacsony frekvenciás ideg-ingerlés (2Hz, 1 ms, 60 V; 360 ütés) hatására.

Korrelációt találtak a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák gátlása és a preferenciális  $\alpha_2$ -receptort gátló yohimbin ( $3 \times 10^{-7}\text{M}$ ) [ $^3\text{H}$ ]NA-felszabadulást potencírozó hatása között. Intakt  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák mellett ugyanis a yohimbin megnégyszerezte a NA-felszabadulást. Részleges 'N-típusú'  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna gátlás után ( $10^{-8}\text{M}$   $\omega$ -CgTx GVIA; irreverzibilis 'N-típusú'  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna gátló), a yohimbin bár fokozta a NA-felszabadulást, de hatása messze elmaradt a normál oldatban mért értéktől. Továbbá, ha a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák működését, és ezzel a NA-felszabadulást felfüggesztették ( $\omega$ -CgTx GVIA +  $3 \times 10^{-3}\text{M}$  neomycin), a yohimbin hatástalanná vált. A neomycinről ismert, hogy az 'N-típusú'  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák mellett más altípusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat is gátol (u.n. 'nem N-' és 'nem L-típusú' nagyfeszültségre aktiválódó  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat).

Ilyen körülmények között ( $\omega$ -CgTx GVIA + neomycin) a [ $^3\text{H}$ ]NA-felszabadulás visszaállítható  $\text{Na}^+$ -terheléssel ( $\text{Na}^+$ -pumpa gátlás extracelluláris  $\text{K}^+$ -megvonással). Kimutatták, hogy az ilyen körülmények között kapott NA-felszabadulást ( $\omega$ -CgTx GVIA + neomycin;  $\text{K}^+$ -mentes oldat) valószínűleg a fordított  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere aktivációja hozza létre, mivel a transzmitter felszabadulás gátolható tetrodotoxinnal (TTX,  $10^{-7}\text{M}$ ), extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -megvonással (+ 1mM EGTA),  $\text{Li}^+$ -(113 mM;  $[\text{Na}^+]_o$ : 25 mM)-helyettesítéssel és a preferenciálisan fordított  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere gátló KB-R7943-( $3 \times 10^{-5}\text{M}$ )-alkalmazásával. A yohimbin ilyen körülmények között is potencírozta a NA-felszabadulást, az  $\alpha_2$ -receptor agonista l-noradrenalin (l-NA), vagy clonidin ( $10^{-6}\text{M}$ ) pedig gátolta. A yohimbin által potencírozott transzmitter felszabadulás gátolható volt TTX-al,  $\text{Ca}^{2+}$ -megvonással, Li-helyettesítéssel és KB-R7943 alkalmazásával. A fentiek alapján

feltételezhető, hogy a pre-szinaptikus  $\alpha_2$ -receptor nemcsak a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat, hanem a fordított  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cserét is regulálja.

A fordított  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere  $\text{K}^+$ -mentes oldatban tovább fokozható a gyors, TTX-függő  $\text{Na}^+$ -csatorna aktivációval ( $10^{-5}\text{M}$  veratridin). A veratridin ugyanis tovább fokozta a NA-felszabadulást idegingerlésre. A veratridinről ismert, hogy a gyors  $\text{Na}^+$ -csatornát aktiválja és/vagy nyitott állapotban gátolja. A veratridin transzmitter felszabadulásra gyakorolt potenciózó hatását a  $\text{Ca}^{2+}$ -megvonása és a KB-R7943 alkalmazása felfüggesztette ill. szignifikánsan gátolta.

Terápiás szempontból egy reverzibilis 'N-típusú'  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna gátló felhasználható lenne a hipertónia terápiájában.

Dekompenzációban pedig, feltehetően egy normál módon működő  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere gátló lenne előnyös terápiás szempontból, mely szemben a digitálisz glikozidákkal, nem emelné az intracelluláris nátrium koncentrációt.

### **7. A nociceptin farmakológiai vizsgálata**

A nociceptin (NC; orphaninFQ) heptadecapeptid, mely egy 176 aminosavból álló prekursorból, a prepronociceptinből hasad ki megfelelő inger hatására. A prekursorban a nocistatin is szerepel, ami a NC funkcionális antagonistája. A NC központi idegrendszeri és perifériás hatásai sokrétűek. Intracerebro-ventricularisan adva hiperalgésiát okoz opiát elvonási tünetekkel együtt (morfin-antagonista). Igazolták szerepét táplálékfelvételben, szorongásban, a biogén aminok felszabadításában. Élettani, kórélettani szerepére vonatkozóan az exogén NC-kiváltotta hatás, valamint döntően az állatkísérletes adatok nyújtanak felvilágosítást. A NC receptoron (NOP) ható vegyületeknek a gyógyszeres terápiában való alkalmazhatóságára nagy figyelem irányul.

Kísérleteinkben vizsgáltuk a humán vérplazma NC szintjét különböző krónikus májbetegségekben. Így Wilson-kórban, primer biliaris cirrhosisban és különböző etiológiájú daganatos megbetegedésekben.

Megállapítottuk, hogy Wilson-kórban a plazma NC szintje szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban, de a NC szint emelkedése nem mutatott

korrelációt a májfunkciós tesztek eredményével, sem a neurológiai tünetek súlyosságával.

A primer biliaris cirrhosisban szenvedő kezelt nőbetegekben minden esetben szignifikánsan magasabb plazmaszintet találtunk, valamint pozitív korreláció állt fenn a plazma NC szint alakulása és a betegség progressziója között.

Daganatos betegségben tartósan követve a NC koncentráció változását, azt találtuk, hogy a klinikai státusszal és az  $\alpha$ -fetoprotein-szinttel párhuzamosan haladó, a kiindulási értéknél nagyságrenddel magasabb NC szint volt mérhető.

Kimutattuk a NC hisztamin felszabadító hatását, mely ugyan elmarad a 48/80 degranulációt okozó keverék hatásától, de kombinált kezelésben a NC és a 48/80 hatásának additív jellegű növekedését tapasztaltuk.

Streptozotocinnal kezelt patkányok 1-es típusú diabétesze a metabolikus neuropátiás fájdalom elfogadott modellje az irodalomban. Meghatároztuk a plazma és a liquor NC és nocisztatin szintjét. A liquor mintákat a foramen occipitale magnumon át vettük. A plazma NC szintje az életkorral növekszik és 12 hetes életkorra stabilizálódik. A tartósan fennálló diabétesz nem okozott szignifikáns változást a NC szintben. Ezzel ellentétben a nocisztatin koncentrációja szignifikánsan megemelkedett a diabétesz fennállásának 12. hetére. Adataink arra utalnak, hogy a két aktív peptid (NC, nocistatin) felszabadulása prepronociceptinből, más-más szabályozó mechanizmus szerint történik.

A NC kutatás jelenleg az analízis stádiumában van. A szint-mérésekből levonható következtetéseket értelmezik. Nélkülözhetetlen a szintézisre való törekvés. Csak az integratív szemlélet vezethet az aktív peptidok fiziológiai, patofiziológiai szerepének megismeréséhez.

## **8. Következtetések**

A kísérleteinkből az alábbi, gyakorlati szempontból is fontos, következtetések szűrhetők le:

1. A (-)-deprenylből, mind in vitro, mind in vivo kísérletekben számottevő mennyiségű deprenyl-*N*-oxid (DNO) képződik. A reakció nem csupán új sztereocentrumot hoz létre, de megnöveli a vegyület polaritását is. Így a DNO nem penetrál a központi idegrendszerbe, a neuronokba. A DNO egy része azonban visszaalakul deprenyllé, ami már rendelkezik a jól penetráló deprenyl tulajdonságaival.

A (-)-deprenyl dózis-hatásgörbéje harang alakú. Nagy koncentrációban ( $10^{-3}$ M) proapoptotikus, míg alacsony koncentrációban ( $10^{-9}$ - $10^{-13}$  M) antiapoptotikus hatással rendelkezik. Fennáll tehát a veszélye annak, hogy a preventív célból adott (-)-deprenyl mennyisége nagyobb az optimálisnál és a vegyület proapoptotikus hatása érvényesül. Ez nem fordulhat elő a DNO-nál, amikor csak a belőle visszaképződő (-)-deprenyl antiapoptotikus hatású. Ezzel egybehangzóan korábban leírtuk, hogy a DNO még  $10^{-3}$ M koncentrációban sem hoz létre apoptózist.

2. A (-)-deprenyl intenzív „first pass” metabolizmusa arra utal, hogy a parenterális adagolás során más farmakokinetikai tényezőkkel kell számolni. Így a transzdermálisan adott gátlószer az emberi terápiában p.o. adott napi dózisban (5-10 mg/nap) olyan vérszintet biztosít, ami már a MAO-A enzimet is bénítja, elveszítve szelektivitását. A MAO-A gátlás következtében antidepresszív hatása jön létre úgy, hogy a gasztrointesztinális rendszer MAO-A enzime nincsen bénítva olyan mértékben, hogy sajátreakciót idézne elő. A deprenyl szintézisének megfogalmazott cél a farmakokinetikai ismeretek hatására vált realitássá. Az Egyesült Államokban forgalomba hoztak az antidepresszív terápia céljára deprenyl tartalmú transzdermális készítményt Emsam néven, bővítve a vegyület terápiás indikációját.

3. Az SSAO enzim fiziológiai és pathofiziológiai szerepének feltárását különböző betegségekben gátolja, hogy nincs egy alkalmas, hatásos és szelektív

gátlószer, ami humán vizsgálatokban is alkalmazható lenne. Kísérleteink arra utalnak, hogy a carbidopa – ami a Duellin egyik komponense - hiányt pótló ezen a téren, klinikailag alkalmas hosszú időre SSAO enzimgátolt állapotot létrehozására, amikor az enzimgátlás szerepe tanulmányozható.