

A p-BRÓM-METILAMFETAMIN (V-111) SORSA A SZERVEZETBEN

MAGYAR KÁLMÁN az orvostudományok kandidátusa, TEKES KORNÉLIA, ZÓLYOMI
GÁBOR, SZÜTS TAMÁS és KNOLL JÓZSEF az MTA levelező
tagja

Közlésre érkezett: 1977. II. 10.

Egy évtizeddel ezelőtt széles körű kutatás indult el intézetünkben azzal a céllal, hogy az amfetamin, illetve a metilamfetamin kémiai szerkezetének változtatásával a központi idegrendszer szelektívebben befolyásoló amfetamin származékokhoz jussunk. Ennek a kutatásnak az eredményeként született a fenil-izopropil-metil-propinilamin, Deprenyl, mely a monoaminooxidáz „B” formájának szelektív bénítója (Knoll és mtsai 1964, 1965a; Knoll és Magyar 1972a, b; Knoll 1976; Magyar és Knoll 1970), valamint a p-Br-metilamfetamin is (V-111), mely főleg a központi idegrendszer szerotonin (5-HT) regulációjára fejt ki hatását. A V-111 farmakológiai és biokémiai hatásaival számos korábbi dolgozatunk foglalkozik (Knoll és mtsai 1965b, 1966, 1967; Knoll 1970; Knoll és Vizi 1970a, b; Knoll és Magyar 1971; Knoll és mtsai 1970, 1972a, 1973; Magyar és mtsai 1971, 1972, 1976a; Magyar 1972; Magyar és Knoll 1973, 1975a, b, c, d). Ezekben a dolgozatokban leírtuk, hogy a vegyület különösen erősen és tartósan gátolja a ^3H -5-HT agyi szinaptoszomális felvételét, valamint csökkenti a központi idegrendszer 5-HT koncentrációját. A vegyület hatástartama patkánykísérletekben messze meghaladja az amfetaminét és a metilamfetaminét, ezért célszerűnek látszott megvizsgálni, hogy a tartós hatás — mely különösen kifejezett volt a fenti biokémiai paraméterek vonatkozásában — mennyiben hozható összefüggésbe a vegyület szerkezetbeni sorsával.

Jelen dolgozatunkban az erre irányuló kísérleteink eredményeit foglaljuk össze. A V-111 szerkezeten belüli sorsát néhány vonatkozásban összehasonlítottuk a metilamfetaminével. A vizsgálatokhoz a vegyületek radioaktív módosulatait használtuk.

Anyagok és módszerek

Jelzett vegyületek: 1-(4-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(1- ^{14}C), specifikus aktivitás: 3,82 mCi/mmól (V-111-1- ^{14}C); 1-(4-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(3- ^{14}C), specifikus aktivitás: 3,67 mCi/mmól, (V-111-3- ^{14}C); (+)-1-(4-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(metil- ^{14}C), specifikus aktivitás:

0,704 mCi/mmól, ((+)-V-111-metil- ^{14}C); (—)-1-(4-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(metil- ^3H), specifikus aktivitás: 401,0 mCi/mmól, ((—)-V-111-metil- ^3H); ($\pm$)-1-(4-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(metil- ^3H), specifikus aktivitás: 282,0 mCi/mmól, (($\pm$)-V-111-metil- ^3H); 1-fenil-2-metilaminopropán·HCl-(3- ^{14}C), specifikus aktivitás: 1,56 mCi/mmól, (MA- ^{14}C); 1-(2-brómfenil)-2-metilaminopropán·HCl-(2- ^3H), specifikus aktivitás: 636,0 mCi/mmól, (V-104- ^3H); 1-fenil-2-metilaminopropán·HCl-(2- ^3H), specifikus aktivitás: 690,0 mCi/mmól, (MA- ^3H); 1-(4-brómfenil)-2-aminopropán·HCl-(1- ^{14}C), specifikus aktivitás: 3,82 mCi/mmól (nor-V-111-1- ^{14}C); 4-brómbenzoesav-(7- ^{14}C), specifikus aktivitás: 9,84 mCi/mmól; 4-brómhippursav-(7- ^{14}C), specifikus aktivitás: 9,84 mCi/mmól; 4-brómfenilecetsav-(1- ^{14}C), specifikus aktivitás: 3,62 mCi/mmól.

A jelzett vegyületeket a Gyógyszerkutató Intézet Radiokémiai Laboratóriumában Dr. Bánfi Dezső munkacsoportja szintetizálta.

Kísérleti állatok

Kísérleteinkben általában CFLP specifikációjú hím egereket ($20 \pm \text{lg}$) és CFY hím patkányokat ($100 \pm 5\text{g}$) használtunk (LATI).

Egésztest autoradiográfia

A kísérleteinket Ullberg módszerével végeztük (1954). A vizsgálatokhoz hím (20 g) és terhes (35—40 g) egeret használtunk. A terhes állatok 4 nappal voltak a szülés előtt. Az egereknek $5 \mu\text{Ci}/20 \text{ g}$ V-111-3- ^{14}C -et adtunk intravénásan (18,1 mg/kg), $25 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ -es oldatból. A vegyület beadása után különböző idő elteltével (30 másodperctől 24 óráig) az egereket enyhe éternarkózisban vizes karboximetilcellulózba (CMC) ágyasztuk be, majd a beágyazott állatot szárazjéggel telített hexánba mártottuk (-75°C). Ezután a megfagyott blokkot -15°C -on tároltuk néhány napig és ugyancsak ezen a hőmérsékleten végeztük el a metszést. Az egerekből sagittális irányban, Leitz 1300 típusú microtommal 20μ -os metszeteket készítettünk úgy, hogy azok egy speciális ragasztószalagon rögzüljenek (Minnesota Mining and Manufacturing Co. No. 810). A metszeteket -15°C -on szárítottuk néhány napig, majd a szárítás után fokozatosan szobahőmérsékletre melegítve tároltuk azokat. Az expozícióhoz, melyet -15°C -on végeztünk, röntgenfilmet (Geavert) használtunk. A megfelelő expozíciós idő (néhány naptól néhány hét) elteltével a filmeket előhívtuk.

Egy esetben $500 \mu\text{Ci}$ V-104- ^3H -at adtunk terhes egérnek intravénásan $0,2 \text{ ml}$ térfogatban. A V-104- ^3H -t inaktív vegyülettel hígítottuk úgy, hogy az egér

10 mg/kg V-104-et kapjon. Egyebekben csak az expozícióhoz használt film volt eltérő a ^{14}C esetében alkalmazott eljárástól. ^3H -jelzett vegyület autoradiográfiájához Ilford nuclear G—5 típusú lemezeket használtunk. Ebben az esetben az expozíciós idő fél év volt.

A relatív megoszlási hányados meghatározása

A vizsgálandó anyagokat (MA- ^{14}C , V-111-3- ^{14}C , V-104- ^3H) 20 ml-es üveg dugós csőbe helyeztük, mely 5 ml petrolétert (BDH, forrpontja 60—80 °C) és 5 ml 0,1 M-os foszfát puffert (pH 7,2) tartalmazott. A vizsgált anyagok koncentrációja kiinduláskor 0,5 mg/ml volt a pufferre vonatkoztatva, amely csővenként 5 μCi radioaktivitást tartalmazott. A specifikus aktivitást hideg anyag hozzáadásával biztosítottuk. 20 perces rázás után (22 °C) a vizes és a szerves fázisból mintákat vettünk és a radioaktivitást Bray-oldatban folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg (Intertechnique S. L. 40). A petroléterben mért abszolút aktivitást a pufferben mértéhez hasonlítottuk. Kiszámítottuk a vegyületek metilamfetaminhoz viszonyított relatív megoszlási hányadosát is.

A radioaktivitás mennyiségi meghatározása a szövetekben

20 grammos hím egereknek a radioaktív anyagot intravénásan, subcutan, illetve per os adtuk be. A kezelés után különböző idő elteltével az állatok fejét és mellkasát 10—20 másodpercre —75 °C-os szárazjéggel telített hexánba mártottuk és a shock-halál állapotában szívpunkcióval vettünk vért. Ezután az egereket dekaptáltuk és a kiválasztott szövetekből mintákat vettünk. A pontosan mért vérmintákat (25 mg), az egyik agy-féltékét, ill. 20—25 mg barna-zsír szövetet folyadék-szcintillációs edényekbe helyeztük, 0,5 ml Soluene TM 100 (Packard) szövetoldószerrel 12 órán át szobahőn feloldottuk és a radioaktivitást folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A méréshez edényenként 10 ml toluolt használtunk, mely 0,5% PPO-t és 0,01% POPOP-ot tartalmazott. A szcintillációs oldattal feltöltött mintákat legalább 24 órás várakozás után mértük, hogy kiküszöböljük a Soluene alkalmazása miatt keletkező foszforeszcenciát. A relatív aktivitást (cpm) abszolút aktivitásra (dpm) külső standard segítségével korrigáltuk. A szervek radioaktív koncentrációját (100 mg szövetre vonatkoztatva dpm-ben) 5 kísérlethől mért értékek átlagában $\pm$ S. E. M. adtuk meg.

Kísérleteink egy részében két különböző jelzést (^3H , illetve ^{14}C) tartalmazó vegyület keverékével kezeltük az állatokat és a szövetekben mindkét izotóp-koncentrációt szeparáltan mértük. Az Intertechnique SL 40 készülék

kellő programozás után dpm-re korrigálja a különböző mérési feltételek mellett (quench) mért cpm értékeket. Ennek megfelelően számításba veszi a ^3H csatornába változó mértékben átszóródó ^{14}C aktivitást is. A kísérlet menete egyekben azonos az egy izotóp alkalmazásánál használt eljárással.

Az amfetamin származékok szubcelluláris eloszlása

100 g-os hím patkányokat 20 μCi V-111-1- ^{14}C -vel (19,8 mg/kg), illetve 20 μCi MA- ^{14}C -vel (23,7 mg/kg) vagy 30 μCi V-104- ^3H -val (20 mg/kg, inaktív vegyülettel hígítva) kezeltünk intravénásan. A kezelés után 30 perc múlva a patkányokat dekapitáltuk, kivettük az állatok agyát és Potter-rendszerű üveghomogenizátorral 0,25 M-os szacharózzal 10%-os agyhomogenizátumot készítettünk. A homogenizátumból a szubcelluláris frakciókat differenciálcentrifugálással preparáltuk. A szubfrakciókból vett 0,1 ml-es minták aktivitását Soluene-kezelés után folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A különböző centrifugálási sebességeknél ülepedő radioaktivitás mértékét a kiindulási homogenizátum aktivitásához hasonlítva, százalékosan adtuk meg $\pm$ S. E. M.

Kiürülési vizsgálatok

100 g-os patkányokat intravénásan kezeltünk radioaktív jelzett vegyületekkel. Az állatok V-111-1- ^{14}C -ből, V-111-3- ^{14}C -ből, illetve MA- ^{14}C -ből 10 μCi -t kaptak (9,9, 7,23, ill. 11,8 mg/kg). Az állatokat 72 órán keresztül Simax anyagsere edényben tartottuk és külön gyűjtöttük az állatok székletét és vizeletét. A kiürült radioaktivitást folyadék-szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A kumulatív ürülés mértékét a beadott dózis %-ában adtuk meg.

A kísérletek egy részében a V-111 előkezelés hatását vizsgáltuk a vegyület vizeletürítésére. A patkányokat (100 g, hím) naponta kezeltük 15 mg/kg (s. c.) inaktív V-111-el, majd a kezelés végén az állatok 10 μCi , (9,9 mg/kg) V-111-1- ^{14}C -et kaptak intravénásan és ezt követően 48 órán át Simax metabolikus edényben gyűjtöttük a vizeletet és az előző módon határoztuk meg az ürülő radioaktivitás mennyiségét.

A vizeletben ürített V-111 metabolitok kromatográfiás vizsgálata

Jelzett V-111-el kezelt (V-111-1- ^{14}C vagy V-111-3- ^{14}C) hím patkányok (100 g) 24 órás vizeletének felét pH 10-nél majd pH 1-nél, étterrel extraháltuk. A bázikus pH-nál nyert extraktum tartalmazta a *bázikus* és *semleges* karakterű anyagokat (A-extraktum), míg a savas pH-nál kapott, a *savas* jellegű metaboli-

tokat (*B-extraktum*). Az éteres oldatokat vákuumban bepároltuk, és a maradékból metanolos törzsoldatokat készítettünk. A vizelet másik felének feloldozása annyiban különbözött, hogy extrakció előtt 1 órán át 100 °C-on 5 N sósavval hidrolizáltuk.

A kromatogramokat Kieselgel PF₂₅₄₊₃₆₆ rétegen készítettük, kivéve ha a réteg lekaparásával kvantitatív méréseket végeztünk. Ilyenkor Kieselgel-G réteget használtunk. A kromatogramokról gondos szárítás után Forte röntgenfilmmel 60–120 órás expozíciós idő mellett kontakt autoradiogramot készítettünk.

Az alábbi oldószereket használtuk a futtatáshoz:

- I. Butanol—víz—ecetsav (4 : 1 : 1).
- II. Butilacetát—butanol—cc. NH₄OH (20 : 10 : 1).
- III. Ciklohexán—dioxán—ecetsav (35 : 35 : 1).

A fenti futtató rendszerekkel egy- és kétdimenziós kromatogramokat készítettünk.

Kísérleteink egy részében a 0–12, 12–24 és 24–48 órás patkányvizelet vékonyréteg kromatogramjáról (Kieselgel-G) lekapartuk a V-111-1-¹⁴C-nek és a demetilált metabolitnak (nor-V-111-1-¹⁴C) megfelelő foltokat és folyadék-szintillációs módszerrel meghatároztuk azok aktivitását.

A metabolitok gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC/MS) vizsgálata

15 mg/kg V-111-el kezelt patkányok 0–24 óráig gyűjtött vizeletét Amicon UM—2 membránon szűrtük. A membrán csak az 1000-nél kisebb molekulájú vegyületeket engedi át. Az ultraszűrletet lúgos (pH 9), majd savanyú (pH 1) kémhatás mellett éterrel extraháltuk és a két szerves fázist egyesítés után bepároltuk. A maradékot metanolban feloldottuk és 1 µl mennyiségeket vittünk be a GC/MS készülékbe (Jeol, JMS—D 100 + JGC 20 K). A gázkromatográfiás elválasztást total ion monitor (TIM) segítségével detektáltuk és a szeparálódott anyagokat reprezentáló csúcsokról tömegspektrumot vettünk fel. A tömegspektrumok alapján a brómot tartalmazó csúcsokról pontos tömegmérést is végeztünk számítógép segítségével.

Az N-demetiláció vizsgálata in vitro és in vivo kísérletekben

A V-111 N-demetilációját a vegyület N-metil jelzett módosulatának felhasználásával vizsgáltuk. A májmikroszómát Sutherland és mtsai módszerével preparáltuk (1949). A májat háromszoros térfogatú 0,15 M-os KCl oldatban homogenizáltuk, mely 0,02 M Tris puffert (pH 7,4) tartalmazott. A homogenizátumot 15 percig 9000 g-vel, majd a felülúszót 60 percig 100 000 g-vel centrifugáltuk. 10 g májszövetből preparált mikroszomális üledéket 5 ml homogenizáló oldatban vettünk fel.

A demetilációhoz használt inkubációs oldat (0,15 M KCl és 0,02 M Tris puffer, pH 7,4) 3,0 ml térfogatban 5 mM glukóz-6-foszfátot, 5 mM MgCl_2 -ot, 0,33 mM NADP-t és 0,7 Kornberg-egység élesztőből preparált glukóz-6-foszfát-dehidrogenázt (BDH) tartalmazott. A szubsztrátkoncentráció $1-8 \times 10^{-4}$ M, a mikroszóma mennyisége 1 mg fehérje/ml volt. A reakciót 5 perces előinkubálás (37,5 °C) után a szubsztrát hozzáadásával indítottuk. 10 perces inkubáció után 1,0 ml 5%-os ZnSO_4 hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A denaturált fehérjét 1500 g-vel 10 percig üleptítettük és a felülúszót használtuk a meghatározásokhoz.

Kísérleteinkben az N-demetiláció során keletkező aktív formaldehidet Amberlite XAD—2 gyantával (60—80 mesh) választottuk el a demetilálatlan V-111-től Thompson és Holtzman módszerével (1973).

A gyantát az ágy-térfogatnak megfelelő metanolban kétszer 2 órán át duzzasztottuk, majd háromszor mostuk a metanollal azonos mennyiségű desztillált vízzel és belőle 1×8 cm-es oszlopot készítettünk. A minta felvitele előtt 50 ml desztillált vízzel mostuk az oszlopot.

1,0 ml fehérjementesített reakcióelegy felvitele után 50 ml desztillált vízzel eluáltunk. Az aktív HCHO -t az eluátum 5—8 ml-e tartalmazta. Ennek mennyiségét folyadék-szcintillációs módszerrel (10 ml Bray-oldatban 0,5 ml vizes minta) határoztuk meg. A demetiláció mértékét — legkevesebb 5 kísérletből — a képzett formaldehid mennyiségével $\mu\text{mol/g}$ fehérje/perc $\pm$ S. E. M. jellemeztük. Az oszlop 50 ml desztillált vizes mosás után újabb minta elválasztására alkalmas és a mérés egy oszlopon legkevesebb 10—15-ször ismételhető a háttéraktivitás emelkedése nélkül. Ezután a teljes regenerálást 50 ml metanollal és 100 ml desztillált vízzel végeztük.

Az oszlopon inaktív formaldehiddel kontrolláltuk a visszanyerést. A formaldehidet Nash szerint (1953) fotometriás módszerrel, 412 nm-nél határoztuk meg. A formaldehid a 4. ml-ben jelenik meg és 10 ml-ig $99,5 \pm 1\%$ -os volt a visszanyerése. Az elúcióhoz használt 50 ml desztillált vízzel történő mosás során a V-111 összesen $3,6 \pm 0,42\%$ -át kaptuk vissza ebben a térfogatban. Az oszlop többszöri használatát nagy kapacitása teszi lehetővé, teljes regenerálását azonban csak a metanolos és vizes kezelés biztosítja.

Kísérleteink egy részében humán (férfi) májból készített mikroszóma preparátum N-demetilációs aktivitását vizsgáltuk meg (+)-V-111-metil- ^{14}C szubsztrát használatával mellett.

Az eredmények és azok megbeszélése

A V-111-3- ^{14}C kvalitatív szöveti eloszlását és annak időbeni változásait egérkísérletekben, a vegyület i. v. beadása után az egésztest autoradiogramok szemléltetik (1—6. ábra). Az erősen lipidoldékony vegyület (I. táblázat)

I. táblázat

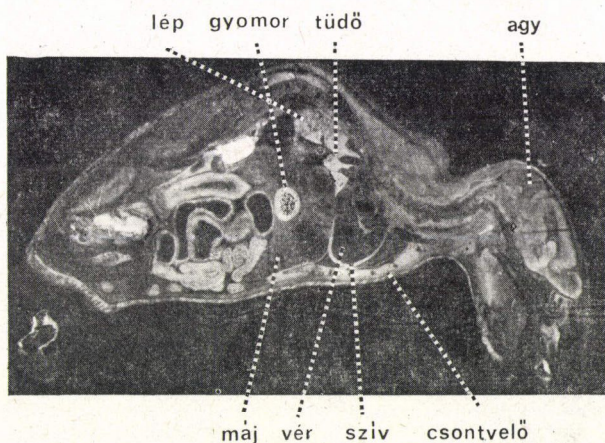
Amfetamin származékok relatív megoszlási hányadosai

Vegyületek	Megoszlási hányados $\frac{\text{koncentráció petroléterben}}{\text{koncentráció pufferben}}$	Relatív oldékonyság petroléterben
MA- ¹⁴ C	$0,0703 \pm 0,002$	1,0
V-104- ³ H	$0,3558 \pm 0,027$	5,09
V-111- ¹⁴ C	$0,5628 \pm 0,003$	8,03

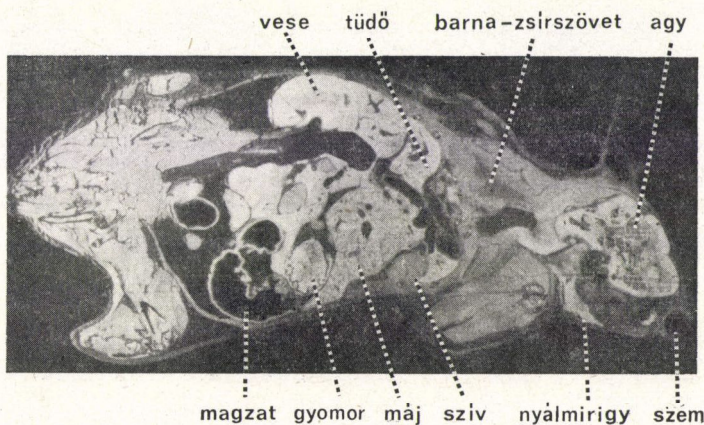
Petroléter: BDH, forrpont 60–80 °C.

Foszfát puffer: 0,1 M, pH 7,2.

Hőmérséklet: 22 °C.

Kísérlet átlaga: $\pm$ S.E.M.

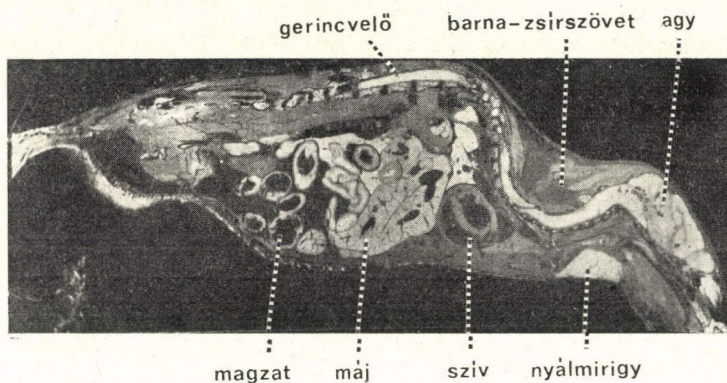
1. ábra. Hím egér egésztest autoradiogramja 0,5 perccel a V-111-3-¹⁴C i.v. beadása után.
(5 μ Ci/állat (20 g); 18,1 mg/kg; 0,2 ml térfogatban)



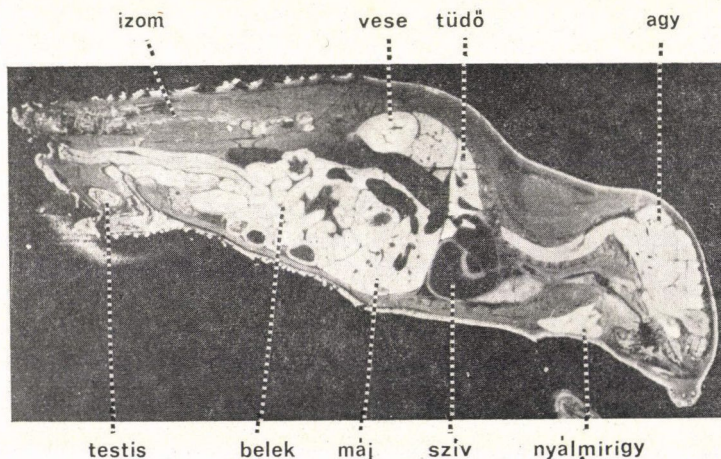
2. ábra. Terhes egér egésztest autoradiogramja 5 perccel a V-111-3-¹⁴C i.v. beadása után (10 μ Ci/állat (40 g); 18,1 mg/kg; 0,4 ml térfogatban)

gyorsan eloszlik a szövetekben. Már 30 másodperc múlva magas koncentrációt ér el a központi idegrendszerben (1. ábra), ahol koncentrációja az 5. percre tovább nő (2. ábra), és tartósan magas szinten marad. Még a 4 órás autoradiogramon is mennyisége az agyszövetben a máj, illetve a vese aktivitási szintjéhez hasonló (5. ábra). 24 óra múlva a vegyület jelentős része kiürül a szervezetből, de még ilyenkor is számottevő aktivitás látható az egér központi idegrendszerében (6. ábra).

A V-111 koncentrációja a barna-zsírszövetben is, mint a központi idegrendszerben gyorsan emelkedik (30. másodperc). Ez a párhuzamosság a két szerv között, a lipid-oldékony vegyületek eloszlása során gyakran észlelt jelenség. Míg azonban az agyi koncentráció az 5. percre tovább nő és tartós marad, a barna-zsírszöveté ekkorra jelentősen csökken (2. ábra) és a 20–60. percben az utóbbiban már csupán háttéraktivitás látható (3., 4. ábra). A két



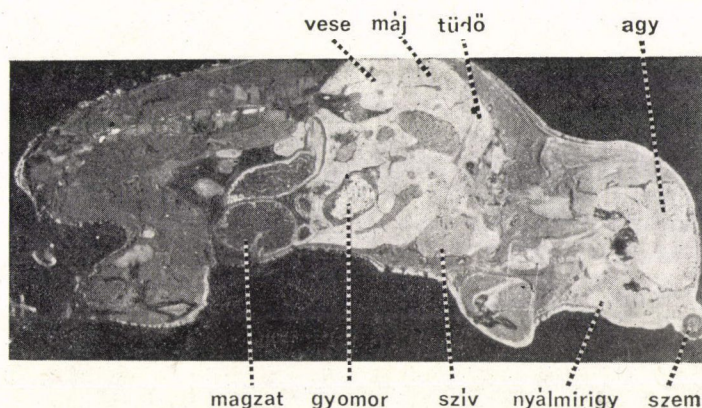
3. ábra. Terhes egér egésztest autoradiogramja 20 perccel a V-111-3-¹⁴C i.v. beadása után. Kísérleti körülmények a 2. ábránál



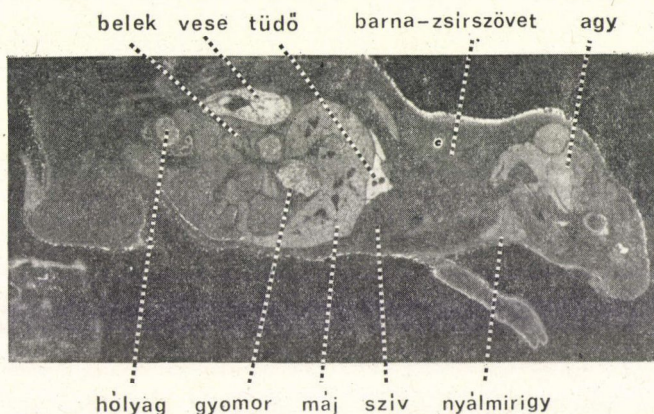
4. ábra. Hím egér egésztest autoradiogramja 1 órával a V-111-3-¹⁴C i.v. beadása után. Kísérleti körülmények az 1. ábránál

szerv szöveti szintjének változásában észlelt eltérés a V-111-nek vagy metabolitjának erős központi idegrendszeri kötődésére utal.

Az aktivitási szintek gyors emelkedését mutatja a tüdő is, ahol még a 24 órás autoradiogramon is a többi szervhez viszonyítva szinte legmagasabb a radioaktivitás szintje. A máj szöveti koncentrációja lassabban emelkedik és csak az 5. percben éri el a legmagasabb szintjét (2. ábra). Ezt követően a máj aktivitásának lassú csökkenése követhető az autoradiogramokon.



5. ábra. Terhes egér egésztest autoradiogramja 4 órával a V-111-3- ^{14}C i.v. beadása után. Kísérleti körülmények a 2. ábránál



6. ábra. Hím egér egésztest autoradiogramja 24 órával a V-111-3- ^{14}C i.v. beadása után. Kísérleti körülmények a 2. ábránál

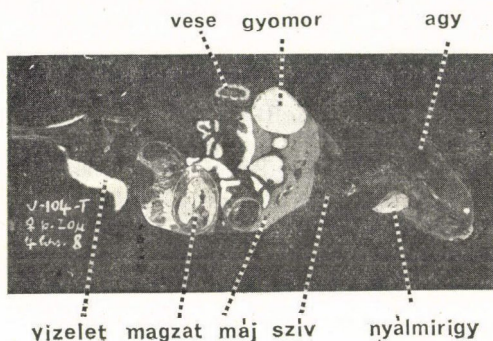
A szerv-koncentrációk gyors emelkedésének megfelelően a szívben látható vér aktivitásának gyors csökkenése egybehangzóan bizonyítja a V-111 gyors kiáramlását a szövetekbe. A szívizom már a 30. másodpercben a vértől több V-111-et tartalmaz, és benne a kísérleti periódus alatt végig jelentős aktivitás látható.

A lipid-oldékony bázikus vegyületekre jellemzően (Schanker 1961) gyorsan kiválasztódik a vegyület a gyomorban és ott magas koncentrációt ér el (1., 2., 5. ábra).

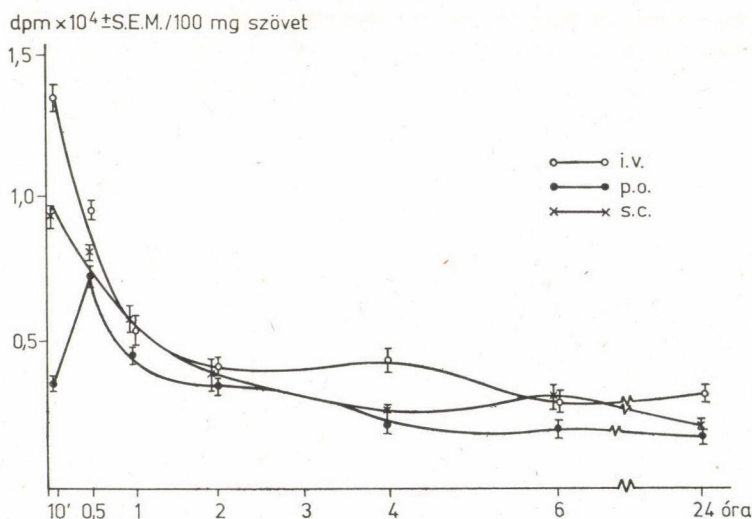
A 2., 3., 5. ábrák terhes egerek autoradiogramjai. Mint látható, a magzati szövet a placentában észlelt magas aktivitás ellenére szinte nem tartalmaz radioaktivitást. Nem penetrál jól a vegyület a szembe sem (2. ábra), bár az 5. ábrán a lencse területén enyhe kirajzolódás látható.

Az izomrendszerben alacsony koncentrációt észleltünk az egész kísérlet folyamán (4—5. ábra).

A vese (2., 4., 5., 6. ábra) és a hólyag (6. ábra) magas aktivitása a vegyület kifejezett vizeletürítésére utal, de kiválasztódik a vegyület a nyálmirigyeken keresztül is (2., 6. ábra).



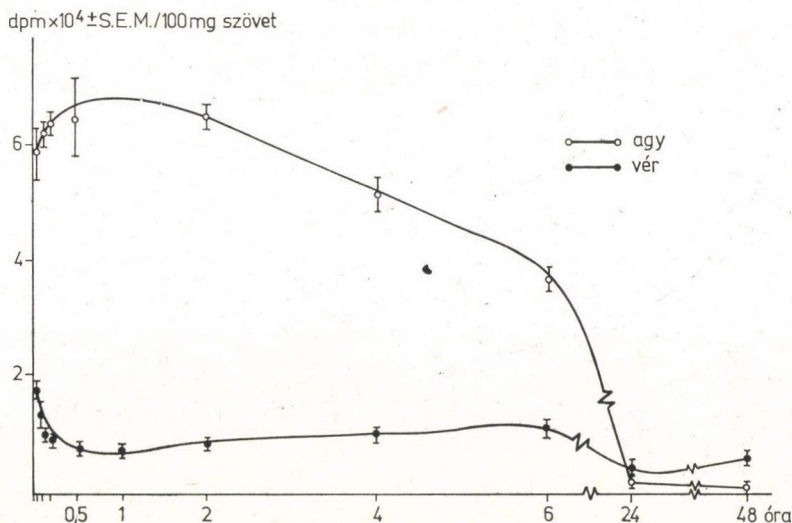
7. ábra. Terhes egér egésztest autoradiogramja 4 órával a V-104-³H i.v. beadása után. (500 μ Ci/állat; 10 mg/kg; 0,2 ml térfogatban)



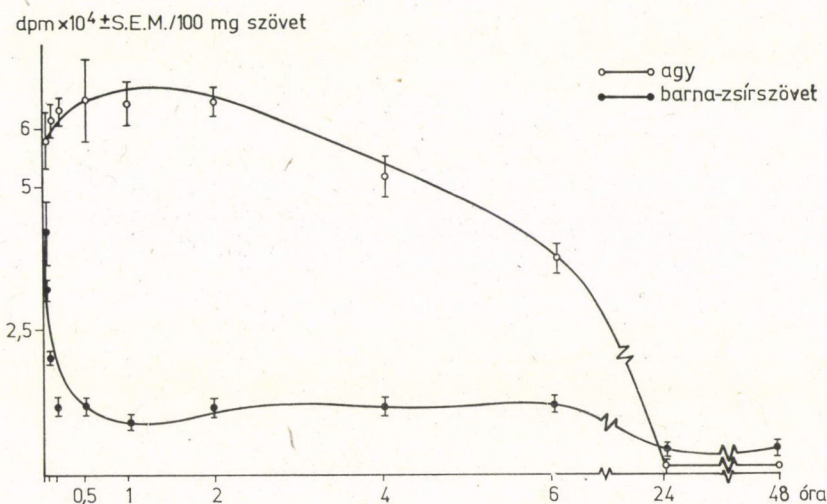
8. ábra. A vér radioaktivitásának változása egérikísérletekben a V-111-1-¹⁴C i.v., s.c., ill. p.o. beadása után. Dózis: 24,7 mg/kg. 5 μ Ci/20 g egér. 5 kísérlet átlaga $\pm$ S.E.M.

A bélfal főleg a 20–60. percg jelentős mennyiségű izotópot tartalmaz, a bél lumenében azonban csak kevés aktivitás látható, ami ellene szól a vegyület széketlen keresztül történő intenzív ürülésének.

A 7. ábra a V-104- ^3H eloszlását mutatja 4 órával a vegyület beadása után. Az autoradiográfiás kép két lényeges eltérést mutat a V-111 eloszlásától, amennyiben a központi idegrendszerben kevés, a magzati szövetekben pedig jelentős radioaktivitás található. Ez a jelenség azért érdekes, mivel a két



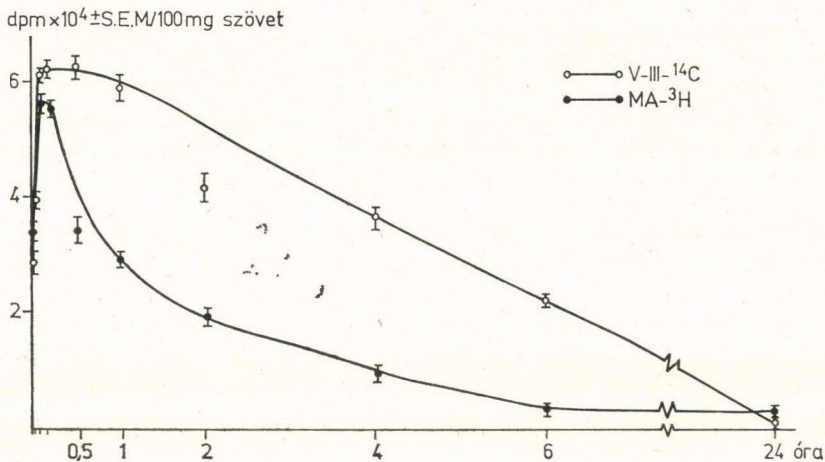
9. ábra. Az agyszövet és a vér radioaktivitásának változása egérikísérletekben a V-111-1- ^{14}C i. v. beadása után. Kísérleti körülmények a 8. ábránál



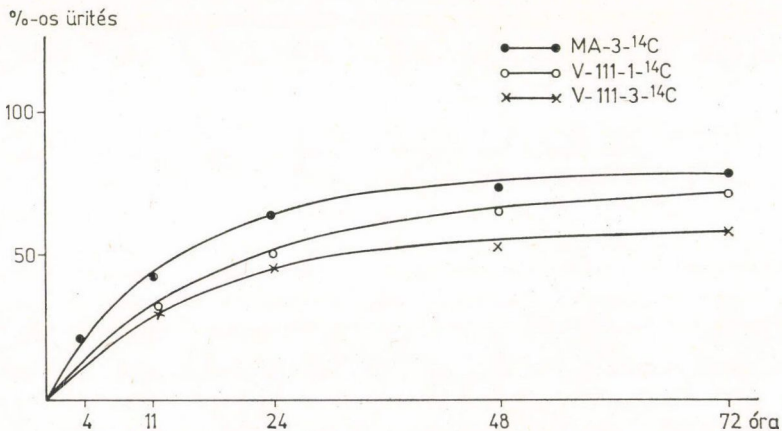
10. ábra. Az agyszövet és a barna-zsír-szövet radioaktivitásának változása egérikísérletekben a V-111-1- ^{14}C i. v. beadása után. Kísérleti körülmények a 8. ábránál

vegyület csupán a bróm pozíciójában tér el egymástól. A V-111 para; a V-104 orto-pozíciójában tartalmazza a halogént. Ez a különbség a vegyületek lipoid-oldékonyságában is jelentős változást eredményezett (I. táblázat).

A V-111 felszívódását a vegyület V-111-1- ^{14}C módosulatával tanulmányoztuk. Az egereket (20 g.) 5 μCi radioaktív V-111-gyel (24,7 mg/kg) kezeltük i. v., s. c., ill. p. o. és különböző időközökben a szívből vett vérben határoztuk meg a radioaktivitás koncentrációját (8. ábra). Az eredmények azt bizonyítják,



11. ábra. Az agyszövet ^3H és ^{14}C radioaktivitásának változása egérkísérletekben a V-111-1- ^{14}C és a MA- ^3H i.v. beadása után. A két jelzett vegyület oldatait előre összekevertük és azután adtuk be, 0,2 ml térfogatban az egereknek. Dózis: mindkét vegyületből 9,9 mg/kg, 2 $\mu\text{Ci}/20$ g egér volt. A MA- ^3H esetében inaktív MA hozzáadásával biztosítottuk a V-111-el azonos radioaktív koncentráció mellett az azonos farmakológiai dózist. 5 kísérlet átlaga $\pm$ S.E.M.



12. ábra. A vizelettel ürített radioaktivitás kumulatív változása V-111-1- ^{14}C , V-111-3- ^{14}C , illetve MA- ^{14}C i.v. beadása után patkánykísérletben. Dózis: V-111-1- ^{14}C -ből 9,9 mg/kg, V-111-3- ^{14}C -ből 7,23 mg/kg, MA- ^{14}C -ből 11,8 mg/kg. A radioaktív dózis mindhárom vegyületből 10 $\mu\text{Ci}/100$ g patkány volt. 3 kísérlet átlaga

hogy a vegyület hamar felszívódik a bőr alatti kötőszövetből és a gyomor-béltraktusból is. Az első esetben 10, a másodikban 30 perc múlva mértük a vegyület legmagasabb vérszintjét, ami a gyors felszívódást jelzi. Az i. v. beadás után észlelt gyors koncentráció-csökkenés a vérben, amit az autoradiogramok is mutattak, a vegyület intenzív szöveti penetrációjára utal. A 24 órás kísérlet görbék alatti területének összehasonlításával azt kaptuk, hogy az s. c., ill. p. o. beadás utáni görbe alatti területek az i. v.-hez viszonyítva 81,3, ill. 64,9%-nak adódtak, ami egyértelműen a vegyület jó felszívódását bizonyítja.

A kvantitatív jellegű eloszlási vizsgálatainkban a V-111 agyi koncentrációjának változását kísértük elsősorban figyelemmel. A V-111- ^{14}C -vel intravénásan kezelt állatok agyi koncentrációjának kinetikáját a vérhez viszonyítva a 9. ábra mutatja. Az egésztest autoradiográfiás vizsgálatokkal egybehangzóan, a kvantitatív mérések is a V-111 gyorsan kialakuló, magas és tartós koncentrációját bizonyítják az agy szövetében.

Az agyi koncentráció alakulását összehasonlítottuk a barna-zsír-szövetével, mivel nagyszámú egésztest-autoradiográfiás vizsgálatunk azt bizonyítja, hogy a lipoidoldékony enyhén bázikus vegyületek, melyeknek disszociációja a szervezeti pH mellett viaszosul (I. táblázat), mindkét szervben gyorsan, magas koncentrációt érnek el és ez a koncentráció a továbbiakban is általában párhuzamosan alakul (Magyar 1968, 1973; Magyar és Knoll 1970; Knoll és mtsai 1975a, b; Magyar és mtsai 1976b). A két szerv radioaktív koncentrációjának változását a 10. ábra mutatja. Mint látható, a radioaktivitás magas szintje mindkét szervben egyszerre kialakul, azonban csak a barna-zsír-szövetben észleltük annak gyors csökkenését. A barna-zsír-szövet koncentrációjának többszöröse található az egerek központi idegrendszerében. A görbék alatti területek összehasonlítása azt mutatja, hogy a 24 órás periódusban az agyszövetben a barna-zsír-szövet V-111 koncentrációjának 4,54-szerese található.

A V-111 tartós és magas agyi koncentrációja jó összhangban áll tehát a vegyület ugyancsak tartós — az amfetaminét meghaladó — akut farmakológiai és biokémiai hatásaival (Knoll 1970a; Knoll és Magyar 1971; Knoll, Vizi és Magyar 1972a; Knoll és mtsai 1972b; Magyar és Knoll 1975b; Magyar és mtsai 1976a).

Egy másik kísérlet-sorozatban meghatároztuk a V-111- ^{14}C és MA- ^3H agyi szintjének változását is úgy, hogy a két jelzett vegyületet előre összekeverve, azonos dózisban (a radioaktív dózis is azonos volt) adtuk be intravénásan az egereknek és a ^{14}C ; ill. ^3H -aktivitás változását párhuzamosan követtük a központi idegrendszerben (dózisok az ábra szövegében).

Ennél a módszernél számításba kell vennünk a két vegyület kötési helyekért történő esetleges kompetícióját. Azonban az ebből eredő hátrányt messze meghaladó előnyt biztosít az, hogy a két vegyület agyi koncentrációját

a nagy biológiai szórás ellenére össze tudjuk hasonlítani, mivel azonos kísérleti állatokban és azonos időben vizsgáltuk azok eloszlását. Saját tapasztalatok és az irodalmi adatok alapján azt látjuk, hogy a szöveti kötési helyek szinte kimeríthetetlenek (*Snyder és Bennett 1976*), ezért a két vegyület kötési helyekért történő versengése nem lehet jelentős tényező. Más a helyzet a receptoriális kötődést illetően, ahol a hatásért felelős molekulák kötődését vizsgáljuk (*Ehrenpreis és mtsai 1969*). Az eloszlási kísérletekben azonban helytelen lenne a vegyület megjelenéséből egy szerv specifikus receptoraira következtetni.

A 11. ábrán látható, hogy a V-111 a MA-t meghaladó koncentrációt ér el a központi idegrendszerben és szintje lassabban csökken, mint a MA-é. A két vegyület agyi koncentrációját jelző görbékre számítógépes analízissel két-két exponenciális egyenes illeszthető. A V-111 esetében a rajzolt görbe illeszkedése pontatlan, a számítógép azonban a görbéről kieső értékeket is figyelembe veszi. A belőlük számított agyi felezési idő metilamfetaminnál a gyors csökkenés fázisában $27,8 \pm 1,6$, a lassúbb fázisban $280 \pm 4,8$ perc. A V-111-re vonatkoztatott azonos paraméterek $41,9 \pm 6,04$ és 361 ± 44 percrek adódtak. A görbe alatti területek összehasonlításával azt látjuk, hogy 24 órás periódus alatt a V-111 mennyisége az agyszövetben 2,51-szerese a MA-énak. A V-111 és a MA egymáshoz viszonyított számszerű arányát a vérben és az agyszövetben a II. táblázat mutatja. Az első másodpercben a MA koncentrációja még magasabb, mint a V-111-é, a későbbiek folyamán azonban az utóbbi koncentrációja meghaladja a MA-ét.

II. táblázat

A V-111-1-¹⁴C és a MA-³H koncentrációnak aránya az egér vérében és agyszövetében a két vegyület egyszerre történt intravénás beadása után

Idő (perc)	Vér		Agy	
	V-111/MA	MA/V-111	V-111/MA	MA/V-111
0,5	0,24	4,06	0,83	1,20
5	0,11	9,22	1,08	0,92
30	0,32	3,16	1,78	0,56
60	0,25	3,86	2,03	0,48
120	0,20	4,88	2,56	0,39
360	0,35	2,84	3,84	0,26

Az agyi koncentrációkat a 11. ábra adataiból számítottuk. A vér értékei azonos kísérletről származnak. Kísérleti körülmények a 11. ábra szövegében.

A III. táblázat adatai a MA-³H, a V-104-³H és a V-111-1-¹⁴C szubcelluláris eloszlását mutatják a patkányagy homogenizátum differenciál-centrifugálással nyert frakcióiban. A három vegyületnek a mag és a haemoglobinnal együtt

ülepedő frakcióhoz történő kötődésében alig találtunk eltérést, míg a mitochondriális és mikroszomális frakcióhoz — különösen az előbbihez — legjobban a V-111, közepesen a V-104 és legkevésbé a MA kötődik. Ez a sorrend egyezik a vegyületek lipoid-oldékonyságával is (I. táblázat). A 230 000 g $\times$ 300 perces felülúszóban — mint várható — fordított a vegyületek koncentrációjának sorrendje.

III. táblázat

Metilamfetamin-származékok szubcelluláris eloszlása patkányagy homogenizátumban

g $\times$ idő (perc) üledék	% $\pm$ S.E.M.		
	MA- ¹⁴ C	V-104- ³ H	V-111-1- ¹⁴ C
1 500 $\times$ 10	R** = 1	R = 1,3	R = 0,9
töretlen sejt, sejtmag, mielin	10,45 $\pm$ 0,7	13,73 $\pm$ 1,7	9,71 $\pm$ 1,1
12 000 $\times$ 15	R = 1	2,3	4,3
mitochondrium, mielin, idegvégződés	13,42 $\pm$ 0,7	31,49 $\pm$ 0,5	58,11 $\pm$ 1,8
100 000 $\times$ 60	R = 1	1,3	1,89
mikroszomális frakció	9,80 $\pm$ 0,9	13,30 $\pm$ 0,8	18,61 $\pm$ 1,6
230 000 $\times$ 300	R = 1	0,86	0,69
molekulasúly 80 000 fölött	1,71 $\pm$ 0,6	1,48 $\pm$ 0,3	1,19 $\pm$ 0,11
230 000 $\times$ 300	R = 1	0,64	0,29
felülúszó: molekulasúly 80 000 alatt	62,53 $\pm$ 3,2	40,48 $\pm$ 2,6	18,44 $\pm$ 1,7
visszanyerés	97,3 $\pm$ 1,9	96,99 $\pm$ 1,2	103,23 $\pm$ 1,6

*% = Az egyes frakciók radioaktivitása a homogenizátum kezdeti aktivitásának százalékában.

** R = a MA-hoz hasonlított viszonyszám.

A V-111-1-¹⁴C, a V-111-3-¹⁴C és a MA-¹⁴C kumulatív vizeletürülését a 12. ábra mutatja. Mint látható, a MA-¹⁴C intenzívebben ürül, mint a V-111 két módosulata. Az ábra a V-111 elhúzódó lassú ürülését bizonyítja. A V-111-1-¹⁴C és a V-111-3-¹⁴C, illetve ezek metabolitjainak vizeletürülésében észlelt különbséget nem tartjuk mérési hibának. Ez azt jelzi, hogy a V-111 molekula dezintegrálódik és a leszakadó rész ¹⁴CO₂-vé oxidálódik a szervezetben. Ezt a feltevést igazolta, hogy ha a V-111-3-¹⁴C-vel kezelt állatok kilélegzett levegőjét Soluene-en buborékoltattuk át, a Soluene megkötötte a radioaktív ¹⁴CO₂-t. Ennek mennyisége 48 órán át a beadott radioaktivitás 5–7%-a volt.

A V-111 előkezelés után adott V-111-1-¹⁴C vizeletürülését a IV. táblázat mutatja. 7 napos előkezelés a V-111-nek, illetve metabolitjainak főleg 0–12 óráig és 0–24 óráig ürülő mennyiségét fokozza szignifikánsan. 7 napos kezelést meghaladón az ürülés már nem fokozódik tovább.

IV. táblázat

V-111 előkezelés hatása a V-111-1-¹⁴C-nek és metabolitjainak ürítésére patkánykísérletekben

V-111 kezelés 15 mg/kg s.c.	A vizeletben talált aktivitás a beadott dózis %-ában $\pm$ S.E.M.		
	0–12 h	0–24 h	0–48 h
Egyszeri kezelés	15,9 $\pm$ 2,20	23,75 $\pm$ 4,05	50,3 $\pm$ 3,04
4 napos	14,53 $\pm$ 1,19	36,91 $\pm$ 6,55	66,33 $\pm$ 3,61
7 napos	35,99 $\pm$ 2,53*	54,58 $\pm$ 1,98*	69,74 $\pm$ 2,25
12 napos	30,92 $\pm$ 3,43*	51,42 $\pm$ 2,51*	65,78 $\pm$ 2,48

V-111-1-¹⁴C dózisa: 9,9 mg/kg i. v., 10 μ Ci/állat. A kísérletek száma: 5

* = $p < 0,05$ A szignifikanciát a Student t-tesztel számoltuk.

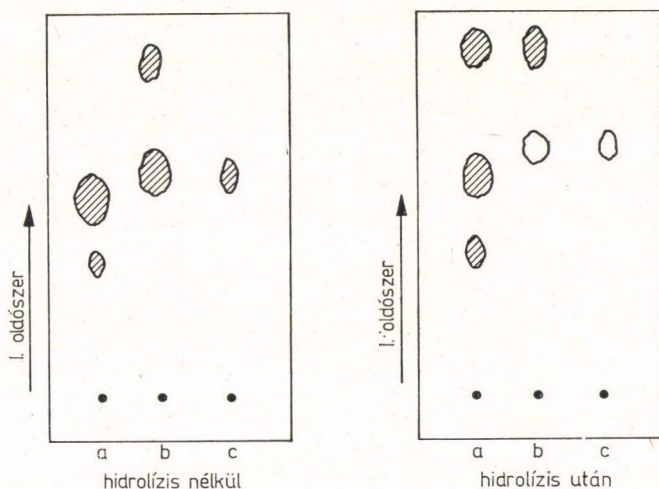
Kísérleteinkben a székleletben is meghatároztuk az ürített radioaktivitás mennyiségét. A székleletet savas (pH 1) és lúgos (pH 10) kémhatás mellett étérrel extraháltuk és az egyesített extraktumban 48 óra alatt a radioaktivitás 10,15%-ával tudtunk elszámolni.

A V-111 tehát lassan ürül ki a pátkány szervezetéből. Egyszeri kezelés után 48 órás kísérleti periódus alatt a vizelettel 50,3, a kilélegzett levegővel 5–7, a széklelettel 10,15% ürül ki a beadott vegyületből (összesen mintegy 65–70%).

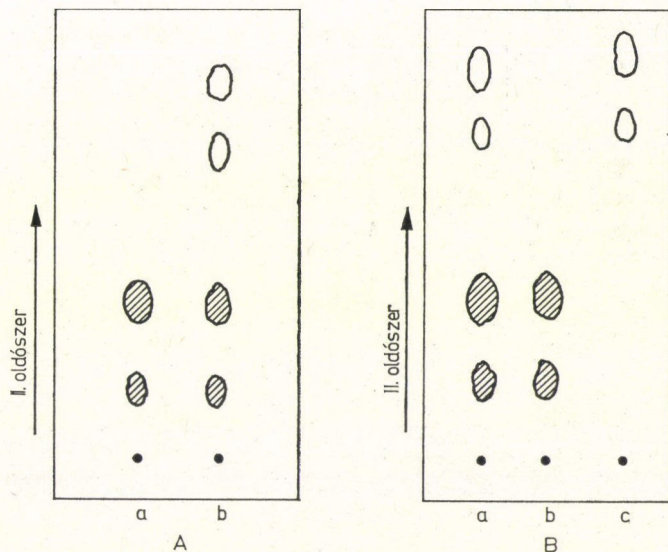
A vizeletből savas, illetve bázikus kémhatás mellett étérrel extrahálható V-111 metabolitok azonosítását vékonyréteg kromatográfiával kíséreltük meg. Nem foglalkoztunk az éteres extrakció után a vizes fázisban maradó metabolitokkal.

A 13. ábrán látható, hogy az A-extraktumban (pH 10-nél extrahált) savas behatásra egy újabb folt jelenik meg, míg a B-extraktumban az egyik folt, valamint a vizes maradékban levő folt intenzitása erősen csökken. Az A-extraktumokat a II. oldószerben is megfuttattuk (14. ábra). Megállapítottuk, hogy a hidrolizált vizeletben két újabb folt jelenik meg (14. ábra A). Nyilván arról van szó, hogy a V-111 metabolitjainak konjugátumai elbomlanak és ezáltal étérrel extrahálhatók a vizeletből. Az A-extraktumot híg sósavval összerázva az alsó két folt a vizes fázisba került, tehát ezek bázisok, míg a hidrolízis során keletkezett felső két folt az éteres oldatban maradt, azaz semleges karakterűek (14. ábra B).

A híg sósavban oldódó anyagokról feltehető volt, hogy bázikus aminos csoportot tartalmaznak, tehát azok a változatlan V-111, illetve annak demetilált származékai (p-brómamfetamin, nor-V-111) lehetnek. Ennek bizonyítását kétdimenziós kromatográfiával végeztük. A 15. ábrán látható, hogy mindkét rendszerben a foltok azonosan mozdulnak el a megfelelő összehasonlító anyagokkal.



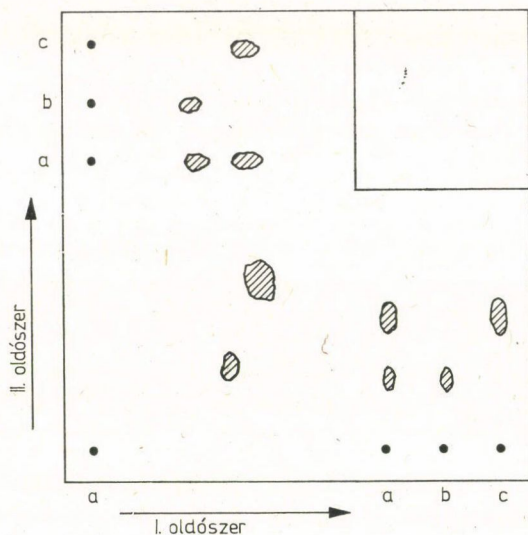
13. ábra. A vizeletből éterrel extrahált V-111 metabolitok vékonyréteg kromatogramja. a = pH 10-nél extrahált metabolitok, A-extraktum; b = pH 1-nél extrahált metabolitok, B-extraktum; c = vizes maradék



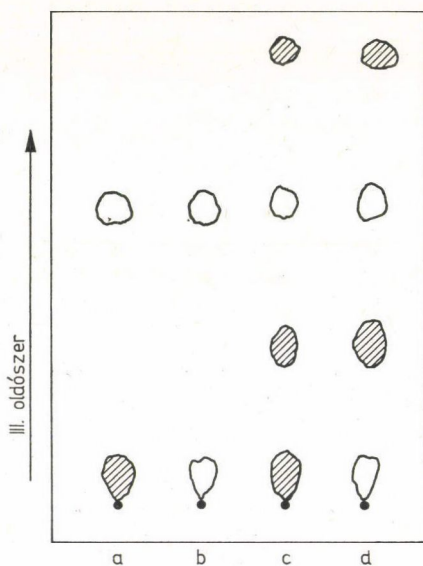
14. ábra. Az A-extraktum vékonyréteg kromatogramja A. a = A-extraktum hidrolízis előtt; b = A-extraktum hidrolízis után. B. a = A-extraktum hidrolízis után; b = A-extraktum savas pH-nál (pH 3) extrahálva, vizes fázis; c = A-extraktum savas pH-nál extrahálva, éteres fázis

Megjegyezzük, hogy az A-extraktum vizsgálatánál a kvalitatív kromatográfiás kép az 1-es és a 3-as számon jelzett vegyületek esetében azonos volt.

A B-extraktum vizsgálatát a III. oldószerben végeztük. A 16. ábrán látható, hogy a savas hidrolízis hatására a startban maradó folt intenzitása

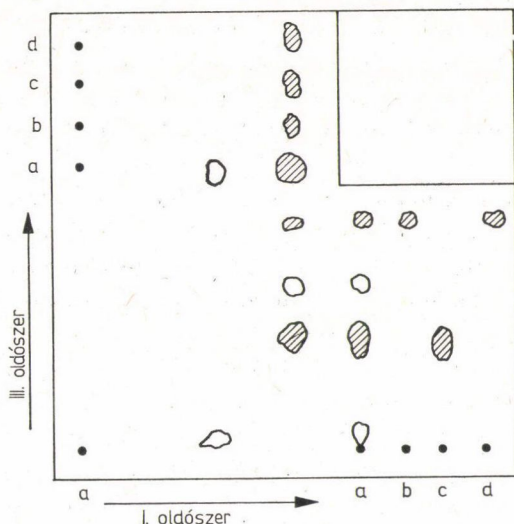


15. ábra. Az A-extraktum híg sósavban oldódó anyagainak kétdimenziós vékonyréteg kromatogramja. a = A-extraktum híg sósavban oldódó része; b = V-111-1- ^{14}C ; c = nor-V-111-1- ^{14}C

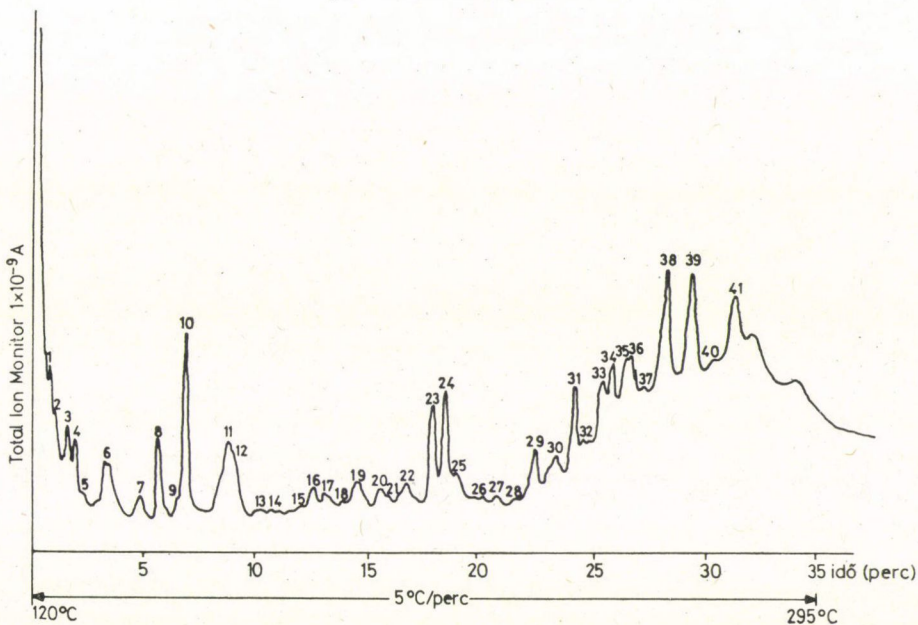


16. ábra. A B-extraktum vékonyréteg kromatogramja. a = B-extraktum 3-as C-jelzés; b = B-extraktum 3-as C-jelzés, savas hidrolízis után; c = B-extraktum 1-es C-jelzés; d = B-extraktum 1-es C-jelzés, savas hidrolízis után

erősen lecsökken (a feltételezett konjugátumok elbomlanak, de a keletkezett anyagok nem savanyú karakterűek). Az 1-es számmal jelzett vegyülettel kezelt állatok vizeletében két olyan folt látható, mely a másik vegyület esetében nem jelentkezik, ami csak úgy magyarázható, hogy a metabolikus változások



17. ábra. A B-extraktum kétdimenziós vékonyréteg kromatogramja. a = B-extraktum I-es C-jelzés; savasan hidrolizált; b = p-brómbenzoészav-1-¹⁴C; c = p-brómhippursav-1-¹⁴C; d = p-brómfenilacetsav-1-¹⁴C



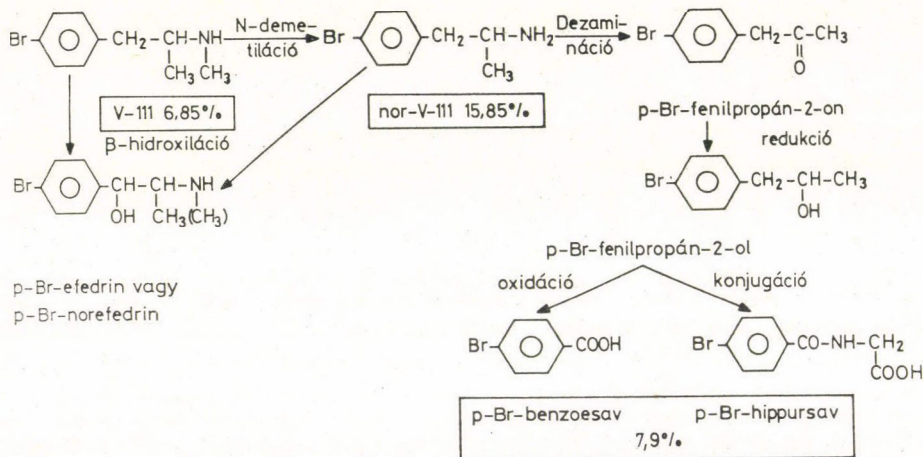
18. ábra. V-111-el kezelt patkányok vizeletéből savas, ill. lúgos pH-nál éterrel extrahált metabolitok gázkromatográfiás elválasztása GC/MS kombinációban. A patkányokat 15 mg/kg V-111-el kezeltük i.v. A vizeletet 24 órán át gyűjtöttük

a molekula dezintegrációjához vezetnek. A molekula dezintegrációjára utalt a V-111 két jelzési pozíciója esetén a vizeletürítésben észlelt eltérés is (12. ábra) patkánykísérletekben. A molekula dezintegrációja feltehetőleg oxidatív átala-

kulás, melynek eredményeként keletkező savas karakterű anyagok a p-bróm-fenilecetsav, p-brómbenzoészav, ill. konjugáció révén a p-brómhippursav lehetnek. A V-111-1-¹⁴C-vel kezelt állatok vizeletében tehát a savas karakterű anyagokat a fenti referens anyagokkal hasonlítottuk össze kétdimenziós kromatogramon.

A 17. ábrából megállapítható, hogy a B-extraktumban csak az 1-es jelzés esetében található két folt, a p-brómbenzoészavval, illetve a p-brómhippursavval azonos. Meg kell jegyezni, hogy a p-brómbenzoészav és a p-bróm-fenilecetsav között az alkalmazott kromatográfiás rendszerekben nem sikerült különbséget tennünk.

A V-111-1-¹⁴C-vel kezelt patkányok 0—12, 12—24 és 24—48 órás gyűjtött vizeletének vékonyréteg kromatogramjáról (Kieselgel-G) lekapartuk a nor-V-111 és a V-111-nek megfelelő foltokat és folyadék-szcintillációs módszerrel meghatároztuk azok aktivitását. Megállapítottuk, hogy a változatlan V-111 és demetilált származéka számottevő mennyiségben ürül ki a vizelettel. V-111-ből beadott dózis 6,85, nor-V-111-ből 15,05%-át találtuk meg a 0—24 óra alatt gyűjtött vizeletben. Az idő előrehaladtával a nor-V-111 mennyisége a V-111-hez viszonyítva jelentősen növekszik a vizeletben. Míg a két vegyület aránya (nor-V-111/V-111) 0—12 órás vizeletben 1,19, a 12—24 órában 5,94, a 24—48 órában pedig már 11,5. A p-brómbenzoészav és a p-brómhippursav a beadott dózis 7,9%-át képviselte a 0—24 órás vizeletben (19. ábra).



19. ábra. A V-111 metabolizmusának sémája patkánykísérletekben (metabolitok a 0—24 órás vizeletben). A bekeretezett értékek az identifikált metabolitok mennyiségét jelzik a beadott dózis %-ában. A V-111-1-¹⁴C dózisa 9,9 mg/kg, 10 μ Ci/ patkány volt, i. v. beadva.

A vizelettel ürülő metabolitok gázkromatográfiás analízisét TIM-al detektálva a 18. ábra mutatja és mint látható, 41 viszonylag jól elkülöníthető csúcsot tudtunk detektálni a vizelet éteres extraktumából. A gázkromatográf-tömegspektrográfias vizsgálat kísérleti paramétereit az V. táblázat mutatja.

V. táblázat

A gázkromatográf-tömegspektrográfias vizsgálat paraméterei

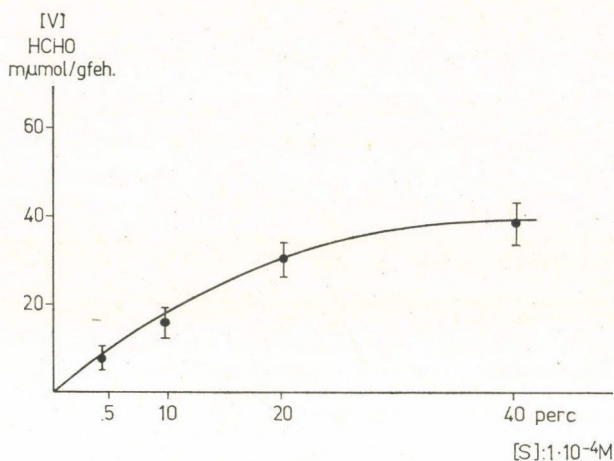
Gázkromatográf-tömegspektrográf	JGC 20K + JMSD — 100
Oszlop	2 cm × 3 mm
Oszloptöltet	10%; PEG 20M; Gas-Chrom Q 100—120 mesh
Hélium áramlási sebessége	2 kg/cm ²
Hőmérsékletek	
Injektor	270 °C
Oszlop	120—250 °C, 5 °C/perc
GC—MS	250 °C
Érzékenységi	1 × 10 ⁻⁹
Vákuum	1 × 10 ⁻⁵ Torr
Ionizációs energia	27 eV

A gázkromatográfias elválasztással szeparálódott komponensek tömegspektrumából csak a brómot tartalmazó metabolitok analizisét végeztük el számítógéppel. A GC/MS technikával végzett vizsgálataink is alátámasztották a vékonyrétegen is identifikált V-111, nor-V-111, p-brómbenzoesav és p-brómhippursav jelenlétét a patkányok vizeletében. Ily módon sikerült azonban olyan metabolitokat is valószínűsíteni, melyeket vékonyrétegen, referens anyag hiányában nem tudtunk identifikálni. Így megtaláltuk a p-brómfenilacetont valószínűsítő 212 tömegszámú molekulaiont, valamint a 169 tömegszámú fragmens iont, ami az előbbiből a —COCH₃ leszakadásával (—43) keletkezhet. Mivel vékonyrétegen is azonosítottuk a p-brómbenzoesavat, illetve a p-brómhippursavat, melyek az amfetamin metabolizmusának is végtermékei — természetesen a p-bróm-szubsztitúció nélkül — a reakcióút ismeretében a p-brómfenilacetont, mint közti termék, jelen kell legyen a vizeletben (19. ábra). A p-brómfenilacetont redukciója révén, mint a 19. ábra mutatja, közti terméként p-brómfenilpropanol is keletkezhet. Ezt a vegyületet nem találtuk meg a vizeletben, viszont identifikáltuk a belőle vízkilépéssel keletkező 196 tömegszámú fragmens iont (C₉H₉Br), ami a p-brómfenil-1-2-propénnel lehet azonos. Megtaláltuk még a 170 tömegszámú (C₇H₇Br) fragmens iont, ami p-brómtoluolnak felel meg. Ez a p-brómfenilecetsav dekarboxilált végtermékeként fogható fel.

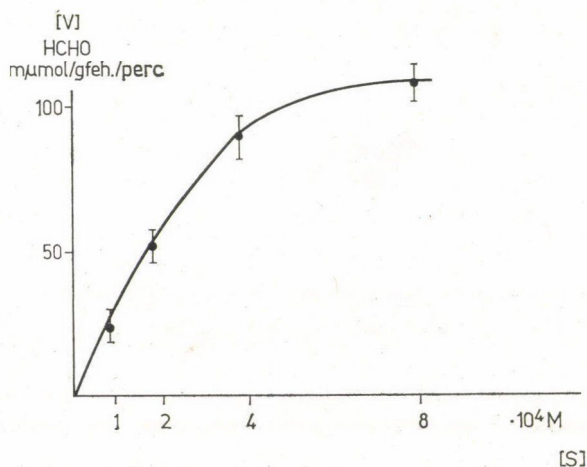
Vizsgálataink szerint tehát a V-111 fő metabolikus útja az N-demetiláció, mely további enzimatisz átalakulások révén p-brómbenzoesavhoz, illetve p-brómhippursavhoz vezet. Az eredményeket összegezve mutatja a 19. ábra. Az ábrán szereplő átalakulási termékek, metabolitok közül bizonyítottuk a V-111, a nor-V-111 a p-brómfenilecetsav a p-brómfenilacetont jelenlétét a vizeletben és vizsgálataink szerint közti terméként joggal feltételezhetjük a p-bróm-

fenilpropanolt is. Megtaláltuk és vékonyrétegen is bizonyítottuk a p-brómbenzoésavat, illetve a b-brómhippursavat is a vizeletben. A vegyület β -hidroxilációja csak mint elvi út szerepel a táblázatban, melynek lehetőségét az amfetamin esetében mások bizonyították (Dring és mtsai 1966).

Az amfetamin metabolizmusa patkánykísérletekben kvalitatíve is eltér a fenti képtől, mivel annak fő metabolikus útja a p-hidroxiláció. A p-hidroxilált termék patkányban 60%-át teszi ki a vizelettel ürülő amfetamin metabolitoknak. A V-111 p-hidroxilációja a p-brómszubsztitúció miatt nem mehet végbe, ezért a V-111 metabolizmusa, mint ezt bizonyítottuk, patkányban nem az amfetaminhoz hasonlóan történik. Ebben a speciesben is végbemegy



20. ábra. A (+)-V-111-metil- ^{14}C demetilációjának idő függése.

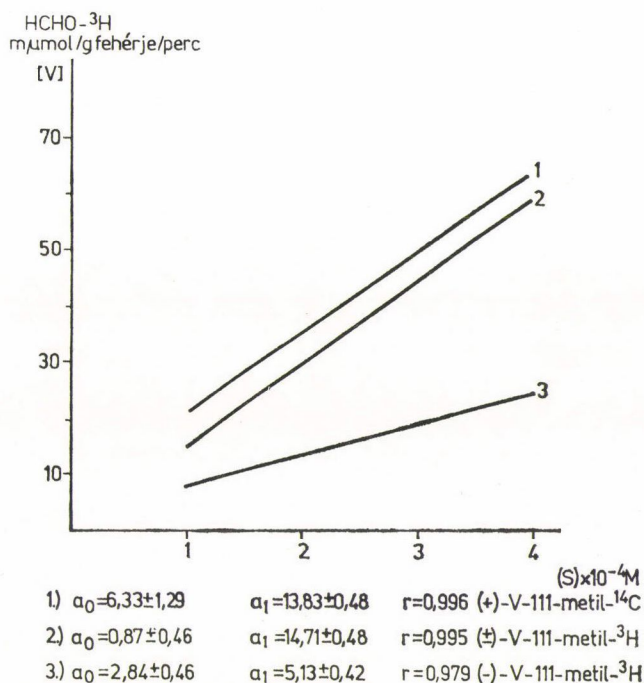


21. ábra. A (+)-V-111-metil- ^{14}C demetilációjának szubsztrált függése.

elenyésző mértékben a metilamfetamin N-demetilációja és oxidatív dezaminációja, azonban a p-halogenált V-111 esetében ez fő metabolikus úttá lép elő.

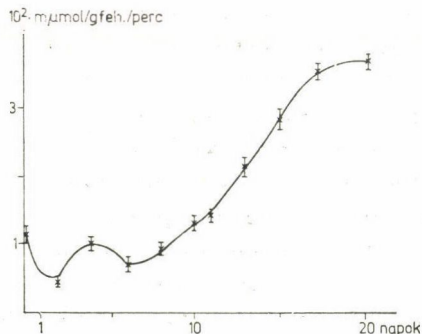
Kísérleteinkben *in vitro* körülmények között patkánymáj mikroszóma-preparátumon is megvizsgáltuk a V-111 N-demetilációját a vegyület metiljelzett módosulatainak segítségével. Kísérleteink azt mutatták, hogy a V-111 N-demetilációja *in vitro* körülmények között időben 10 percig lineárisan halad (20. ábra). A reakció szubsztrátfüggését pedig a 21. ábra mutatja.

Mivel a V-111-metil jelzett módosulataiból mind a sztereoizomerek, mind a racem módosulat rendelkezésünkre állott, külön is elvégeztük azok N-demetilációs vizsgálatát. Az eredményeket 3 különböző szubsztrát koncentrációban a 22. ábra mutatja. Az egyenesek egyenleteiből látható, hogy a (+)-módosulat N-demetilációja szignifikánsan intenzívebb mint a (–)-izomeré. A racem V-111 demetilációja nem éri el a (+)-izomerét, azonban a közöttük észlelt különbség nem szignifikáns.



22. ábra. A V-111-metil jelzett sztereoizomerjeinek N-demetilációja. Az 1. és 3. sz. egyenes között az eltérés szignifikáns; $p < 0,05$. A statisztikai elemzést Student t-tesztel végeztük

Mivel a V-111 előkezelés patkányon fokozza a vegyület, illetve metabolitjainak vizeletürülését, megvizsgáltuk azt is, hogyan befolyásolja az előkezelés a májmikroszóma-frakció N-demetilációs aktivitását. A 23. ábra azt mutatja, hogy az N-demetiláció időben fokozódik és három hét múlva már



23. ábra. A (+)-V-111-metil- ^{14}C N-demetilációja a vegyülettel előkezelt patkányok máj-mikroszóma preparatumban. Az előkezelés során az állatok naponta 15 mg/kg inaktív V-111-et kaptak s.c. (a dekapitulást egy órával megelőzően is). A (+)-V-111-metil- ^{14}C koncentrációja $8 \cdot 10^{-4}\text{M}$ volt a demetilációs médiumban

a kezdeti aktivitás mintegy háromszorosára nő. A V-111 kezelés tehát fokozza a máj mikroszomális állományának N-demetilációs aktivitását, ezzel saját metabolizmusát is.

Bár az amfetamin gyengébb pszichostimuláns mint a metilamfetamin, az N-demetiláció fokozódásának krónikus V-111 kezelés során nyilvánvalóan nincs befolyása a vegyület központi idegrendszeri zavart okozó hatásában észlelt toleranciához, hiszen az időben is gyorsabban kialakul annál. A tolerancia oka ugyanis abban áll, hogy a V-111 kiüríti az első kezelés során a szerotonin raktárakat, megszünteti tehát a szerotonin felszabadulásához kötött hatásokat, majd ezt követően a szerotonerg rendszer tartós változásaihoz vezet (Magyar és mtsai 1975d; 1976a).

VI. táblázat

Az emberi máj és patkánymáj mikroszóma preparátum N-demetilációs aktivitása in vitro kísérletekben különböző szubsztrátkoncentráció mellett

Species	Aktivitás $\mu\text{mol/g}$ fehérje/perc		
	$1 \times 10^{-4}\text{M}$	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	$4 \times 10^{-4}\text{M}$
Emberi máj	$28,88 \pm 0,7^*$	$48,72 \pm 1,4$	$96,07 \pm 1,3$
Patkánymáj	$18,30 \pm 2,7$	$40,23 \pm 3,1$	$86,40 \pm 9,65$

Szubsztrát: (+)-V-111-metil- ^{14}C .

A statisztikai értékelést Student t-tesztel végeztük.

* $p < 0,05$.

Emberen a metilamfetamin metabolizmusa eltér a patkányon észleltétől, mivel itt a fő metabolikus út eleve az N-demetiláció (Dring és mtsai 1966). Ezért megvizsgáltuk, hogy a humán májmikroszóma fehérjére vonat-

koztatott N-demetilációs aktivitása hogyan viszonylik a patkányban észlelt N-demetilációs aktivitásához V-111 szubsztrát esetén.

Kísérleteink szerint (VI. táblázat) a kezeletlen humán és patkány májmikroszóma preparátum fehérjére vonatkoztatott aktivitása *in vitro* kísérletekben csak az alacsony szubsztrátkoncentráció esetében tér el szignifikánsan egymástól. Ilyenkor a humán májmikroszóma N-demetilációs aktivitása meghaladja a patkány májmikroszómáét.

Összefoglalás

A p-Br-metilamfetamin (V-111) radioaktív jelzett módosulatainak segítségével vizsgáltuk a vegyület szervezetbeni sorsát egér- és patkánykísérletekben. Egésztest autoradiográfiás vizsgálatokkal és kvantitatív folyadék szcintillációs méréssel egérkísérletekben megállapítottuk, hogy a vegyület gyorsan felszívódik és a vérből gyorsan penetrál a szövetekbe. A központi idegrendszerben a metilamfetamin koncentrációját meghaladó szintet ér el, és lassabban is hagyja el a központi idegrendszert. Differenciál centrifugálással bizonyítottuk, hogy a V-111 a metilamfetaminnál és az o-bróm-metilamfetaminnál (V-104) jobban kötődik a patkányagy mitochondriális és mikroszomális frakciójához. A kötődés intenzitása a vegyület lipoidoldékonyságával arányos. V-111 ill. metabolitjai főleg a vizelettel ürülnek, de megtalálhatóak a székletben is, sőt a molekula dezintegrációja következtében az oldallánc 3-as ^{14}C -jelzése esetében kevés mennyiségű radioaktív CO_2 jelenik meg a kilégzett levegőben is. A vizeletben ürülő metabolitok radiokromatográfiás és gázkromatográf-tömegspektrometriás elemzésével bizonyítottuk, hogy a V-111 kis részben változatlan formában ürül, de megtaláltuk a vizeletben a demetilált V-111-et, a p-brómfenilacetont (közvetve bizonyítottuk a p-brómfenilpropanol előfordulását), a p-brómbenzooesavat és a p-brómhippursavat is. Az amfetaminnak és metil származékának fő metabolikus útja patkányban a p-hidroxiláció, ami a p-halogenált V-111 esetében nem megy végbe. Ezért a patkányban az amfetamin esetében csak másodlagos jelentőségű út (demetiláció, oxidatív dezamináció) a V-111 fő lebontási útjává válik ebben a speciesben. *In vitro* kísérletekben is bizonyítottuk a V-111 intenzív demetilációját. Tartós kezelés során patkánykísérletekben nő a demetilációs aktivitás.

IRODALOM

- Dring, L. G., Smith, R. L. és Williams, R. T.: J. Pharm. Pharmacol. **18**, 402 (1966).
 Ehrenpreis, S., Fleisch, J. H. és Mittag, T. W.: Pharmacol. Rev. **21**, 131 (1969).
 Knoll, J., Ecseri, Z., Kelemen, K., Nievel, J. és Knoll, Berta: MTA V. Oszt. Közl., **15**, 231 (1964).
 Knoll, J., Ecseri, Z., Kelemen, K., Nievel, J. és Knoll, Berta: Arch. Int. Pharmacodyn., **15** 154 (1965a).
 Knoll, J., Vizi, E. S. és Ecseri, Z.: MTA V. Oszt. Közl. **15**, 413 (1965b).

- Knoll, J., Vizi, E. S. és Ecséri, Z.: Arch. Int. Pharmacodyn. **159**, 442 (1966).
- Knoll, J., Vizi, E. S., Knoll, Berta és Somogyi, Gy.: MTA V. Oszt. Közl. **18**, 35 (1967).
- Knoll, J.: In: Amphetamines and Related Compounds, (Eds.: Costa, E. és Garattini, S. (Raven Press, New York, 761 (1970).
- Knoll, J. és Vizi, E. S.: Pharmacology, **4**, 278 (1970a).
- Knoll, J. és Vizi, E. S.: Pharm. Res. Comm. **2**, 67 (1970).
- Knoll, J., Vizi, E. S. és Knoll, Berta: Acta Physiol. Hung. **37**, 151 (1970).
- Knoll, J. és Magyar, K.: In: Third Int. Meeting of Int. Soc. for Neurochem. Budapest, Abstr., p. 231 (1971).
- Knoll, J. és Magyar, K.: In: Monoamine Oxidases — New Vistas (Eds: Costa, E. és Sandler M.) Adv. Biochem. Psychopharmacol. **5**, Raven Press, New York, 393 (1972a).
- Knoll, J. és Magyar, K.: Orvostudomány, **23**, 87 (1972b).
- Knoll, J., Vizi, E. S. és Magyar, K.: In: Recent Development of Neurobiology in Hungary, **3**, (Ed.: Lissák, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 167 (1972a).
- Knoll, J., Magyar, K. és Vizi, E. S., Knoll, Berta, Török, T. és Jóna, Gabriella: Orvostudomány, **23**, 99 (1972b).
- Knoll, J., Magyar, K., Vizi, E. S., Török, T., Satory, Éva és Jóna Gabriella: In: Symp. on Pharmacological Agents and Biogenic Amines in the Central Nervous System, (Ed: Magyar, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 13 (1973).
- Knoll, J., Magyar, K., Makleit, S. és Zólyomi, G.: Orvostudomány, **26**, 111 (1975a).
- Knoll, J., Magyar, K. és Zólyomi, G.: Acta Physiol. Hung. **46**, 163 (1975b).
- Knoll, J.: In: Monoamine Oxidase and its Inhibition, Ciba Foundation Symp., Elsevier, Amsterdam, **39**, 135 (1976).
- Magyar, K.: Orvostudomány, **19**, 341 (1968).
- Magyar, K. és Knoll, J.: Acta Physiol. Hung. **37**, 150 (1970).
- Magyar, K., Satory, Éva, Zsilla, Gabriella és Knoll, J.: In: Seventh Meeting of the Federation European Biochemical Soc., Varna, Abstr. No. 847 (1971).
- Magyar, K.: Activ. nerv. sup., Praha, **14**, 4 (1972).
- Magyar, K., Satory, Éva, Jóna, Gabriella és Knoll, J.: Acta Physiol. Hung. **41**, 356 (1972).
- Magyar, K.: Acta Morph. Hung. XIV. Suppl. p. 142 (1973).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: Fourth Int. Meeting of the Int. Soc. for Neurochem. Tokyo, Abstr., 489 (1973).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: Fifth Congr. of the Polish Pharmacol. Soc. Szczecin, Abstr. p. 35 (1975a).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: Sixth Int. Congr. of Pharmacology Helsinki, Abstr. No. 371 (1975b).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: Fifth Int. Meeting of the Int. Soc. for Neurochem. Barcelona, Abstr. No. 444 (1975c).
- Magyar, K. és Knoll, J.: Polish J. of Pharm. and Pharmacy. Suppl. **27**, 139 (1975d).
- Magyar, K., Hajnal, L. és Knoll, J.: In: Second Cong. of the Hung. Pharmacol. Soc. **3**, Monoaminergic Mechanisms in the Central Nervous System. (Ed.: Magyar, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 1976a).
- Magyar, K., Zsilla, Gabriella és Knoll, J.: In: Second Congr. of the Pharmacol. Soc., **1**, Symp. on Analgetics. (Ed.: Vizi, E. S.) Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 30 (1976b).
- Nash, T.: Biochem. J., **55**, 416 (1953).
- Schaner, L. S.: Ann. Rev. Pharmacol., **1**, 29 (1961).
- Snyder, S. S. és Bennett, J. P.: Ann. Rev. Physiol. **38**, 153 (1976).
- Sutherland, E. W., Cori, C. F., Haynes, R. és Olsen, N. S.: J. Biol. Chem., **180**, 825 (1949).
- Thompson, J. A. és Holtzman, J. L.: J. Pharmacol. Exp. Ther. **186**, 640 (1973).
- Ullberg, S.: Acta Radiol. Suppl. **18**, 1 (1954).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban található statisztikai értékelést és számítógépes analízist a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítástechnikai Csoportjában dr. Kanyár Béla végezte, amiért ezúttal is köszönetünket fejezzük ki. Köszönet illeti Oszvald Editet és Knippel Ágostonnét a technikai munkában való gondos közreműködésükért.