

A PARA-BRÓM-METILAMFETAMIN (V-111) OPTIKAI IZOMÉRJEINEK HATÁSA A KÖZPONTI IDEGRENSZER NEUROKÉMIAI TRANZMISSZIÓJÁRA

MAGYAR KÁLMÁN az orvostudományok kandidátusa, TEKES KORNÉLIA
és KNOLL JÓZSEF az MTA levelező tagja.

Közlésre érkezett: 1977. IV. 15.

A metilamfetamin származékok kémiai szerkezete és hatása közötti összefüggések tanulmányozása során, a hatvanas évek közepén, arra a következtetésre jutottunk intézetünkben, hogy a nagyobb amfetamin dózisok központi idegrendszeri zavart okozó hatása szerotonerg mechanizmuson keresztül valósul meg (Knoll és mtsai 1965, 1966, 1972a). A vizsgálatok azt is bizonyították, hogy az amfetamin para-halogenálása fokozza az LSD-szerű pszichés zavart, és ez a hatás főleg egy új vegyület, a p-Br-metilamfetamin (V-111) esetében kifejezett. A V-111 már kis dózisban, egytized LSD-szerű hatást váltott ki (Knoll és Vizi 1970). Az általa okozott pszichés zavar és a szerotonerg mechanizmus közötti összefüggést, többek között az is bizonyítja, hogy p-Cl-fenilalanin (PCPA) előkezeléssel, vagyis a szerotonin (5-HT) szintézisének gátlásával sikerült kivédeni a V-111-kezelés hallucinogén hatásait állatkísérletekben (patkány, macska, nyúl; Knoll és Vizi 1970).

Eredményeink támogatták mások adatait, akik a hallucinogén effektus kiváltásában a fenilalkilamin struktúra p-szubsztitúciójának jelentőségét hangsúlyozták (Shulgin 1963, 1964; Smythies és mtsai 1967; Snyder és Faillace 1967), valamint azokét akik arra a következtetésre jutottak, hogy az ismert hallucinogének hatásában a szerotonin felszabadítás is szerepet játszik (Woolley 1962). Mások azt is bizonyították, hogy az LSD és más hallucinogének megváltoztatják az 5-HT szintézisét a központi idegrendszerben (Diaz és mtsai 1968; Tonge és Leonard 1969; Sanders-Bush és Sulser 1970; Sanders-Bush és Bushing 1971; Sanders-Bush és mtsai 1975).

Farmakológiai vizsgálataink eredménye alapján 1970-ben kezdtük el a V-111 szerotonerg hatásainak biokémiai elemzését. Megállapítottuk, hogy a krónikus V-111 kezelés 50 %-ra csökkenti az agykéreg 5-HT tartalmát (Knoll és Magyar 1971), valamint gátolja az 5-HT neuronális visszavételét (reuptake) patkányagy szinaptoszóma preparátumon (Magyar 1972; Knoll és mtsai 1972, 1973). Kísérleteink bizonyították, hogy a V-111 sokkal erősebben és szelektívebben gátolja az 5-HT, mint a noradrenalin (NA) felvételét és a gátlás tartósan fennáll a V-111-gyel egyszer kezelt állatokban, annak ellenére, hogy *in vitro* kísérletekben a gátlás kompetitív, reverzibilis jellegűnek látszott

(Knoll és mtsai 1972, 1973; Magyar és Knoll 1974; Magyar és mtsai 1976). Megállapítottuk továbbá, hogy a V-111 a NA-nál erősebben, de az 5-HT-nál gyengébben gátolja a dopamin (DA) felvételét is (Magyar és Knoll 1975 a,b,c,d; Tekes és mtsai 1975).

Jelen kutatásainkban kiterjesztettük vizsgálatainkat a V-111 sztereoizomerek hatásaira az uptake területén és vizsgáltuk, hogy a vegyület hogyan befolyásolja egyes biogén aminok felszabadulását és szintézisét a központi idegrendszerben. Biokémiai vizsgálatainkat különösen facilitálta az a kísérletes eredmény, hogy a V-111 javítja a patkányok tanulási készségét különböző viselkedési tesztekben (Knoll 1974; Knoll B. és mtsai 1974; Knoll B. 1976).

Kísérleti állat, vizsgálati anyagok és módszerek

Kísérleti állat: A kísérletekhez 100 ± 10 g-os CFY specifikációjú hím patkányokat használtunk (LATI). Az állatokat standard laboratóriumi táplálékon tartottuk, vizet szabadon fogyasztottak.

A kísérletekben használt radioaktív jelzett vegyületek: Dopamin-2- ^3H .HCl (^3H -DA), specifikus aktivitás: 2,3 Ci/mmol, Amersham; (\pm)-Noradrenalin-7- ^3H (^3H -NA), specifikus aktivitás: 12 Ci/mmol, Amersham; 5-hidroxitriptamin- ^3H (G) kreatininsulfát, (^3H -5-HT), specifikus aktivitás: 18 Ci/mmol, Amersham; (\pm)-1-4-brómfenil/-2-metilaminopropán.HCl/-metil- ^3H), (^3H -V-111), specifikus aktivitás: 282,0 mCi/mmol, (^3H -V-111); 1-fenil-2-metilaminopropán.HCl-(2- ^3H), (^3H -MA), specifikus aktivitás: 690,0 mCi/mmol, (^3H -MA). A két utóbbi vegyület a Gyógyszerkutató Intézet Radiokémiai Laboratóriumában Bánfi Dezső vezetése mellett készült.

A kísérletekben használt inaktív vegyületek: A 2-amino-4-hidroxi-6-metil-tetrahydropterint (6-MPH₄, biopterin) E.M. Gál ajándékozta (Division of Neurochemistry, Department of Psychiatry, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa). A (+) és (-) -p-klórfenilalanint (PCPA) az MTA Peptidkémiai Munkacsoportja készítette, Teplán István vezetésével. A p-bróm-fenilalanint (PBrPA), a p-fluorfenilalanint (PFPA) és a p-jódfenilalanint (PJPA) a Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerveskémiai Intézetében, Dinya Zoltán szintetizálta.

Agyszövet szinaptoszóma-preparátum biogén amin felvételének vizsgálata

A biogén aminok szinaptoszómális felvételét (uptake), patkányagy szinaptoszóma-preparátumon vizsgáltuk Snyder és Coyle módszerével (1969), az aminok (5-HT, NA, DA) magas specifikus aktivitású, ^3H -jelzett módosultainak segítségével. A radioaktív szubsztrátok végkoncentrációja 10^{-7} M volt.

A felvételt Krebs-Henseleit pufferben, 37,5 °C-on, 5 percig mértük és az 15 percig lineáris volt. A módszer leírói szerint 15 perces inkubációs időtartam alatt a felvett radioaktív aminok több mint 85 %-a még nem metabolizálódik a szövetekben (Snyder és Coyle 1969). Az inkubáció befejeztével a szinaptoszómális frakciót 48,000 g-vel 30 percig centrifugáltuk (MSE *Super Speed* 65) és a felülúszó, valamint az üledék radioktivitását folyadék-szintillációs módszerrel határoztuk meg (Intertechnique, SL 40). A folyadék-szintillációs mérések eredményeit a konstans határfok miatt nem abszolút aktivitásban, hanem cpm-ben adtuk meg.

A felvétel mértékéül a centrifugális üledéknek a médiumhoz viszonyított koncentrálnálási képessége (R) szolgált, ami a cpm/g szinaptoszóma és a cpm/ml felülúszó hányadosa.

A szinaptoszómális amin-felvétel gátlását a kontrol százalékában adtuk meg. Kísérleteinkben a kontrol és a gátlószeres minták 37,5 °C-nál kapott R értékeiből levontuk a 4 °C-os inkubációnál észlelt R értéket és csak a különbséget vettük figyelembe a gátlási százalék kiszámításánál.

Néhány kísérletben az uptake vizsgálata során alkalmazott kísérleti körülmények között a triciált biogén aminok helyett, ³H-V-111-et, illetve ³H-MA-t használtunk és meghatároztuk 4 és 37°-on, 5 perc alatt a jelzett vegyületek „szinaptoszómális felvételét”, illetve a szövet és az inkubációs oldat között kialakuló koncentrálnálási indexet.

Az agyszövet szinaptoszóma preparátum biogén amin felszabadításának (release) vizsgálata

A biogén aminok gyógyszerhatásra bekövetkező felszabadulását patkányagy szinaptoszóma preparátumából Ferris és mtsai módszerével tanulmányoztuk (1972). CFY patkányok agykérgéből készített szinaptoszóma preparátumot először $2 \cdot 10^{-7}$ M ³H-jelzett szubsztráttal (5-HT, NA, DA) 37 °C-on, 15 percig inkubáltuk, majd a centrifugálással ülepített (48,000 g, 30 perc) és újra szuszpendált szinaptoszóma frakció gyógyszerhatásra bekövetkező radioaktív amin-leadását határoztuk meg. A gyógyszerhatásra bekövetkező felszabadítás mértékét százalékban adtuk meg, levonva az aminok spontán felszabadulását. Az eredményt 5 kísérlet átlagából számítottuk.

5-HT és az 5-hidroxiindolecetsav (5-HIAA) koncentrációjának meghatározása agyszövetben

Az 5-HT és 5-HIAA koncentrációját patkány agyszövetben Miller és munkatársai módszerével határoztuk meg (1970). A fluoreszcenciát Hitachi MPF-4 típusú spektro-fluoriméterrel határoztuk meg. Az aktivációs, illetve emissziós hullámhossz 360, illetve 470 mμ volt.

II. táblázat

(+)-V-111 hatása patkányagy szinaptoszóma-preparátumának $^3\text{H-5-HT}$ felvételére különböző $^3\text{H-5-HT}$ koncentráció mellett

$^3\text{H-5-HT}$ M.	Gátlás a kontrol %-ában \pm S.E.M.		
	10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M
1×10^{-7}	$47,40 \pm 2,50$	$53,20 \pm 2,08$	$60,80 \pm 1,86$
2×10^{-6}	0	$21,75 \pm 2,77$	$29,83 \pm 1,56$

mellett, meghatároztuk a szinaptoszómális frakció V-111-re és MA-ra kialakuló koncentrálsási indexét (III. táblázat).

Az eredmények azt mutatják, hogy a két amfetamin származék, különösen a V-111, jelentősen koncentráldódik a szinaptoszómális frakcióban. A koncentrálsási arány (R) — vagyis a szövetben, illetve az inkubációs médiumban mért V-111, illetve MA mennyiségének aránya — nem függ a vegyületek koncentrációjától, de kismértékben változik a hőmérséklettel. Az utóbbi eltérés felvételi mechanizmus szempontjából lényeges lehet, mint erre a következő fejezetben visszatérünk. A III. táblázat adatai alapján a 37°C -on mért koncentrálsási indexek a 4°C -on mért értékeknek V-111, ill. NA esetében 1,3 — ill. 1,5-szörösei.

III. táblázat

A $^3\text{H-V-111}$ és a $^3\text{H-MA}$ szinaptoszómális „felvétele” különböző hőmérsékleten patkánykísérletekben

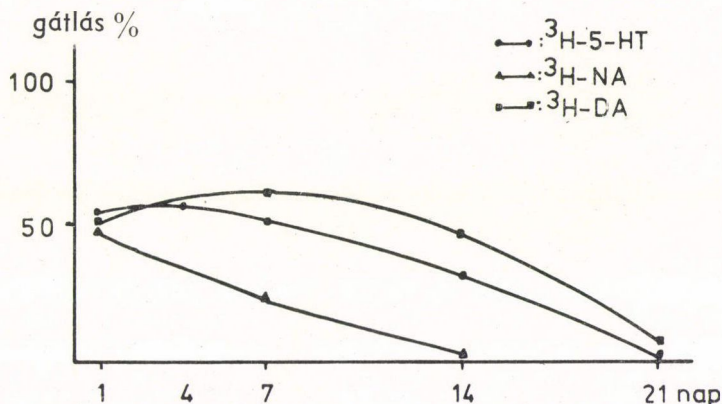
Inkubációs hőmérséklet	Vegyület	R \pm S.E.M.		
		10^{-7}M	$5 \cdot 10^{-7}\text{M}$	10^{-6}M
37°C	$^3\text{H-MA}$	$19,26 \pm 2,48$	$18,73 \pm 1,18$	$17,27 \pm 1,02$
	$^3\text{H-V-111}$	$199,02 \pm 14,02$	$205,17 \pm 8,51$	$194,84 \pm 9,66$
4°C	$^3\text{H-MA}$	$13,76 \pm 1,61$	$11,78 \pm 0,81$	$11,27 \pm 1,03$
	$^3\text{H-V-111}$	$154,78 \pm 12,6$	$146,07 \pm 9,61$	$164,44 \pm 15,31$

$$R (\text{koncentrálsási index}) = \frac{\text{koncentráció/g szövet}}{\text{koncentráció/ml inkubációs oldat}} \quad (5 \text{ perces kísérleti periódus alatt})$$

A biogén aminok felvételének gátlása *in vitro* kísérletekben kompetitív és reverzibilis jellegű. Ha azonban a patkányokat egyszeri dózisban, 15 mg/kg V-111-gyel kezeltük (s.c.), és ezután mértük a transzmitterek felvételét — különböző idővel a gyógyszeres kezelés után — azt találtuk, hogy a felvételt gátlás rendkívül tartós. A $^3\text{H-5-HT}$ és a $^3\text{H-DA}$ felvétele kb. három, a $^3\text{H-NA}$ -é pedig két hét elteltével regenerálódik (2. ábra). A $^3\text{H-DA}$ felvételét akut kísérletben (1. ábra) az amfetamin gátolja a legerősebben a kísérleteinkben használt vegyületek közül. A kialakuló gátlás azonban — szemben a V-111 hatásával — csak

VEGYÜLETEK	$\begin{array}{c} R_1 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH} - R_3 \\ \\ R_2 \end{array}$			Szinaptoszómális felvétel gátlása ID ₅₀ μM		
	R ₁	R ₂	R ₃	³ H-5HT	³ H-DA	³ H-NA
Amfetamin	H	H	H	>100	4,23	-
Metilamfetamin	H	H	CH ₃	>100	>100	-
o-Br-Metilamfetamin	H	Br	CH ₃	28	54,4	-
p-F-Amfetamin	F	H	H	10	48,7	-
p-Cl-Metilamfetamin	Cl	H	CH ₃	4	-	-
[+]-p-Br-Metilamfetamin	Br	H	CH ₃	1,03	6,61	40,1
[-]-p-Br-Metilamfetamin	Br	H	CH ₃	1,19	86,9	>100
I-1703	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 - \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$		CH ₃	>100	-	-

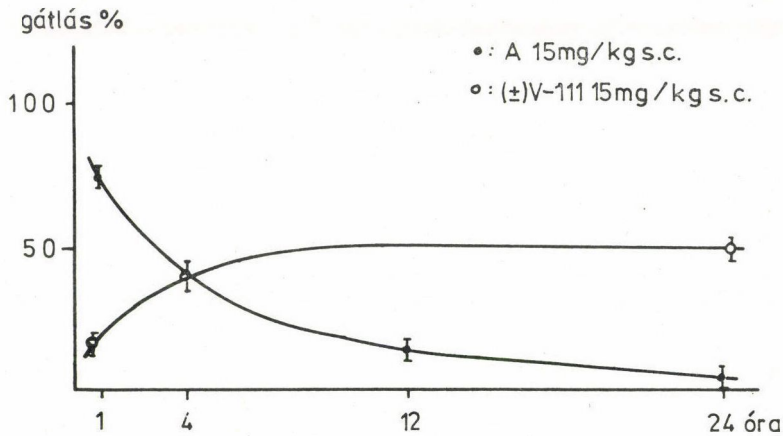
1. ábra. Amfetamin-származékok hatása *in vitro*, a ³H-5-HT a ³H-DA és a ³H-NA agyi szinaptoszómális felvételére, patkánykísérletekben. Az ID₅₀ értéket 4 különböző gátlószerek-koncentrációnál végzett 5 kísérlet eredményéből, a regressziós egyenes meghatározása után számítottuk.



2. ábra. Akut V-111 kezelés (15 mg/kg, s. c.) hatása a ³H-5-HT a ³H-DA és a ³H-NA agyi szinaptoszómális felvételére, patkánykísérletekben. Az értékeket 3 kísérlet átlagából számítottuk.

rövid tartamú, és már 24 órával teljesen el is múlik az amfetamin kezelés után (3. ábra).

A V-111 amin-felvételre kifejtett gátló hatásán túl megvizsgáltuk a vegyület amin-felszabadító (release) hatását is. A IV. táblázat adataiból látható, hogy sem a V-111, sem a metilamfetamin, sem a p-F-amfetamin nem szabadít fel számottevő mennyiségű 5-HT-t a szinaptoszóma preparátumból, és a



3. ábra. Akut amfetamin (A) és V-111 kezelés hatása a ³H-DA agyi szinaptoszómális felvételére, patkánykísérletekben. Az értékeket 3 kísérlet átlagából számítottuk.

V-111 sztereoiszomerek e tekintetben is egyforma hatást mutatnak. A tiramin az 5-HT-t is jobban felszabadítja a szinaptoszóma preparátumból, mint az amfetamin-származékok. A vizsgálatban alkalmazott vegyületek a ³H-NA felszabadítására is gyengén hatnak, de (+)-V-111 módosulat szignifikánsan hatásosabb. A (+)-V-111 a ³H-DA felszabadításában is erősebb, mint a (-)-forma, és mind a (+)-V-111, mind a metilamfetamin erősebben hat a DA, mint az 5-HT felszabadítására. A vizsgált amfetaminok azonban még a DA felszabadításában sem érik el a tiramin ilyen irányú hatásereőségét.

IV. táblázat

Amfetamin-származékok hatása a ³H-5-HT, ³H-NA és ³H-DA felszabadulására (release)

Vegyület 10 ⁻⁶ M	Felszabadulás a szinaptoszómális amintartalom százalékában ± S.E.M.		
	³ H-5-HT	³ H-NA	³ H-DA
(-)-V-111	5,8 ± 0,5	2,1 ± 0,24	4,8 ± 0,7
(±)-V-111	5,9 ± 0,8	3,5 ± 0,5	8,0 ± 1,0
(+)-V-111	4,7 ± 0,6	3,7 ± 0,7*	9,6 ± 0,7*
Metilamfetamin	5,2 ± 0,5	4,7 ± 0,8	8,8 ± 0,8
p-F-amfetamin	3,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	4,1 ± 0,2
Tiramin	7,9 ± 0,8	10,9 ± 0,5	12,2 ± 0,8

* A (+) és (-) módosulatok hatásában észlelt különbség szignifikáns: $p < 0,05$
A szignifikanciát a Student t-tesztel számítottuk.

A korábbiakban leírtuk, hogy a V-111 kezelés tartósan csökkenti az agykéreg 5-HT szintjét (Knoll és Magyar 1971; Magyar és mtsai 1972; Magyar 1972; Knoll és mtsai 1972, 1973), jelen kísérleteinkben azonban bizonyítottuk,

hogy az egyszeri kezelés is elég ahhoz, hogy a 5-HT koncentrációja tartósan lecsökkenjen a kéregben (V. táblázat). Négy óra múlva már körülbelül 50 %-os szerotonin koncentrációt találtunk a kéregben és 72 óra múlva is ez 30 %-nak adódott, vagyis semmiféle restitúciós törekvést nem észleltünk.

Az agytörzsi koncentráció is lecsökken a kezelés hatására (4 óra múlva 70 %-os a szint), azonban hamar megindul bizonyos regenerációs törekvés az 5-HT szint rendezésére, és 72 óra múlva már 80 %-os agyi szintet mértünk.

V. táblázat

Az 5-HT koncentrációjának változása patkányagykéregben és -agytörzsben V-111 előkezelés után

V-111 előkezelés órában	agykéreg		agytörzs	
	$\mu\text{g/g}$ szövet \pm S.E.M.%		$\mu\text{g/g}$ szövet \pm S.E.M.%	
0	0,76 \pm 0,23	100,0	2,01 \pm 0,21	100,0
4	0,36 \pm 0,03	47,3	1,40 \pm 0,08	69,6
24	0,50 \pm 0,02	65,7	1,58 \pm 0,17	78,6
48	0,41 \pm 0,06	53,9	1,38 \pm 0,27	68,6
72	0,23 \pm 0,03	30,3	1,66 \pm 0,50	82,5

Az 5-HT koncentrációjának tartós csökkenése alig képzelhető el a triptofán-5-hidroxiláz, vagyis az 5-HT szintézisének gátlása nélkül. Ezért megvizsgáltuk a V-111, ill. a sztereoizomerek hatását az agytörzs T-5-H aktivitására. A kéreg enzimaktivitását még a biopterin kofaktor használata mellett sem tudtuk eddig megbízhatóan meghatározni.

A VI. táblázat azt mutatja, hogy a V-111 és sztereoizomerjei *in vitro* egyformán és nagyon gyengén gátolják a T-5-H aktivitását. Még 10^{-3} M-os koncentrációban sem számottevő (30%) a gátlás. Különösen szembetűnő ez, ha összehasonlítjuk a PCPA hatásával, ami 10^{-3} M-ban 70% gátlást eredményez

VI. táblázat

A V-111 sztereoizomerek hatása a triptofán-5-hidroxiláz aktivitására patkányagtörzs homogenizátumon *in vitro* kísérletekben

V-111, M.	(±)-V-111		(-)-V-111		(+)V-111	
	Aktivitás	%-os gátlás	Aktivitás	%-os gátlás	Aktivitás	%-os gátlás
0	4,4 \pm 0,09	0	4,4 \pm 0,09	0	4,4 \pm 0,09	0
10^{-6}	4,0 \pm 0,28	9	3,9 \pm 0,19	11	4,3 \pm 0,22	2
10^{-5}	3,8 \pm 0,20	14	3,6 \pm 0,81	18	3,8 \pm 0,16	14
10^{-4}	3,0 \pm 0,19	32	3,1 \pm 0,17	29	3,3 \pm 0,09	25
10^{-3}	2,7 \pm 0,19	39	2,5 \pm 0,21	43	2,7 \pm 0,22	39

Aktivitás: nmol/óra/mg fehérje \pm S. E. M.

(VII. táblázat). Mivel a PCPA sztereoiszomerek is rendelkezésünkre állottak, ezért a VII. táblázat adatai azt is bizonyítják, hogy a PCPA sem sztereospecifikusan gátolja a T-5-H, a nem sztereospecifikus amin szintézisét végző enzim aktivitását. Erre vonatkozóan nem ismerünk más adatot az irodalomban.

VII. táblázat

A PCPA sztereoiszomerek hatása patkányagytrözs triptofán-5-hidroxiláz aktivitására

PCPA, M.	(-)-PCPA		(+)PCPA	
	Aktivitás \pm S.E.M.	%-os gátlás	Aktivitás \pm S.E.M.	%-os gátlás
0	4,56 \pm 0,05	0	4,56 \pm 0,05	0
10 ⁻⁷	4,35 \pm 0,08	4,61	4,42 \pm 0,07	3,07
10 ⁻⁶	4,16 \pm 0,06	8,77	4,20 \pm 0,08	7,89
10 ⁻⁵	3,49 \pm 0,04	23,46	4,09 \pm 0,12	10,31
10 ⁻⁴	2,42 \pm 0,07	46,93	2,23 \pm 0,07	51,10
10 ⁻³	1,44 \pm 0,04	68,42	1,28 \pm 0,19	71,93

Aktivitás: nmol/mg fehérje/óra \pm S.E.M.

A PCPA hatáserőssége *in vitro*, ha meg is haladja a V-111-ét, más enzimek hatásos bénítóhoz viszonyítva ennek a hatása sem drámai, hiszen 10⁻⁷ M koncentrációban praktikusán még hatástalan. Kísérleteinkben megvizsgáltuk más para-halogenált fenilalaninok hatását is az agytrözs T-5-H aktivitására. Közülük csak a PJPA rendelkezik csekély hatással. A p-Br- és p-F-származékok hatástalanok (VIII. táblázat).

VIII. táblázat

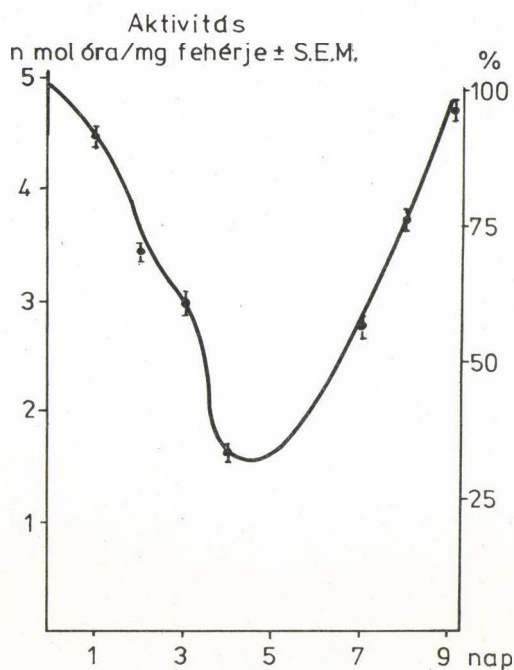
Para-szubsztituált fenilalanin-származékok hatása patkányagytrözs homogenizátum triptofán-5-hidroxiláz aktivitására *in vitro* kísérletekben

M	PBrPA		PFPA		PJPA	
	Aktivitás	%-os gátlás	Aktivitás	%-os gátlás	Aktivitás	%-os gátlás
0	11,6 \pm 1,66	0	11,6 \pm 1,66	0	11,6 \pm 1,66	0
10 ⁻⁷	11,7 \pm 1,43	0	11,5 \pm 1,74	0,9	11,4 \pm 1,61	1,7
10 ⁻⁶	12,1 \pm 1,94	0	11,8 \pm 1,84	0	9,5 \pm 1,94	18,1
10 ⁻⁵	12,4 \pm 1,76	0	11,4 \pm 2,54	1,7	7,3 \pm 0,97	37,1
10 ⁻⁴	10,8 \pm 1,47	7,0	9,7 \pm 1,66	16,4	5,4 \pm 0,6	53,4

Aktivitás: mol/óra/mg fehérje \pm S.E.M.

A V-111 ha gyengén gátolja is *in vitro* a T-5-H aktivitását, *in vivo* kezelés után jelentősebb a gátlás. Ha a patkányokat 15 mg/kg V-111-gyel kezeltük (s.c.), és különböző ideig tartó előkezelés után mértük az enzim aktivitását, azt találtuk, hogy a 4. napig egyre fokozódik a gátlás, majd ekkor fordulat áll be, és a

9. napra, a kezelés ellenére, kontrol enzimaktivitást kapunk (4. ábra). A patkányok az enzimaktivitás mérésének a napján, a dekapitálás előtt egy órával is kaptak V-111-et. 9 napos kezelést követően az agytörzsben kontrol szint fölé nem emelkedik az enzim aktivitása.



4. ábra. Krónikus V-111 kezelés (15 mg/kg/nap, s. c.) hatása patkányagygtörzs triptofán-5-hidroxiláz aktivitására. A patkányokat 1 órával a dekapitálás előtt a kísérlet napján is kezeltük

Az eredmények megbeszélése

A p-halogenált amfetamin származékok erősen és szelektíven gátolják a ^3H -5-HT szinaptoszómális felvételét. Eredményeinkből kitűnik, hogy a szelektivitás és a hatáserősség szempontjából a p-Br-szubsztitúció látszik legkedvezőbbnek.

A NA felvételi mechanizmusában Iversen neuronális (uptake_1) és extra-neuronális (uptake_2) felvételt különböztet meg (1967). Az előbbi mechanizmust a NA alacsony ($0,1-1,0 \mu\text{g/ml}$) az utóbbit a magas ($2-40 \mu\text{g/ml}$) koncentrációja telíti. Hasonló folyamatról számoltak be mások az 5-HT felvételét illetően is (Shaskan és Snyder 1970; Wong és mtsai 1973). Kísérleteinkben a V-111 10^{-6} M koncentrációja nem gátolta $2 \cdot 10^{-6}$ M ^3H -5-HT felvételét, míg ugyanez a dózis 50 %-os gátlást váltott ki a szokásosan alkalmazott 10^{-7} M

5-HT jelenlétében. Ez a tény arra utal, hogy a V-111 az 5-HT felvételének a nagy affinitású, neuronális folyamatát gátolja szelektíven.

A V-111 sztereoiszomerek az optikai centrummal nem rendelkező 5-HT felvételét egyforma erősen gátolják, míg a (+) izomer jobban hat a NA felvételére. A sztereoiszomerek nem mutattak eltérő hatást az 5-HT szintézisének gátlásában (T-5-H gátlás) és az 5-HT felszabadításában sem. A sztereoszелеktivitásra vonatkozó eredményeink jól egyeznek Snyder és mtsai (1970) kísérleteivel és következtetéseivel, akik az (-)-NA felvételét (+)-amfetammal jobban tudták gátolni, mint az (-)-módosulattal.

A felvételi mechanizmus sztereoszелеktivitása ellen szól az az észleletünk, hogy a (+)-V-111 a DA felvételét és felszabadítását is jobban befolyásolja, pedig a DA-nak — az 5-HT-hoz hasonlóan — szintén nincs optikai centruma. Az ellentmondás felveti annak a lehetőségét, hogy a DA — legalább részben — a nem sztereoszелеktív 5-HT mechanizmus útján is bejut a szerotonerg végkészülékbe és főleg ezt a folyamatot gátolja a V-111. Ezért gátolhatja jobban a V-111 a DA, mint a (-)-NA felvételét. Gondolni kell azonban arra a lehetőségre is, hogy részben a DA béta-hidroxilációja is végbemehet az inkubáció során, minek révén a DA noradrenaliná alakul.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a szinaptoszóma preparátum koncentrálja magában a triciált V-111-et és MA-t. Mivel a vegyületek különböző koncentrációi nem befolyásolják a kialakuló koncentrálsági indexet, a szinaptoszóma frakcióban kialakuló koncentráció elsősorban passzív eloszlás eredménye lehet. E mellett szól az is, hogy a MA-nál 8-szor lipoidoldékonyabb V-111 (Magyar és mtsai 1977) ér el magasabb koncentrációt a szinaptoszóma frakcióban. Mivel azonban a 37 °C-on mért koncentrálsági indexek mintegy 1,3—1,5-ször magasabbak a 4 °C-nál mérteknél, csak további kísérletek — így az eloszlás hőmérséklet-függésének, ill. az aktív felvétel aspecifikus gátlóhatóságának vizsgálata — zárhatnák ki a MA és V-111 aktív felvételének lehetőségét. Aktív felvételük jól magyarázná a biogén aminok felvételének kompetitív gátlását *in vitro* kísérletekben. A p-Cl-amfetamin esetében mások is bizonyították a vegyület jelentős akkumulációját patkányagy homogenizátum szinaptoszóma frakciójában (Wong és mtsai 1972).

A V-111 patkányoknak egyszer beadva (s.c.), tartósan — hetekig — csökkenti az agyi 5-HT szintjét és felvételét. Hasonló adatokról számolnak be mások a p-Cl-amfetamin és a p-Cl-metilamfetamin esetében is (Sanders — Bush és mtsai 1975). A tartós 5-HT-szint csökkenésében mindenképpen szerepe lehet a T-5-H enzim tartós gátlásának is (Gál 1972). Az *in vitro* észlelt, kompetitív jellegű, akut amin-felvétel gátlása (Knoll és Magyar 1971, Magyar 1972, Knoll és mtsai 1972) egyszerűen az aminoknak a V-111-gyel történő kompetíciójával magyarázható, az 5-HT-szint csökkenése pedig a felvétel-gátlás, a kiváltott kisméretű release és a szintézisgátlás együttes hatásának következménye lehet. Ezek a jelenségek időben jól korrelálnak a V-111 szerkezetbeni

sorsával, kiürülési félidejével (Magyar és mtsai 1977). Az 5-HT felvételének tartós gátlása és szintjének tartós csökkenése azonban inkább azzal magyarázható, hogy a V-111 vagy annak metabolitjai, tartós elváltozást (károsodást) okoznak a szerotonerg idegvégződésekben. Ennek következménye még akkor is fennáll, amikor a V-111 már kiürült a szervezetből.

A patkánykísérletekben észlelt biokémiai módszerekkel bizonyított tartós V-111 hatások kiváltásában a metabolitokra azért is gondolunk, mert a p-halogen-szubsztitúció miatt az amfetamin természetes, fő metabolikus útja a p-hidroxiláció (Dring és mtsai 1966) nem mehet végbe, hanem a lebontás nem természetes útra terelődik (Magyar és mtsai 1977). Ennek főbb lépései a demetiláció, az oxidatív-dezamináció, majd további oxidatív és redukzív lépések, konjugáció vezetnek a p-bróm-benzoészavhoz, illetve a p-bróm-hippurészavhoz. Hasonló átalakulásról számolnak be Sanders-Bush és mtsai (1974) a p-Cl-amfetamin és p-Cl-metilamfetamin esetében. Az általunk identifikált metabolitokon túl mód lehet olyan, kovalens kötésekre hajlamos metabolitok képződésére is (epoxid, hidroxilamin), melyek felelősek lehetnek az axonok degenerációjáért. Ezek képződésére fokozott lehetőséget nyújt az is, hogy a V-111 koncentráldódik az idegvégződésekben, amit direkt kísérlettel is igazoltunk. A hatásért felelőssé tehető metabolit létét direkt módon még senki sem igazolta. Smith és mtsai (1974) a p-Cl-norefedrinről és a p-Cl-pszudonorefedrinről — melyek a p-Cl-amfetamin metabolitjai — bizonyította, hogy nem váltanak ki hasonló hatást. A V-111 tartós hatásában a biokémiai elemzések alapján joggal feltételezhető a citotoxikus hatásmód, ennek direkt bizonyítása azonban csak hisztológiai vagy elektronmikroszkopos vizsgálatokkal lehetséges.

Külön elemzést érdemel a p-halogenált amfetaminok triptofan-5-hidroxiláz aktivitására kifejtett hatása, mely *in vitro* alig, *in vivo* kifejezettebben érvényesül. A PCPA esetében Gál és mtsai (1970) bizonyították, hogy a halogenált aminosav beépül az enzimbe, és ezáltal hozza létre a tartós gátlást. Hasonló hatásmód nem volt bizonyítható a halogenált amfetaminok esetében (Gál 1972). Elképzelhető azonban, hogy a T-5-H tartós gátlása is kovalens kötésre képes metabolit hatásának a következménye (Gál 1972).

Tartós V-111 kezelés mellett mi a 8–9. napra az 5-HT neuronokban gazdag agytörzsekben a kezelés ellenére a T-5-H regenerációját észleltük. Az agytörzsben a regenerációt segítheti az, hogy tartós V-111 kezelés során fokozódik a vegyület metabolizmusa és a 16–17. napra a vegyület demetilációjának mintegy 3-szoros fokozódását észleltük patkányok máj-mikroszóma preparátumán. A V-111 fokozott metabolizmusa — ami indukció útján jön létre — fokozza a vegyület vizelet-ürítését is a patkányok szervezetéből (Magyar és mtsai 1977).

A V-111 kezelést követő tartós változások (5-HT felvétel-gátlás, szint-csökkenés, T-5-H-gátlás) kísérleteink szerint nem olyan tartósak (2–3 hét), mint azt a p-Cl-amfetamin esetében Sanders — Bush és mtsai leírták (1975). Kí-

sérleteikben három hónap múlva még 50 %-os felvétel- és szintézisgátlásról számoltak be. A V-111 p-Cl-amfetaminhoz hasonló, de kevésbé tartós hatása miatt alkalmasabb eszköznek látszik a tartós hatások kialakulási mechanizmusának kísérletes elemzésére.

Összefoglalás

A p-szubsztituált amfetamin (A)-származékok (p-F-amfetamin, p-Cl-metilamfetamin, p-Br-metilamfetamin, V-111) szelektíven és erősen gátolják a szerotonin (5-HT) felvételét patkányagy szinaptoszóma preparátumon, *in vitro* kísérletekben. Azonos kísérleti feltételek mellett a dopamin (DA) felvételét az általunk vizsgált vegyületek közül az A gátolja a legerősebben. A halogenált A származékok is hatnak a DA és a noradrenalin (NA) felvételére, bár hatáserejük elmarad az 5-HT felvételére kifejtett gátlás erejétől.

A V-111 sztereoizomerjei egyformán gátolják az 5-HT szinaptoszómális felvételét, míg a NA és DA felvételére a (+)-V-111 hatása kifejezettebb. A V-111 *in vivo*, egyszeri kezelés után (15 mg/kg), irreverzibilisen gátolja a három amin felvételét, és a teljes regeneráció mintegy 3 hét múlva következik be. A ³H-metilamfetamin (³H-MA) és különösen a lipoidoldékonyabb ³H-V-111 az inkubációs közeg koncentrációjához viszonyítva felhalmozódik a szinaptoszóma preparátumban. Valószínű, hogy a két vegyület ehhez a folyamathoz a biogén aminok aktív felvételi mechanizmusát veszi igénybe, és ezért alakul ki a kompetitív jellegű felvételtgátlás az 5-HT, a DA és a NA esetében, *in vitro* kísérletekben.

A V-111 sztereoizomerjei egyformán kis mértékben szabadítanak fel 5-HT-t *in vitro* kísérletekben. A (+)-V-111 DA-felszabadító hatása erősebb és a (+)-módosulat hat jobban a NA felszabadítására is. Egyszeri kezelés után (15 mg/kg s.c.) a V-111 tartósan csökkenti a kereg 5-HT koncentrációját, kevésbé kifejezett viszont ez a hatása az agytörzsre.

A V-111 és a p-Cl-fenilalanin (PCPA) sztereoizomerjei egyformán kis mértékben csökkentik a T-5-H enzim aktivitását *in vitro* kísérletekben, *in vivo* azonban jelentősen gátolják az enzimet. Tartós kezelés során a 8–9. napra, a naponta adott V-111 kezelés ellenére a T-5-H aktivitása az agytörzsben eléri a kontrol szintet.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a V-111 eltérően befolyásolja a kereg és az agytörzs szerotonerg rendszerét. Ez arra enged következtetni, hogy a vegyület más módon hat a szerotonerg idegsejtekre, mint a szerotonerg idegvégződésekre. Az irreverzibilis hatások kialakulását a V-111 vagy inkább metabolitja által kiváltott kovalens kötés következményének tartjuk.

Kísérleteink azt bizonyítják, hogy az optikai centrummal nem rendelkező 5-HT központi idegrendszeri regulatív folyamatait — szintézis, felvétel, felszabadítás — a V-111 sztereoizomerek nem befolyásolják sztereoselektíven.

IRODALOM

- Diaz, P. M., Ngai, S. H. és Costa, E.: In: *Advances in Pharmacol.* **6**, Part B, p. 75 (1968).
- Dring, L. G., Smith, R. L. és Williams, R. T.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **18**, 402 (1966).
- Ferris, R. M., Tang, F. L. M. és Maxwell, R. A.: *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **181**, 407 (1972).
- Gál, E. M., Roggeveen, A. E. és Millard, S. A.: *J. of Neurochemistry* **17**, 1221 (1970).
- Gál, E. M.: In: *Studiens of Neurotransmitters at the Synaptic Level* (Eds: Costa, E., Iversen, L. L. és Paoletti, R.) *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, Raven Press, New York **6**, 149 (1972).
- Gál, E. M. és Petterson, K.: *Anal. Biochem.* **52**, 626 (1973).
- Iversen, L. L.: In: *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*, Cambridge Univ. Press, London, (1967).
- Knoll, Berta, Held, Katalin és Knoll, J.: In: *Symposium on Pharmacology of Learning and Retention, First Congr. of the Hung Pharmacol. Soc. Vol 4*, (Ed: Knoll, Berta), Akadémiai Kiadó, Budapest, 43 (1974).
- Knoll, Berta: *Orvostudomány*, **27**, 59 (1976).
- Knoll, J., Vizi, E. S. és Ecséri, Z.: *MTA V. Oszt. Közl.*, **16**, 227 (1965).
- Knoll, J., Vizi, E. S. és Ecséri, Z.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **159**, 442 (1966).
- Knoll, J. és Vizi, E. S.: *Pharmacol. Res. Communications*, **2**, 67 (1970).
- Knoll, J. és Magyar, K.: In: *Third Int. Meeting of the Int. Soc. for Neurochem. Budapest*, Abstr. p. 231 (1971).
- Knoll, J., Magyar, K., Vizi, E. S., Knoll, Berta, Török, T. és Jóna Gabriella: *Orvostudomány*, **23**, 99 (1972).
- Knoll, J., Vizi, E. S. és Magyar, K.: In: *Recent Developments of Neurobiology in Hung. 3*, Results in Neuroanatomy, Neurophysiology, Neurophathophysiology and Neuropharmacology, (Ed.: Lissák, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 167 (1972a).
- Knoll, J., Magyar, K., Vizi, E. S., Török, T., Satory, Éva és Jóna, Gabriella: In: *Symposium on Pharmacological Agents and Biogenic Amines in the Central Nervous System. First Congr. of the Hung. Pharmacol. Soc. Vol. 1*, (Ed.: Magyar, K.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 13 (1973).
- Knoll, J.: In: *Symposium on Pharmacology of Learning and Retention, First Congr. of the Hung. Pharmacol. Soc. Vol. 4*, (Ed.: Knoll Berta), Akadémiai Kiadó, Budapest, 73 (1974).
- Lowry, O. L., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- Magyar, K., Satory, Éva, Zsilla, Gabriella és Knoll, J.: In: *Seventh Meeting of the Federation European Biochemical Soc. Várna*, Abstr. No. 847 (1971).
- Magyar, K.: *Activ Nerv. Sup.* **14**, 4 (1972).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: *Fifth Int. Congr. on Pharmacology, San Francisco*, Abstr. No 865 (1972).
- Magyar, K., Satory, Éva, Jóna, Gabriella és Knoll, J.: *Acta Physiol. Hung.* **41**, 356 (1972).
- Magyar, K. és Knoll, J.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. Suppl.* **285**, R-53 (1974).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: *Fifth Congr. of the Polish Pharmacol. Soc. Szczecin*, Abstr. p. 35 (1975a).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: *Fifth Int. Meeting of the Int. Soc. for Neurochem. Barcelona*, Abstr. No 444 (1975b).
- Magyar, K. és Knoll, J.: *Polish J. Pharmacol. Pharm., Suppl.* **27**, 139 (1975 c).
- Magyar, K. és Knoll, J.: In: *Sixth Int. Congr. of Pharmacol. Helsinki*, Abstr. No 372 (1975 d).
- Magyar, K., Hajnal, L. és Knoll, J.: In: *Monoaminergic Mechanisms in the Central Nervous System. Second Cong. of the Hung. Pharmacol. Soc. Vol. 3*, (Ed.: Magyar, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 9 (1976).
- Magyar, K., Tekes, Kornélia, Zólyomi, G., Szüts, T. és Knoll, J.: *Orvostudomány, közlés alatt* (1977).
- Miller, F. P., Cox, R. H., Snodgrass, W. R. JR. és Maickel, R. P.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 345 (1970).
- Sanders-Bush, E. és Sulser, F.: *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **175**, 419 (1970).
- Sanders-Bush, E. és Bushing, J. A.: *Fed. Proc.* **30**, 381 (1971).
- Sanders-Bush, E., Gallager, D. V. és Sulser, F.: In: *Advances in Biochem. Psychopharmacol. Vol. 10*, (Ed.: Costa, E., Gessa, G. L. és Sandler, M.) Raven Press, New York, 185 (1974).
- Sanders-Bush, E., Bushing, J. A. és Sulser, F.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **192**, 33 (1975).
- Shaskan, E. G. és Snyder, S. H.: *J. Pharmac. Exp. Ther.* **175**, 404 (1970).
- Shulgin, A. T.: *Experientia*, **19**, 127 (1963).
- Shulgin, A. T.: *Experientia*, **20**, 366 (1964).