

A DROGMETABOLIZMUS VIZSGÁLATA

A biotranszformáció a szervezetbe jutott testidegen anyagok átalakítását és vízoldhatóvá tételét, egyes jelátvivő molekulák szintézisét és lebontását, valamint mindezen vegyületek membránokon át való transzportját és a szervezetből való kijutását jelenti. Az előkészítő fázisban oxidáció vagy redukció vagy hidrolízis során -OH, -NH₂, -SH, -COOH csoportok keletkeznek. A második fázisban a reaktív csoportok glukuronsavval, szulfáttal, glutationnal, aminosavakkal, metilcsoporttal konjugálódnak. A 3. fázisban kiürülnek a sejtből és a vérbe jutnak, a vérből a szűrletbe kerülnek és a vizelettel távoznak, vagy a májból az epébe szekretálódnak, a bélbe jutnak és a széklettel ürülnek.

A gyakorlaton az emlősök endoplazmás retikulumában levő citokróm P450 enzimrendszer (CYP) működését vizsgálják. Az elektronok NADPH-ról a citokróm P450-reduktáz FAD, majd FMN prosztetikus csoportjára kerülnek, aztán az egyik citokróm P450 hemoprotein vasionját redukálják. Az ER-ben levő zsírsavdeszaturázok működésében a citokróm b5 és citokróm b5-reduktáz is részt vesznek a CYP mellett. Mikroszómának nevezzük a sejtalkotók differenciálcentrifugálása során a sejtmag és mitokondrium kiülepítése után az összes maradék membránból (plazma, ER stb.) képződő, vezikulákat tartalmazó üledéket. A mikroszómális elektrontranszportlánc ezért az ER membránjában levő CYP enzimrendszert jelenti. Az összes ilyen enzimünk együttesen mintegy 60-féle reakciót katalizál. A leggyakoribb a hidroxiláció, gyakori az azt követő további oxidáció és kovalens kötés hasadása. Mivel az oxigénmolekula egyik atomja beépül a szubsztrátba, monooxigenáznak nevezzük, mivel a másik atom vízzé redukálódik közben, kevert funkciójú oxigenáznak hívjuk a CYP enzimrendszert.

A mitokondriumokban levő CYP enzimrendszerek a szteroidhormonok, epesavak szintézisében, a D-vitamin metabolizmusában vesznek részt, az enzimrendszer alkotói az adrenodoxin-reduktáz (ferredoxin-reduktáz) FAD tartalmú fehérje és adrenodoxin (ferredoxin) vaskénfehérje a CYP izoenzim mellett.

A CYP enzimrendszer szabályozása génszinten történik. Gyógyszerek, vegyszerek, táplálék-, fűszer-, gyógynövények, növényi és gombamérgek, szennyezőanyagok, hormonok, A- és D-vitaminszármazékok nem csak a biotranszformációs enzimek átalakítandó szubsztrátjai lehetnek, hanem transzkripció faktorok, ú.n. magi receptorok ligandjai is, miáltal fokozni képesek pl. CYP enzimfehérjék mRNS-ének szintézisét, vagyis induktorként hatnak, vagy éppen gátolják a transzkripciót, tehát represszorok. Egyes vegyületek sokféle izoenzimet indukálnak, ilyen a gyakorlaton vizsgált fenobarbitál altatószer is, mások elég specifikusak, pl. a füstöléskor keletkező, dohányfüstben levő policilusos aromás szénhidrogének.

A gyakorlaton in vitro körülmények között az ER, tehát a mikroszóma N-demetiláz aktivitását fogjuk vizsgálni. A láz- és fájdalomcsillapító szubsztrát az aminofenazon (amidazofen), metilcsoportja először -CH₂OH-vá oxidálódik, aztán tovább oxidálódva formaldehidként lehasad, és szabad -NH₂ csoport marad a gyógyszermolekulán.

A mérés elve

A mikroszómális elektrontranszportlánc által katalizált reakciók in vitro is ugyanúgy mennek végbe, mint in vivo. Az in vitro rendszer (az inkubációs elegy) komponensei a következők: mikroszóma, NADPH és szubsztrát, melyeket pH 7,5-re állított pufferbe tesznek, oldott oxigén. Az elegyet 37 °C-on inkubáljuk és a keletkezett termékek valamelyikét, jelen esetben a formaldehidet mérjük.

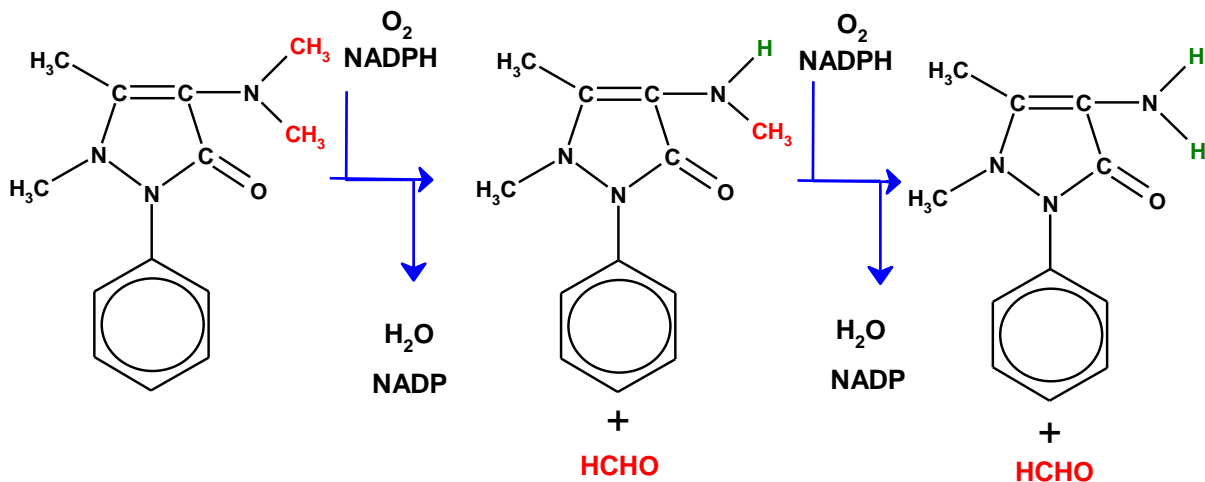
Mikroszóma, ill. posztmitokondriális frakció preparálása

A mikroszómát májból állítjuk elő differenciálcentrifugálással. Ez azt jelenti, hogy a pufferben homogenizált májat először 13000 g-vel centrifugáljuk, kiülepítve a sejtmag és mitokondrium frakciót. A felülúszóban (ú.n. posztmitokondriális frakció) maradt mikroszóma frakciót 105 000 g-vel ultracentrifugában lehetne ülepíteni, de a citoplazmára is szükség van a kísérlethez.

A mikroszómát fenobarbitállal kezelt (indukált) és nem kezelt (kontroll) hím patkányok májából preparáljuk. A máj drogmatabolizáló rendszerét 3-4 napon keresztül, 0,2 %-os fenobarbitál oldat itatásával indukáljuk. A gyakorlat kezdetén a preparátum rendelkezésre áll úgy, hogy fehérjetartalma mind az indukált, mind a kontroll esetében 30 mg/ml.

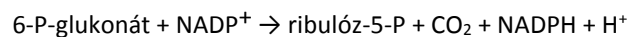
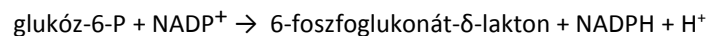
N-demetiláz aktivitás

Több lehetséges vegyület közül (etilmorfin, amfetamin, anilin stb.) a gyógyszerként általánosan használt ún. láz- és fájdalomcsillapítók csoportjába tartozó amidazofen [4-(dimetilamino)-1-fenil-2,3-dimetil-pirazon; Aminophenazonum (Ph)] használjuk, amely az alábbi reakció szerint demetilálódik.



NADPH-generálás

A reakcióhoz szükséges NADPH koenzimet in situ állítjuk elő a májsejt citoplazmájában amúgy is magas aktivitásban jelenlevő glukóz-6-P-dehidrogenáz és 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz segítségével, melyek az alábbi reakciót katalizálják a pentóz-foszfát-ciklusban:

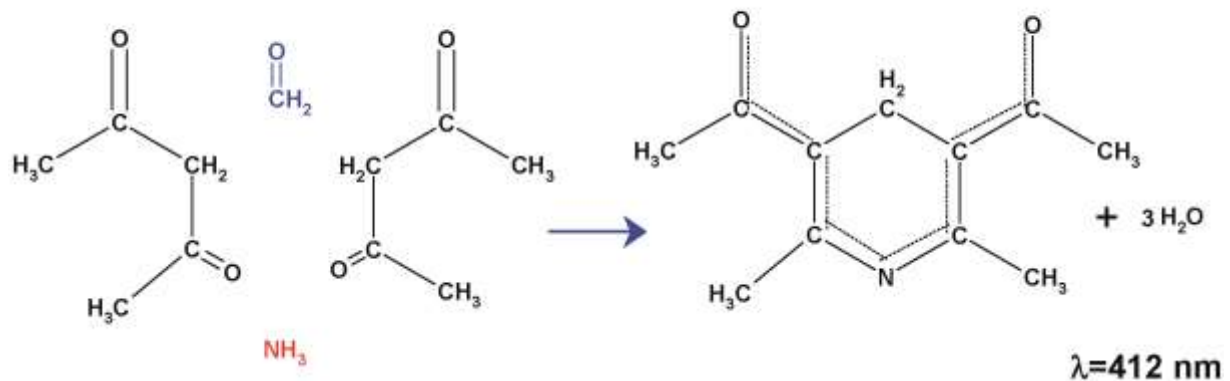


Ezért nem centrifugáljuk ki a mikroszómát a dehidrogenázokat tartalmazó citoplazmafrakcióból, hanem a kettőt együtt használjuk és a NADPH-t generáló rendszernek csak a másik két komponensét a NADP-t és a glukóz-6-P-ot adjuk az inkubációs elegyhez.

Formaldehid meghatározásának elve

A keletkezett termékek közül a formaldehid könnyen mérhető az ún. Nash-reakcióban. Itt két acetilacetone, egy ammónia és egy formaldehid egy kiterjedt konjugált kettőskötésrendszert tartalmazó sárga molekulává (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin) egyesül. A keletkezett vegyület abszorbanciáját 412 nm-en mérjük vizet használva vakként.

A MgCl₂ csökkenti a lipidperoxidációt, a Na-pirofoszfát gátolja a NADPH-t bontó mikroszomális pirofoszfátáz.



Szükséges oldatok:

- 1.) 30 mg fehérje/ml-es posztmitokondriális felülűszó (pmf) kontroll és indukált;
- 2.) 0,05 M K-foszfát ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) puffer pH 7,5;
- 3.) 1 mM NADP;
- 4.) 0,01 M glukóz-6-P-Na;
- 5.) 0,1 M aminofenazon;
- 6.) 1,0 M MgCl_2 ;
- 7.) Na-pirofoszfát
- 8.) 40% TCA (triklórecetsav);
- 9.) Nash-reagens: 100 ml ecetsav + 500 ml ammónium-acetát + 6 ml acetilaceton + 394 ml deszt. víz ;
- 10.) 1,32 mM formaldehid vizes oldat (kalibrációhoz);

A gyakorlat kivitelezése

A gyors és kényelmes munka érdekében az alábbi két elegyet készen kapják.

- 1./ Reakciókeverék (mix): 50 mM K-foszfát puffer pH 7,5; 1mM NADP, 10 mM glu-6-P-Na, 20 mM MgCl_2 (680 ml foszfátbuffer, 10 ml of NADP, 100 ml glukóz-6-P, 200 ml Na-pirofoszfát és 10 ml MgCl_2 vizes oldatban.)
- 2./ Nash-reagens: 995 ml ammónium-acetát vizes oldata; 3 ml ecetsav; 2ml acetilaceton.

10 db Eppendorf-centrifugacsövet megszámozunk úgy, hogy a 2×5 db-os sorozatot egymástól eltérő jelzéssel (indukált és kontroll) is ellátjuk. Mindegyik csőbe 200 μl 40%-os TCA-t, (erős és elég tömény szerves savat) teszünk, amely majd leállítja a reakciót.

Ezután mérjük össze két, számozott Erlenmeyer-lombikba az inkubációs elegyeket:

K-foszfát puffer	2,65 ml
reakciókeverék (mix)	3,50 ml
pmf. kontroll vagy indukált	0,50 ml

A két rendszer annyiban különbözik, hogy az egyikbe kontroll, a másikba indukált patkánymájából származó posztmitokondriális felülűszót teszünk. Ezután mindkét lombikot vízfürdőben 37°C -on kb. 3-4 percig előinkubáljuk. Ez alatt az elegyek felveszik az inkubáció hőmérsékletét és kialakul a szükséges NADPH koncentráció is.

Inkubáció és leállítás

A tényleges inkubációt és az időmérést ezután indítjuk 350 µl 0,1 M-os aminofenazon hozzáadásával az 1. Erlenmeyer-lombikba (anélkül, hogy kivennénk a vízfürdőből). A második lombikhoz 1 perccel később adjuk hozzá az aminofenazont, mert így a két lombikkal történő párhuzamos munka ellenére is kényelmesen tartani tudjuk a mintavételezési időpontokat. Az inkubáció során a lombikokat vízfürdőben lassan rázatjuk, hogy ezzel biztosítsuk a bennük folyó monooxygenáz reakciók oxigénigényét, de leállítjuk a rázatást mintavételezéskor.

A lombikokból a következő időpontokban 1 ml-es mintákat veszünk: 2,5; 5; 10; 15 és 20 perc inkubáció után, és a megfelelő, 200 µl erős savat, TCA-t tartalmazó Eppendorf-csövekbe tesszük lassan, óvatosan, hogy ne fröccsenjen ki, majd a csöveket lezárva összerázzuk. A 2. Erlenmeyer-lombikból a mintavételezési időpontok 1-1 percet csúsznak: 3,5; 6, 11, 16, 21 perc.

A formaldehid koncentrációjának meghatározása

1. Kalibrációs sorozat készítése – a gyakorlati előkészítők által, a hallgatók megkapják a grafikon

Számozott kémcsövekbe az 1,32 mM-os formaldehid oldatból a következőket mérjük:

0; 20; 40; 60; 80 és 100 µl. Ezután ezeket K-foszfát pufferrel 1,00 ml-re kiegészítjük.

2. A minták formaldehid-koncentrációjának meghatározása

A lezárt Eppendorf-centrifugacsőben levő, TCA-val kicsapott mintákat Eppendorf-centrifugában lecentrifugáljuk (10 000 rpm, 6 perc), ügyelve a centrifuga kiegyensúlyozására, majd az 1 ml felülúszókat számozott új kémcsövekbe pipettázzuk. Érdemes a fazékban a vízfürdőt előmelegíteni 60-65 °C közé a centrifugálás alatt.

Végül a kísérleti mintákhoz 2-2 ml Nash-reagenst mérünk, majd 60 °C-os vízfürdőbe tesszük őket. Ekkor már nem melegítjük a vízfürdőt a Bunsen-égővel. 15 perc inkubálás után a kémcsöveket óvatosan kivesszük kémcsőfogóval. A keletkezett sárga szín fényelnyelését 412 nm-en mérjük, vizet használunk vakként. (Az oldatok sárga színe több órán át stabil.)

Kiértékelés

A kalibrációs sorozat abszorbanciáinak segítségével kalibrációs görbét készítenek, ami az origóból kiinduló egyenes, majd ennek felhasználásával meghatározzuk a levett minták formaldehidkoncentrációját (nmol/mg fehérje). A kapott értékeket az idő függvényében ábrázoljuk. A fenobarbitállal történő indukció hatására a mikroszóma (ER) aminofenazont N-demetiláló aktivitása jelentősen növekedett minden mintában, és az inkubációs idő növekedésével nő a keletkezett formaldehid mennyisége.