



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

Új *in vitro* kémiai modell a foszfolipidózis előrejelzésére a gyógyszerkutatás korai fázisában



RICHTER GEDEON

Készítette: **Müller Judit**

Témavezető: **Dr. Balogh György Tibor**

Richter Gedeon Nyrt., osztályvezető
címzetes egyetemi docens

2011.

Tartalom

Köszönetnyilvánítás	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi rész.....	5
2.1. A foszfolipidózis jelensége és kialakulásának mechanizmusa	5
2.2. Lehetséges mellékhatások	7
2.3. A foszfolipidózis azonosítása és előrejelzése.....	7
2.3.1. <i>In silico</i> módszerek.....	7
2.3.2. <i>In vitro</i> nem-sejtes módszerek.....	9
2.3.3. <i>In vitro</i> sejtes módszerek.....	10
2.3.4. <i>In vivo</i> kísérletek	10
2.3.5. Újabb lehetőségek	10
3. Célkitűzés	13
4. Vizsgálatok, eredmények	13
5. Kísérleti rész.....	25
5.1. Felhasznált anyagok	25
5.2. Felhasznált eszközök.....	26
5.3. Kromatográfiás mérés körülményei	26
5.4. A PAMPA rendszer összeállítása.....	26
5.5. Felhasznált egyenletek	27
6. Összefoglalás.....	28
7. Melléklet.....	29
8. Irodalomjegyzék.....	33

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak minden segítségéért és türelméért. Köszönöm, hogy lehetőséget adott, hogy a Szintézistámogató Laboratóriumban dolgozzam, és hasznos tanácsaival, iránymutatásával sok hasznos szakmai tapasztalatot szerezzek.

Köszönöm Könczöl Árpádnak és Csomontányi Józsefné Marikának, hogy a laboratóriumi munkám során hozzájuk is fordulhattam kérdéseimmal, és mindig készségesen segítettek.

1. Bevezetés

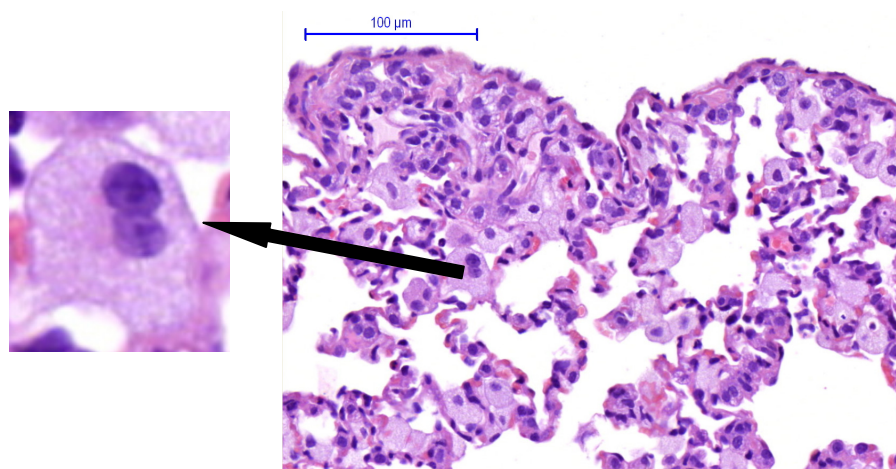
Az elmúlt két évtizedben az ipari gyógyszerkutatás gyakorlatában előtérbe került a kombinatorikus kémia és a nagy áteresztőképességű biológiai aktivitás alapján szűrő módszerek (high throughput screening, HTS) alkalmazása. Ennek eredményeképpen a gyógyszergyárak nagyszámú molekulát tartalmazó táraikat, ún. molekulabankokat hoztak létre. A felgyorsult eredeti gyógyszerkutatásnak köszönhetően az elsődleges HTS biológiai szűrésből nagyszámú és viszonylag gyenge ADME/Tox (abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréció, toxikus hatások) tulajdonságot hordozó gyógyszerjelölt vegyületek kerültek kiválasztásra¹. Emiatt a gyógyszerkutatás minél korábbi fázisában szükségessé vált a vegyületek elsősorban felszívódási, biohasznosulási tulajdonságának jellemzése, toxikológiai mellékhatásainak előrejelzése, ezen sajátságainak szerkezet alapú javítása. A toxikus mellékhatások egyik ismert megjelenési formája a foszfolipidózis, mely a kutatás korai fázisában előre jelezhető, és megfelelő szerkezeti változtatásokkal kiküszöbölhető. A gyógyszerek felszívódásának előrejelzésére általánosan a transzportfolyamatokat leíró fizikai-kémiai sajátságokat, mint a proton-disszociációt (pK_a), a lipofilitást ($\log P/D$), illetve a permeabilitást (P_e , effektív permeabilitás) használják². Költséghatékonysági szempontból is különösen fontos a gyógyszerjelölt vegyületek korai fázisú fizikai-kémiai profilírozása *in silico* és *in vitro* módszerekkel.³ Munkám során ezeket az eszközöket igyekeztünk felhasználni a foszfolipidózis előrejelzésére.

A Richter Gedeon Nyrt. originális kutatásán a Szintézistámogató Laboratóriumban 2005 óta folyik kiterjedten a hatóanyag jelöltek fizikai-kémiai jellemzése, illetve folynak alapkutatások ebben a témakörben. Az itt bemutatott tudományos diákköri munkámban a korábban szintén ezen a kutatóhelyen végzett permeabilitási vizsgálataimat (2010-es TDK dolgozat) folytatva kezdtem foglalkozni a foszfolipidózis modellezésével a mérhető fizikai-kémiai paraméterek eszköztárának segítségével.

2. Irodalmi rész

A gyógyszerek által kiváltott toxikus hatások közül az egyik legismertebb, több szervet is érintő megjelenési forma a foszfolipidózis. Ez egy főként kationos amfifil gyógyszerek által kiváltott lipid-anyagszere megváltozásával járó rendellenesség, ami egyes sejtekben foszfolipidek felhalmozódásához vezet⁴.

A foszfolipidózis megjelenését alapvetően két fajta citológiai elváltozással szokták azonosítani. Elsőként Nelson és Fitzhugh⁵ (1948) írták le habos citoplazmájú alveoláris makrofágok felhalmozódását patkányok tüdőszöveteiben krónikus klorokvin kezelést követően (1. ábra). 1968-ban Gleiser és mtsai⁶ klorokvinnel kezelt sertések központi idegrendszerében azonosítottak a lizoszómákban felhalmozódó lipideknek köszönhetően létrejövő, jellemző morfológiai megjelenésű ún. lamelláris testeket. Az első átfogó tanulmányt a gyógyszer indukálta foszfolipidózisról 1975-ben Lüllmann és mtsai. publikálták⁷. A foszfolipidózis, mint kritikus toxikológiai mellékhatás jelentőségét az is bizonyítja, hogy 2004-ben az FDA létrehozta az „FDA Phospholipidosis Working Group”-ot, ezzel is hangsúlyozva az e témára irányuló kutatások fontosságát.

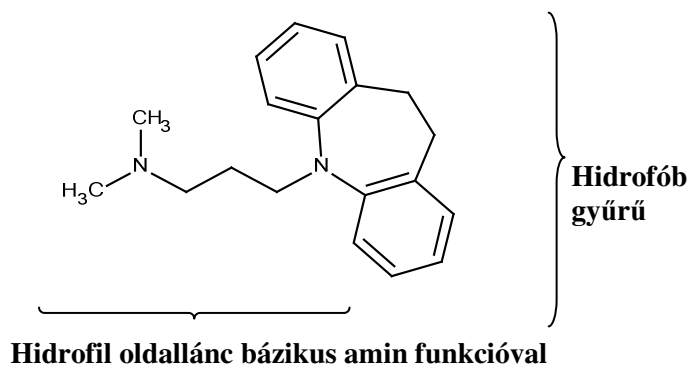


1. ábra. Habos citoplazmájú alveoláris makrofágok patkány tüdőben⁸

2.1. A foszfolipidózis jelensége és kialakulásának mechanizmusa

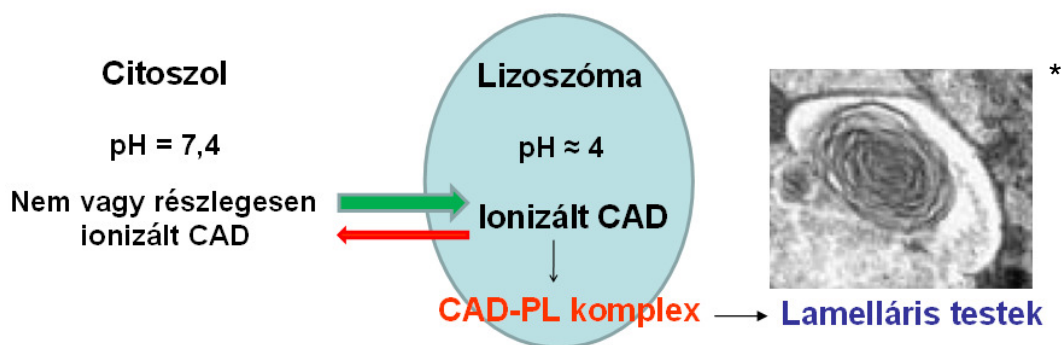
Foszfolipidózisnak (PLD) nevezzük a foszfolipidek túlzott felhalmozódását a sejtekben⁹. Ezzel a lipid anyagszere rendellenességgel, mely szövetspecifikusan módosítja egyes sejtek fiziológiáját, mind a már kereskedelmi forgalomban levő gyógyszereknél, mind a gyógyszerkutatás és fejlesztésben problémát okoz. A jelenleg is alkalmazott gyógyszerkincs 5 %-ánál írták le a foszfolipidózis megjelenését¹⁰. A foszfolipidózist megfigyelések szerint általában a kationos amfifil gyógyszerek (CAD, hidrofób gyűrűs részt és hidrofíl, bázikus

amin funkcióval rendelkező oldalláncot tartalmazó vegyületek) többször ismételt adagolása váltja ki, embereknél és állatoknál egyaránt tapasztalható (2.ábra).



2. ábra. Kationos amfifil molekulák (CAD) jellemző szerkezeti tulajdonságai

A foszfolipidózis kialakulására a szakirodalom kétféle lehetséges mechanizmust említ¹¹: (a) a nagy lipofilitású gyógyszerek könnyen átjutnak a lizoszómák membránján, itt savas közegbe (pH = 4) kerülve protonálódik a bázikus nitrogénjük. A protonálódás (polaritás növekedése) megakadályozza a kifelé történő diffúziót, így az ilyen típusú gyógyszerek a lizoszómán belül maradnak¹² (3. ábra), (b) a foszfolipázok gátlásával vagy a gyógyszerek lipidekhez való kötődésével direkt vagy indirekt módon zavar lép fel a foszfolipidek katabolikus és anabolikus folyamatában, így alakul ki a foszfolipidózis¹³.



3. ábra. A foszfolipidózis lehetséges mechanizmusa

Többféle szövetben kialakulhat a foszfolipidózis, de legtöbb megfigyelés a tüdő alveoláris makrofágjaiban felhalmozódó foszfolipidekről számol be¹⁴. Fénymikroszkópos felvételeken a képződött lamelláris testek jól láthatóak, ún. „habos” alveoláris makrofágok jelennek meg (1. ábra). A tüdőn kívül a májban¹⁵, a vesében¹⁶, a központi idegrendszerben¹⁷, a mellékvesében és limfatikus rendszerben¹⁸ figyelték meg a foszfolipidek felhalmozódását. A

jelenség vizsgálatok alapján azonban fajtól, nemtől és kortól független. A folyamat általában reverzibilis, a gyógyszer adagolásának felfüggesztését követően visszaáll a sejtek eredeti fiziológiás állapota, megszűnik a lipidek további felhalmozódása, katabolikus-anabolikus egyensúlyuk helyreáll.

2.2. Lehetséges mellékhatások

A foszfolipidózissal összefüggő mellékhatások tünetei hasonlóak, mint a lizoszóma alulműködésével járó betegségeké. A lipidek felhalmozódása jellegzetes neurodegradatív tüneteket (Tay-Sachs és Niemann-Pick kór¹⁹) okozhat, hepatitisz és glomeruláris proteinúria (Fabry-kór²⁰) is kialakulhat. A makrofág diszfunkció tüdőgyulladás kialakulásához vezethet²¹. A foszfolipidózis és a toxicitás közti ok-okozati összefüggések még nem pontosan tisztázottak, a dózis és idő függés azonban igen jelentős.

2.3. A foszfolipidózis azonosítása és előrejelzése

A foszfolipidózis kialakulása elkerülendő, így előrejelzése már a gyógyszerkutatás korai fázisában is nagy jelentőséggel bír. Több *in silico*, *in vivo* és *in vitro* sejtes módszert is kifejlesztettek az előrejelzésére, ám ezek pontossága, illetve az experimentális modell hatékonysága és áteresztőképessége nem mondható megfelelőnek nagy számú molekula jó minőségű szűrésére.

2.3.1. *In silico* módszerek

Az *in silico* számítások során a foszfolipidózist jellemzően két fizikai-kémiai paraméterrel: a proton-disszociációval (pK_a), és a lipofilitással ($\log P/D$) hozzák összefüggésbe.

Ploemen és mtsai.²² (Organon) a számított legbázikusabb N atomhoz köthető cpK_a (számított pK_a) érték és $ClogP$ (számított $\log P$) felhasználásával különböztették meg a foszfolipidózist indukáló és nem indukáló anyagokat. A két paramétert négyzetre emelve, majd összeadva egy számértéket kapunk, mely a megfigyelésük szerint ha nagyobb 90-nél, akkor a vegyület hajlamos, ha kisebb, illetve a bázikus cpK_a kisebb, mint 8 vagy a $ClogP$ kisebb 1-nél, akkor nem hajlamos foszfolipidózist okozni:

$$\text{PLD+ ha: } [(cpK_a)^2 + (\text{Clog}P)^2] \geq 90$$

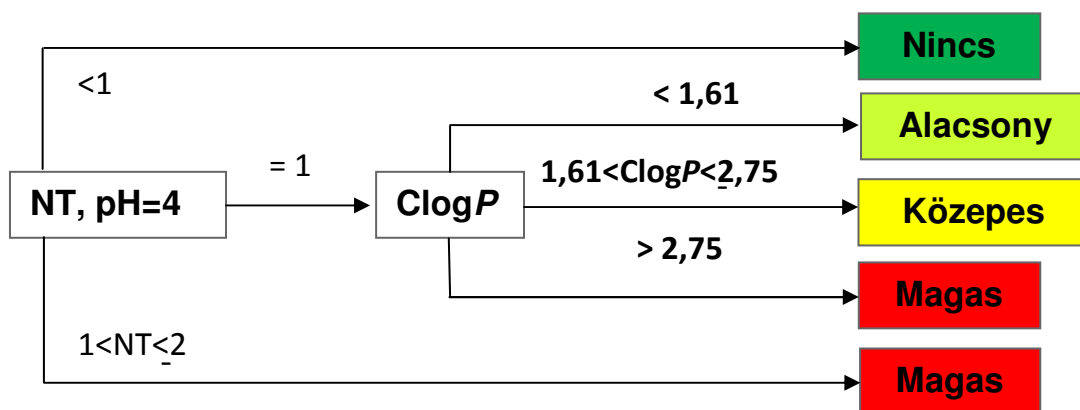
$$cpK_a \geq 8 \text{ és } \text{Clog}P \geq 1$$

Pelletier és mtsai.²³ (Pfizer) módosították a Ploemen modellt. Ugyanazon egyenlet felhasználásával, de a cpK_a és a $\text{Clog}P$ határok módosításával más számértéknél húzták meg a határvonalat, ezzel a negatív prediktív érték 10 %-kal javult, a modell jósága pedig 75 %-ról 80 %-ra nőtt:

$$\text{PLD+ ha: } [(cpK_a)^2 + (\text{Clog}P)^2] \geq 50$$

$$cpK_a \geq 6 \text{ és } \text{Clog}P \geq 2$$

Tomizawa és mtsai.²⁴ (Pfizer) a $\text{Clog}P$ -t és a vegyületek 4,0-es pH-n számított nettó töltését (NT) vették figyelembe. A modell árnyalja a foszfolipidózis kialakulásának valószínűségére vonatkozó előrejelzési rendszert: biztonságos, alacsony, közepes és magas kockázatú kategóriákba sorolja a hatóanyagokat (4. ábra).



4. ábra. Foszfolipidózis kialakulásának kockázata a Tomizawa-modell alapján

A Roche kutatói dolgozták ki a CAFCA (Calculated Free Energy of Amphiphilicity of Small Charged Amphiphiles) módszert²⁵, mely az amfifil sajátságra vonatkozó szabadentalpia változás ($\Delta\Delta G_{AM}$) megadásával jelzi előre a foszfolipidózist.

$$\Delta\Delta G_{AM} = \Delta G_{AW} - \Delta G_{MIC},$$

ahol ΔG_{AW} : a vegyület vizes fázisból a levegő-víz határfelületre kerülésének szabad energiája

ΔG_{MIC} : a micellaképződés szabad energiája.

$$\text{PLD+ ha: } pK_a > 7 \text{ és}$$

$$\Delta\Delta G_{AM} > -6 \text{ kJ/mol}$$

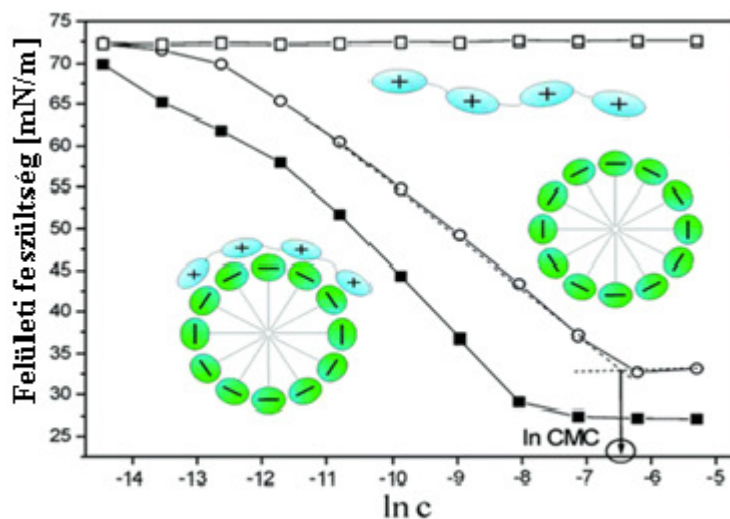
A vizsgált 47 vegyület 77 %-át prediktálták jól, és 17 % volt álnegatív.

Az FDA kutatói²⁶ 2008-ban fejlesztettek ki két független modellt is a foszfolipidózis előrejelzésére. Az MC4PC-QSAR módszer a vegyületek egyes fragmenseihez rendel molekuláris tulajdonságokat, és e tulajdonságok kombinációjának segítségével hozza összefüggésbe a vegyületeket a foszfolipidózis indukálására való hajlammal (PPV= 76 %, NPV= 78 %). Az MDL-QSAR fizikai-kémiai, elektrotopológiai és konnektivitási deskriptor alapú modell (PPV= 65 %, NPV= 87 %). Mindkét módszerrel 583 vegyületet vizsgáltak. Az előrejelzés jósága a fenti modellekével közel azonosnak mondható.

2.3.2. *In vitro* nem-sejtes módszerek

Napjainkban nincs széles körben elterjedt nem-sejtes *in vitro* modell a foszfolipidózis előrejelzésére.

Vitovic és mtsai.²⁷ egy fizikai-kémiai módszeren alapuló szűrést dolgoztak ki, mely a hatóanyag és egy savas karakterű foszfolipid komplex képződésének hatékonyságát vizsgálja a kritikus micella képződési koncentráció (CMC) meghatározásán keresztül. A 96-lyukú mérőtálcán (plate) egyszerre 8 vegyületet lehet vizsgálni, mivel a CMC meghatározásához egy 8-12 pontos felületi feszültség – koncentráció görbét kell felvenni, emiatt bár a módszer automatizálható, az áteresztőképessége alacsonynak mondható (5. ábra).



5. ábra. Nem-sejtes *in vitro* CMC alapú mérés

Zhou és mtsai.²⁸ fluoreszcens festék (Prodan) segítségével határozták meg a kritikus micella képződési koncentrációt. Mivel az előző módszerhez hasonlóan vegyületenként több pontos mérési sort kell felvenni, a módszer robosztus ugyan, de kis áteresztő képességű.

2.3.3. In vitro sejtes módszerek

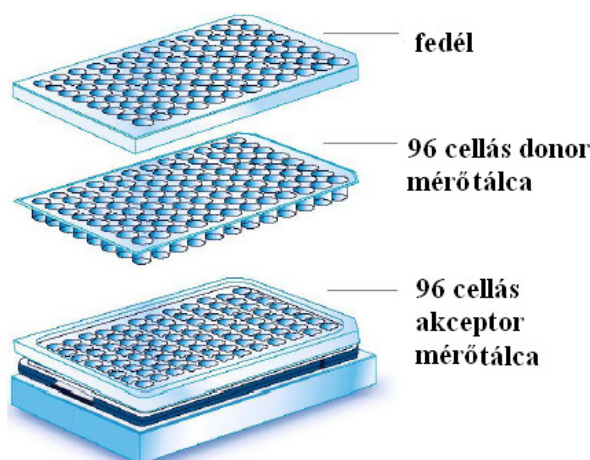
Az *in vitro* sejtes modelleket elsősorban azért kezdték használni, hogy megismerjék a foszfolipidózis mechanizmusát, mely során a gyógyszer a foszfolipidekkel kölcsönhatásba lép, így gátolva a foszfolipáz-enzimek aktivitását, ami a lipidek akkumulálódásához vezet a sejtekben. E folyamatokat elektronmikroszkóppal követik, vagy fluoreszcens próbákat alkalmaznak (pl. NBD festék)²⁹. Az *in vitro* sejtes vizsgálatok drágák, hosszú időt vesznek igénybe és kis áteresztőképességűek, így nagy számú molekula szűrésére kevésbé alkalmasak.

2.3.4. In vivo kísérletek

Az *in vivo* állatkísérletek nagyon költségesek, alkalmazásuk a gyógyszerkutatás korai fázisában nem jellemző, hosszú idő alatt kevés eredményt szolgáltatnak, így a foszfolipidózis előrejelzésére nem terjedhettek el széles körben.

2.3.5. Újabb lehetőségek

A foszfolipidózis kialakulásakor, ahogy azt már a 2.1. pontban is bemutattuk, egyik kritikus mechanisztikus lépés a CAD típusú hatóanyagok megnövekedett transzportja a lizoszómák belsejébe. A gyógyszerek sejtmembránon való átjutását, felszívódását legjobban a permeabilitás folyamatával lehet leírni. A gyógyszerkutatásban a permeabilitás nem-sejtes alapú *in vitro* vizsgálata a Kansy által 1998-ban kifejlesztett PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) rendszeren történik, ahol 96-cellás szendvics-szerű mérőtálcákkal (plate) modellezik a gyógyszerek felszívódását.^{30,31} (6. ábra)



6. ábra. PAMPA rendszer mérőtálcái³²

A PAMPA rendszerben egy kiválasztott lipidet (pl. foszfatidilkolin, PC) vagy lipidrendszert feloldanak valamilyen inert szerves oldószerben (pl. *n*-dodekánban), majd ezt az oldatot egy rétegben felviszik a donor oldali mérőtálca szűrőmembránjaira. A mérendő vegyületet általában DMSO-ban oldják, és a modellezni kívánt extracelluláris oldali kompartmenttel azonos pH-jú (pH:2-8) vizes pufferrel oldatot készítenek belőle, melyet a donor oldali mérőtálcára adagolnak. A fogadó (akceptor) tálca celláiba általában az intracelluláris közegnek megfelelő 7,4-es pH-jú puffert tesznek. A két mérőtálcát egymásba illesztik, majd a rendszert inkubálják. Az inkubálás során a hatóanyag a koncentrációgradiens hatására passzív diffúzióval átjut a donor mérőtálcából az akceptorba. A donor és akceptor oldalon kialakult koncentrációkat különböző analitikai módszerrel (UV spektrofotométer, LC/DAD/MS) mérik, majd ezek alapján jellemzik a vizsgált vegyület penetrációs képességét, sebességét (az effektív permeabilitást, P_e).

A PAMPA rendszer jelentős fejlődésen ment át az elmúlt 12 évben. Kezdetben lipidek nélkül, tiszta oldószert vittek fel a membránra (pl. hexadekán, dodekán)³³. Ezzel jól lehetett jellemezni az addig víz-oktanol megoszlással közelített lipid transzportot, melynek robosztus mérése igen körülményes³⁴. Ezt követően egyetlen lipidet (pl. PC) oldottak fel a szerves oldószerben (egy lipid modell), és a pufferek kémhatását változtatták. Nem csak izo-pH-n mérték (ahol a donor és akceptor rész pH-ja azonos, jellemzően pH = 7,4), hanem gradiens-pH rendszerben is³⁵. Például vékonybélén keresztüli felszívódás modellezéséhez pH 6,5 donor/pH 7,4 akceptor rendszert használnak. Ennél összetettebb a PAMPA modell, mikor szövet specifikus lipideket alkalmaznak, illetve lehetőség van a vegyület albuminhoz való kötődésének vizsgálatára is az akceptor oldalon³⁵.

Általában elmondható, hogy a PAMPA rendszereken végzett mérések jól reprodukálhatóak, megbízhatóak, viszonylag alacsony költségűek és nagy a kapacitásuk.

A PAMPA rendszerben végbemenő diffúziós folyamat tömegmérlege a következő:

$$V_D \cdot C_D(0) = V_A C_A(t) + V_D C_D(t) + V_M C_M(t), \quad (2.1)$$

ahol V_D a donor, V_A az akceptor cella térfogata, $C_D(0)$ a donor oldali hatóanyag koncentráció a kezdeti időpillanatban, $V_M C_M(t)$ a membránban fennmaradt anyagmennyiség, $C_A(t)$ és $C_D(t)$ az akceptor és donor oldali hatóanyag koncentráció az inkubálás végén a t -edik időpillanatban. A transzportfolyamatot leíró kinetikai paraméter az effektív permeabilitás:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \frac{(V_A \cdot V_D)}{(V_A + V_D)} \cdot \lg \left[1 - \left(\frac{V_A + V_D}{(1-R) \cdot V_D} \right) \cdot \left(\frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right) \right]; \quad \left[\frac{cm}{s} \right] \quad (2.2)$$

ahol A a szűrő felülete (cm²), t az inkubálás ideje (s), τ_{ss} az állandósult állapot beálltának az ideje (s), R a retenciós faktor:

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A \cdot C_A(t)}{V_D \cdot C_D(0)} \quad (2.3)$$

mely megfelel a lipidmembránban megkötődő anyaghányadnak³⁵.

A foszfolipidózis gyógyszertranszport folyamat két különböző pH-jú közeg között. Ahogy a fentiekben is bemutattam, a vékonybélben keresztüli gyógyszerfelszívódást gradiens-pH rendszerben (pH 6,5 donor/pH 7,4 akceptor) tudjuk modellezni. Ennek megfelelően feltételezésünk szerint a foszfolipidózis előrejelzésére is alkalmas lehet a gradiens-pH-jú (pH 7,4 donor/pH 4 akceptor) PAMPA modell.

A PAMPA modellben lehetőség van arra, hogy szövetspecifikus lipideket használjunk. Ezek segítségével modellezni tudjuk a különböző szerveink, szöveteink membránjain keresztül végbemenő transzportfolyamatokat. Ennek azért nagy a szerepe a vizsgálatok során, mert a különböző szövetek membránjaiban eltérő a lipidösszetétel. Ez jelentősen befolyásolhatja a gyógyszerek átjutását, felszívódását, megoszlását az egyes szövetekben, mivel ily módon módosulhat a membránok szerkezete, a lipidek töltöttségi állapota. A legfontosabb szöveti lipidek összetételét az 1. táblázat tartalmazza.

1. Táblázat. Szöveti lipidek %-os összetétele^a

Lipidek^b	Vese	Tüdő	Szív	BBB^c	Máj
PC (±)	45	39	9	13	42
PE (±)	27	15	14	33	26
PS (-)	5	-	-	19	-
PI (-)	5	2	1	4	9
Sph (±)	7	13	-	6	-
LPI (-)	-	-	-	-	1
CL (2-)	-	-	2	2	-
LPC (±)	-	-	-	-	-
CHO+CE	10	30	-	26	5
(-)/(±) arány	1:80	1:33	1:7	1:2	1:7

^a Avdeef, A.: Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons

^b PC = foszfatidilkolin, PE = foszfatidiletanolamin, PS = foszfatidilszerin, PI = foszfatidilinozitol, Sph = szfingomielin, LPI = lizo-PI, CL = kardiolipin, LPC = lizo-PC, CHO = koleszterin, CE = észteressített koleszterin

^c BBB: vér-agy gát

A (-)/(±) arányból látható, hogy a BBB, a szív és a máj szöveti lipideknek nettó töltése negatívabb, mint a vese és a tüdő szöveti lipideké, melyek nagyrészt nettó semleges (+/- ikerionos) töltésű. A nagy negatív töltéshányadot a szívben a kardiolipin, a BBB-nél a foszfatidilszerin és a májban a foszfatidilinozitol nagyobb arányú jelenléte okozza.

3. Célkitűzés

Tudományos diákköri munkám során célul tűztük ki egy új, az eddigiektől független, nagy áteresztőképességű, robosztus *in vitro* nem-sejtes modell kidolgozását a gyógyszer indukálta foszfolipidózis előrejelzésére. *In vitro* modellként a kutatócsoportban korábban beállított gyógyszer-felszívódási PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) rendszert alkalmaztuk, ezzel azt kívántuk vizsgálni, hogy az effektív permeabilitás és a membránretenció összefüggésbe hozható-e a foszfolipidózis kialakulásának kockázatával.

4. Vizsgálatok, eredmények

Munkám során a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető 52 gyógyszervegyületet vizsgáltunk, melyeket az irodalomban leírt *in silico* és *in vitro* nem-sejtes modellekben vizsgáltak. Ezek közül az *in vivo* adatok alapján 23 db okoz (PLD+), és 29 db nem okoz (PLD-) foszfolipidózist.

Feltételezésünk szerint az *in vitro* PAMPA felszívódási modellel közelíthető a foszfolipidózis megjelenésének valószínűsége, mivel különböző szöveti rendszerekben vizsgálható a vegyületek sejtmembránon történő átjutása, permeabilitása.

A foszfolipidózis mechanizmusa alapján azt feltételezzük, hogy a gradiens-pH rendszerben (donor pH 7,4/ akceptor pH 4,0) képesek lehetünk modellezni a vegyületek feldúsulását a lizoszómában, hiszen a citoszol pH-ja 7,4, innen kerül a hatóanyag a lizoszómába, melynek átlagosan 4-es körüli a pH-ja. A membránretencióval (MR) elgondolásunk szerint lehetőség nyílt a lipid-gyógyszer kölcsönhatás azonosítására. Ennek megfelelően a permeabilitást grad-pH 7,4 → 4,0-en, a membránretenciót izo-pH 7,4-en és izo-pH 4,0-en is mértük.

Méréseink során többféle foszfolipidet alkalmaztunk. A referencia rendszer a bélfelszívódási modell volt, ahol egyetlen lipidet, a foszfatidilkolint (PC) használtuk. Különböző szerveinkben más-más a foszfolipidek aránya, különböző pH-kon más a töltöttségi állapotuk, ez befolyásolhatja a gyógyszerek transzportját. Ötféle – a foszfolipidózis

megjelenése szempontjából is érdekes – szöveti lipid rendszeren (BBB, máj, szív, tüdő, vese) vizsgáltuk, milyen különbségeket okoznak ezek a hatóanyagok permeabilitásában és membránretenciójában (MR) a PC-hez képest.

A 2.3. fejezetben bemutatott *in silico* modelleket alkalmazva kiszámoltuk a foszfolipidózis várható kockázatát az általunk vizsgált 52 vegyületre (2. táblázat).

2. táblázat. A vizsgált vegyületek számított fizikai-kémiai paramétereit és az *in silico* modellek előrejelzéseit

Vegyületek	PLD in vivo [#]	cpKa*	clogP*	Ploemen-szám	Pelletier modell	Tomizawa modell
Amitriptilén	1	9,76	4,81	118	1	+++
Amodiakvin	1	10,23	4,53	125	1	+++
Dezipramin	1	10,02	3,9	116	1	+++
Dibukain	1	9,04	3,7	95	1	+++
Fenacetin	1	0	1,41	2 álnegatív	-1 álnegatív	- álnegatív
Fluoxetin	1	9,8	4,17	113	1	+++
Haloperidol	1	8,05	3,66	78 álnegatív	1	+++
Hidroxizin	1	7,82	3,41	73 álnegatív	1	+++
Imipramin	1	9,2	4,28	103	1	+++
Ketokonazol	1	6,75	4,19	63 álnegatív	1	+++
Kinin	1	9,05	2,51	88 álnegatív	1	+++
Klorokvin	1	10,32	3,93	122	1	+++
Klórpromazin	1	9,4	3,57	101	1	+++
Klozapin	1	7,35	3,4	66 álnegatív	1	+++
Kinakrin	1	10,33	5,15	133	1	+++
Loratadin	1	4,33	4,55	39 álnegatív	-1 álnegatív	- álnegatív
Maprotilin	1	10,54	4,37	130	1	+++
Promazin	1	9,4	3,33	99	1	+++
Tamoxifen	1	8,76	6,35	117	1	+++
Tiloron	1	8,89	4,26	97	1	+++
Tioridazin	1	9,25	4,47	106	1	+++
Verapamil	1	9,68	5,04	119	1	+++
Zimelidin	1	8,62	3,51	87 álnegatív	1	+++
Acetilszalicilsav	-1	0	1,24	2	-1	-
Ampicillin	-1	7,44	0,26	55	1 álpozitív	-
Atenolol	-1	9,67	0,43	94	1 álpozitív	+
Cimetidin	-1	6,91	-0,11	48	-1	+
Dantrolen	-1	0	-1,91	4	-1	-
Diflunizal	-1	0	3,91	15	-1	-
Diklofenák	-1	0	0,73	1	-1	-
Doxiciklin	-1	7,75	-0,66	60	-1	-
Etoposid	-1	0	1,16	1	-1	-

Folytatás: 2. táblázat

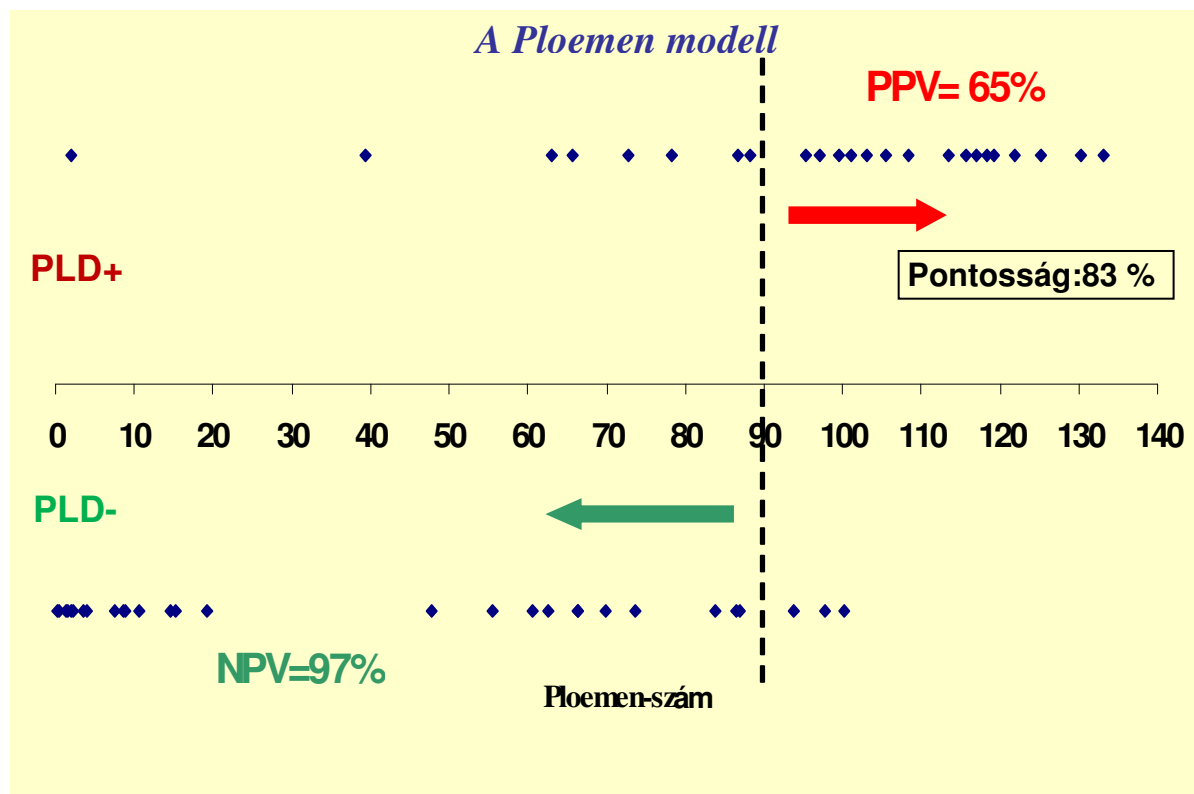
Vegyületek	PLD in vivo [#]	cpKa*	clogP*	Ploemen-szám	Pelletier modell	Tomizawa modell
Famotidin	-1	8,38	-1,88	74	1 álpozitív	+
Fenobarbital	-1	0	1,41	2	-1	-
Flutamid	-1	0	3,27	11	-1	-
Gemfibrozil	-1	0	4,39	19	-1	-
Karbamazepin	-1	0	2,96	9	-1	-
Koffein	-1	0	-0,55	0,3	-1	-
Kolhicin	-1	0	1,46	2	-1	-
Metapirilén	-1	8,76	3,11	86	1 álpozitív	+++ álpozitív
Metildopa	-1	9,85	0,9	98	-1	-
Mianszerin	-1	6,92	3,83	63	1 álpozitív	+++ álpozitív
Piroxikam	-1	3,7	0,99	15	-1	-
Prokain	-1	8,96	1,88	84	1 álpozitív	++ álpozitív
Propranolol	-1	9,67	2,58	100 álpozitív	1 álpozitív	+++ álpozitív
Ranitidin	-1	8,08	0,98	66	-1	+
Rifampicin	-1	7,53	3,62	70	1 álpozitív	+++ álpozitív
Rolitetraciklin	-1	8,15	-0,02	66	1 álpozitív	+++ álpozitív
Szulindak	-1	0	2,93	9	-1	-
Takrin	-1	8,95	2,63	87	1 álpozitív	+++ álpozitív
Warfarin	-1	0	2,74	8	-1	-
Zileuton	-1	0	2,01	4	-1	-
				PPV= 65 % NPV= 97 % Pontosság: 83%	PPV= 91 % NPV= 66 % Pontosság: 77%	PPV= 91 % NPV= 76 % Pontosság: 83%

[#]: Hanumegowda *et al. Chem. Res.Toxicol* **2010**, 23, 749-755.³⁶

Pelletier, D. J.; Gelhaar, D.; Tilloy-Ellul, A.; Johnson, T. O.; Greene, N. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, 47, 1196-1205²³

*: MarvinSketch Version 5.3.8, ChemAxon Ltd.³⁷

A gyógyszeriparban az általánosan elterjedt *in silico* modell a Ploemen modell. Ennek előrejelző képességét az ábra szemlélteti.



7. ábra. A Ploemen modell

A modellek jósága a negatív prediktív (NPV) és pozitív prediktív értékekkel (PPV), valamint a pontossággal jellemezhető, melyek megadása a következőképpen történik:

$$NPV = \frac{\text{modell által prediktált PLD - vegyületek}}{\text{összes in vivo PLD - vegyület}} \quad (4.1)$$

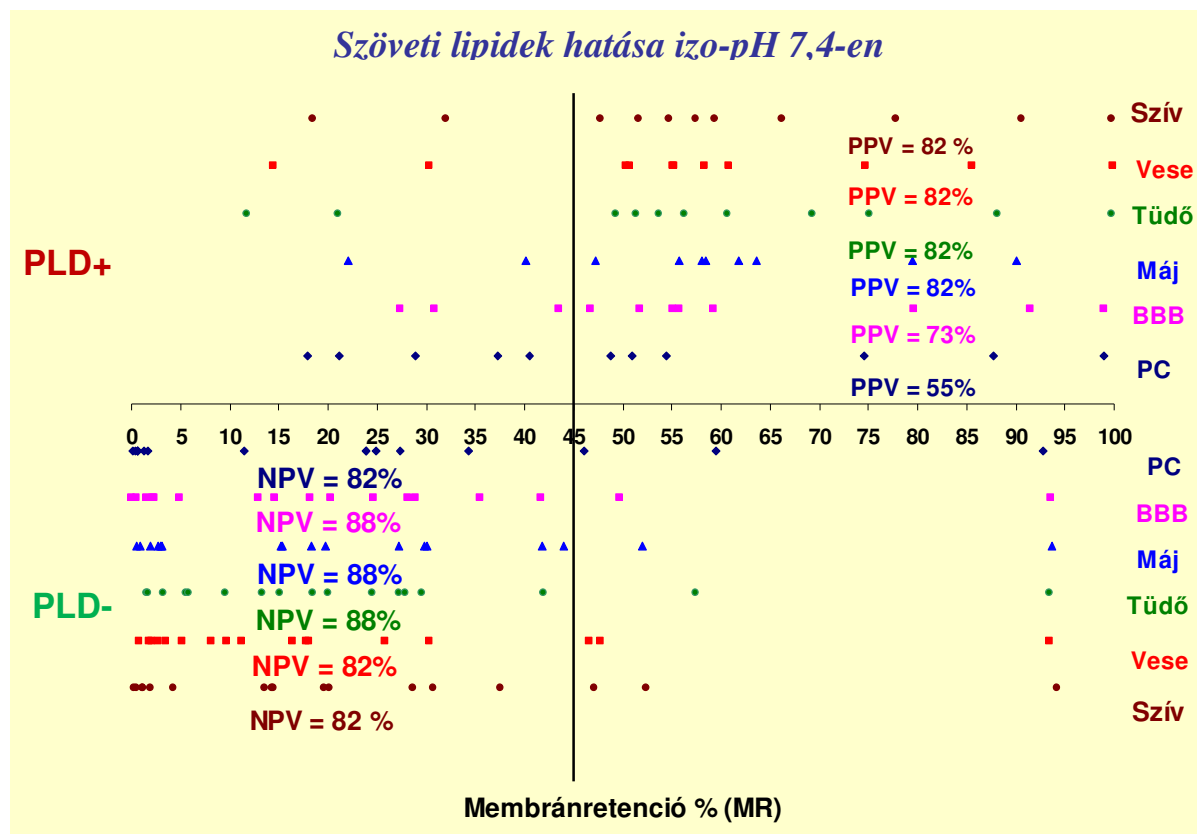
$$PPV = \frac{\text{modell által prediktált PLD + vegyületek}}{\text{összes in vivo PLD + vegyület}} \quad (4.2)$$

$$\text{Pontosság} = \frac{\text{összes jól prediktált vegyület}}{\text{összes mért vegyület}} \quad (4.3)$$

Látható, hogy amíg a NPV magas, addig a PPV viszonylag alacsony, tehát a modell sok álnegatív vegyületet szolgáltat. Munkám során olyan modell felállítása volt a cél,

melynek a pozitív és negatív előrejelző képessége, valamint pontossága is magasabb, mint a fenti három *in silico* modellé.

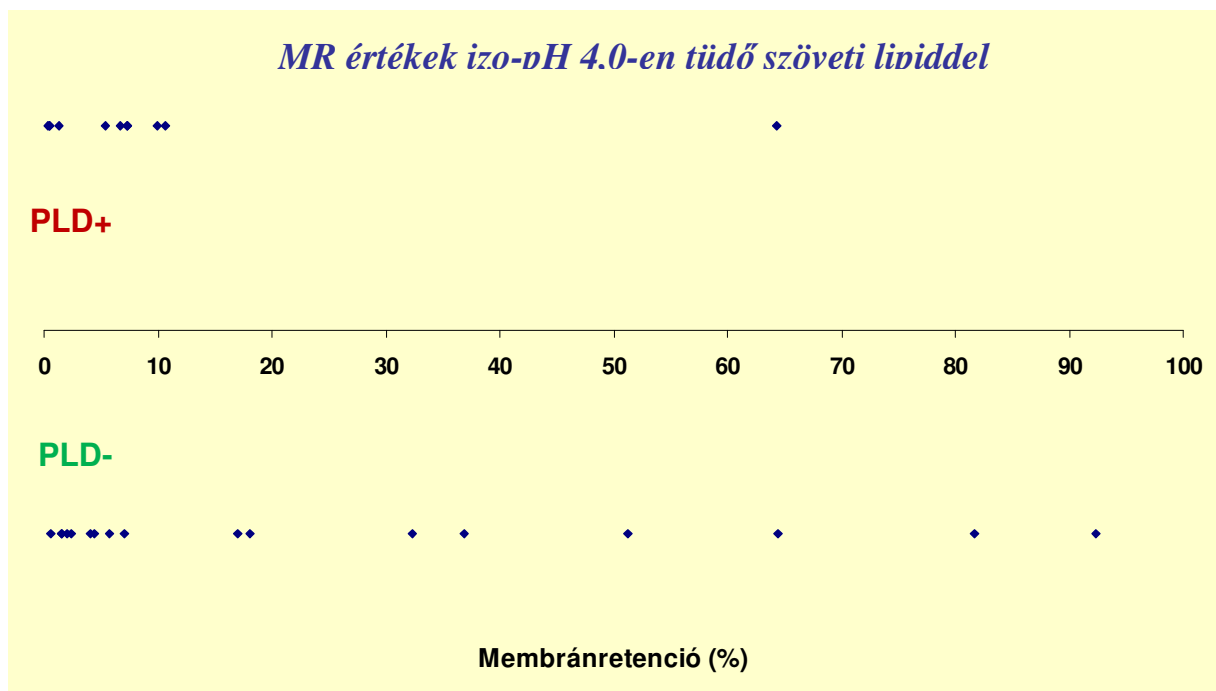
Elsőként izo-pH 7,4 PAMPA rendszerben vizsgáltuk a vegyületeket. Ezzel a citoszolban létrejövő lipid-gyógyszer kölcsönhatást kívántuk modellezni. A mérések során kapott membránretenciós értékeket vettük figyelembe, ezeket ábrázoltuk az ismert *in vivo* eredmények függvényében (8. ábra).



8. ábra. Membránretenciós értékek izo-pH 7,4-es PAMPA rendszerben

Látható, hogy a PLD+ és PLD- vegyületek membránretenciói nem különülnek el élesen egymástól. Ha 45-nél húzunk meg határvonalat – így kapjuk a legjobb PPV és NPV értékeket a modellben –, akkor az összes lipidnél megjelennek álnegatív és álpozitív pontok is. A foszfatidilkolinnál a legkisebb a pontosság, a szövetspecifikus lipideknél sem kiemelkedően jók az eredmények.

Izo-pH 4,0-en is megvizsgáltuk a membránretenciókat. Itt a kationos amfifil anyagok fokozott ionizációja miatt gyengébb kölcsönhatást kaptunk a lipidekkel, amit a csökkent MR értékek is mutatnak. Jellemző példaként a tüdő szöveti lipiddel kapott eredményeket mutatom be (9. ábra). A többi lipiddel is hasonló eredményeket kaptunk, ezeket a Mellékletben táblázat tartalmazza.



9. ábra. Membránretenciós értékek izo-pH 4,0-es PAMPA rendszerben tüdő szöveti lipiddel

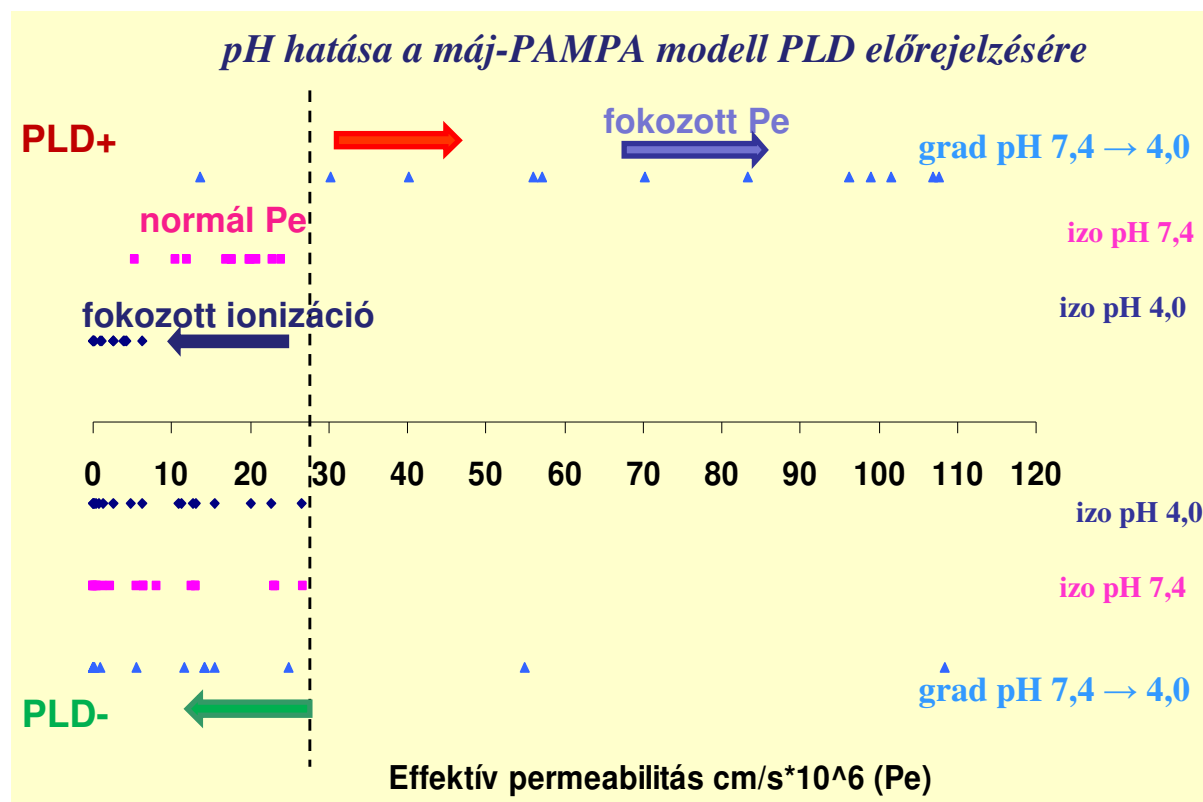
Ez a kísérleti elrendezés a lizoszómán belül lejátszódó lipid-hatóanyag kölcsönhatás kialakulásának esélyét mutatja. A kapott eredmény alapján feltételezhető, hogy a foszfolipidózis kialakulásának azon mechanizmusa, mely a hatóanyag-lipid komplex kialakulásával írható le, elsősorban az extralizoszomális oldalon (pH 7,4) jöhet létre, hiszen itt kaptunk szorosabb összefüggést az *in vivo* PLD és saját MR eredményeink között.

Ezt követően méréseinket gradiens-pH rendszerben végeztük (pH 7,4 → pH 4,0). Ezzel azt kívántuk modellezni, hogy a gyógyszer a citoszolból hogyan jut a membránon át a lizoszómába. Az izo-pH-jú rendszernél használt permeabilitási egyenlet (2.2) nem alkalmazható akkor, ha az akceptor gyógyszer-koncentrációja nagyobb a donorénál, ezért gradiens rendszerben a következő egyenlettel számolunk:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_a} \right) \cdot \lg \left[-r_a + \left(\frac{1 + r_a}{1 - R} \right) \cdot \frac{C_d(t)}{C_d(0)} \right], \text{ ahol} \quad (4.4)$$

$$r_a = \left(\frac{V_D}{V_A} \right) \frac{P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}} = \frac{r_v P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}}, \quad (4.5)$$

melynek matematikai levezetését az 5. fejezetben részletezem. A különböző pH-jú (izo-pH 7,4; izo pH 4,0; grad-pH 7,4 → 4,0) rendszerekben kapott effektív permeabilitás értékeket vizsgálva látható a pH változtatásának hatása a vegyületek transzportjára (10. ábra).



10. ábra. A pH hatása a vizsgált vegyületek transzportjára

A 10. ábra alapján jól látható, hogy az izo-pH-jú rendszerekben átlagosan kisebb permeabilitási értékeket kaptunk a grad-pH-jú rendszerhez képest. 7,4-es pH-n a felszívódási modelleknél tapasztalt normál permeabilitás értékek nem különböznek jelentősen a PLD+ és PLD- vegyületeknél. 4,0-es pH-n a bázikus karakterű vegyületek fokozott ionizációja miatt különösen kicsivé válik a lipofil membránon való átjutásuk esélye. A gradiens-pH (pH 7,4 → pH 4,0) rendszerben azonban jelentősen megnő a kationos amfifil anyagok permeabilitása, ami annak köszönhető, hogy 4,0-es pH-n az ionizált forma miatt nő az ilyen típusú vegyületek oldhatósága, és csökken a lipofilitása a pH 7,4-es közeghez képest. Így a donor oldalról sokkal nagyobb mennyiségben tudnak átjutni a CAD típusú vegyületek az akceptorba, ami az ilyen PLD+ vegyületek megnövekedett permeabilitásához vezet, ezzel ellentétben a PLD- vegyületek permeabilitása alacsony marad. A kapott modell így lehetőséget nyújt a PLD+ és PLD- vegyületek megkülönböztetésére.

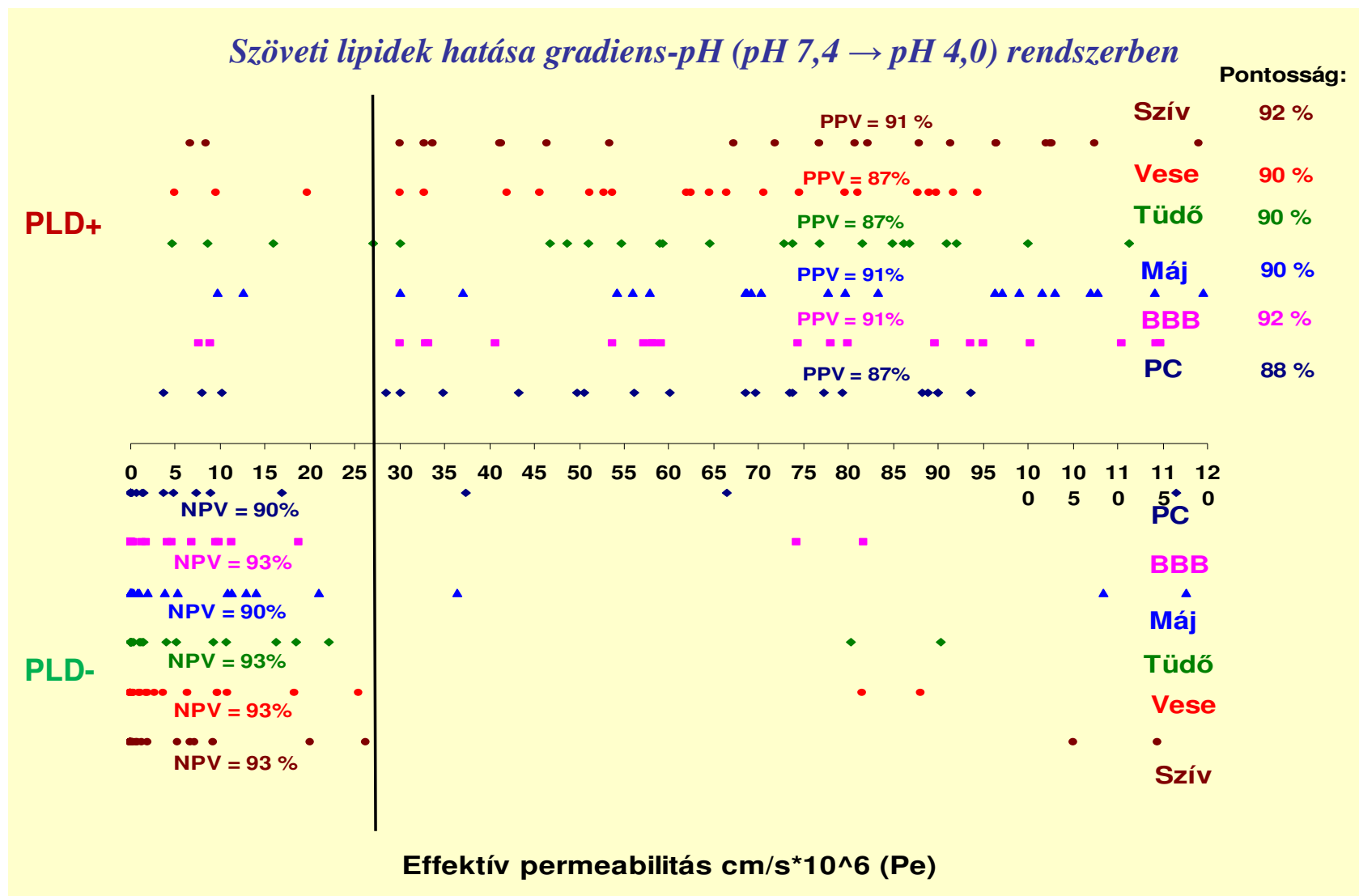
A különböző lipidekkel gradiens-pH-n kapott permeabilitási eredményeket az *in vivo* adatok függvényében a 11. ábra szemlélteti.

Láthatjuk, hogy a PLD+ és PLD- vegyületek jól elkülönülnek egymástól. A határvonal bár a PPV és NPV értékek figyelembe vételével jól behatárolható ($Pe = 27$), mégis a különböző szöveti lipidekkel mért PAMPA rendszerekben kapott Pe értékek alapján a PLD megjelenés kockázatának előrejelzésére a következő három osztályos besorolást javasoljuk:

PLD- ha:	$Pe < 25$
mérsékelt a PLD kockázata, ha	$25 \leq Pe < 35$
PLD+ ha	$Pe \geq 35$

Ha mégis az éles határvonal megjelölésénél maradunk –ahogyan azt a Ploemen és Pelletier modellekben is tették –, akkor a $Pe = 27$ -nél meghúzott határ alapján az összes szöveti lipid rendszer effektív permeabilitási értékét és az ezekhez tartozó PPV és NPV értékeket figyelembe véve is jobb modellt kapunk, mint a bemutatott *in silico* modellek. A kapott modell megbízhatóságát az is alátámasztja, hogy a megadott Pe határhoz tartozó számértéket nem egyetlen mérés alapján választottuk ki, hanem az összes szöveti lipiddel történő mérés eredményét figyelembe vettük. Az *in vivo* eredményektől eltérő pontok így is megjelennek, azonban a pozitív prediktív érték minden esetben magasabb a Ploemen modellénél, és a negatív prediktív érték mindenütt magasabb volt a Pelletier és Tomizawa modelleknél. Ennek megfelelően elmondható, hogy a kapott PAMPA alapú gradiens-pH rendszerünk pontossága jobb lett a gyógyszerkutatóban alkalmazott *in silico* modellekénél.

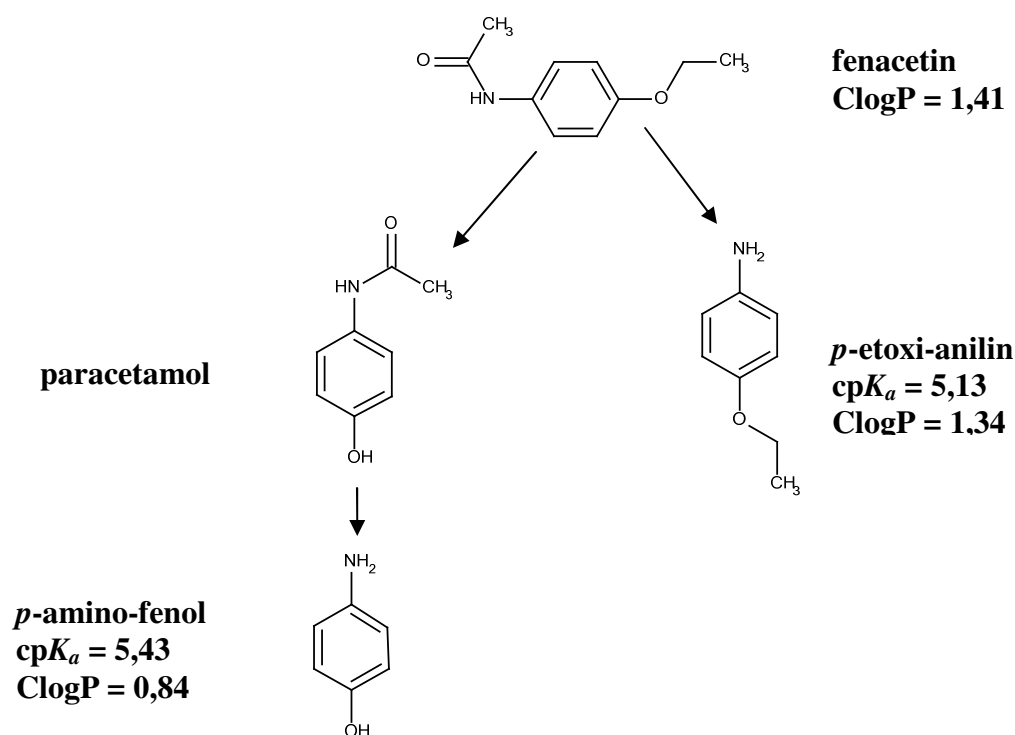
Az egyes vegyületeknél a permeabilitási modell szövetspecifitását is sikerült azonosítani, pl. a maprotilin jóval nagyobb effektív permeabilitási értéket adott a máj és szív szöveti lipiddel végzett kísérletek során, mint a PC-vel vagy vesével. Ez azzal magyarázható, hogy a maprotilin a vizsgált pH-kon pozitív töltésű, így a negatívabb töltésű lipidekkel az ionos vonzás miatt erősebb kölcsönhatásokat tud kialakítani, mint a semleges töltéshányadú lipidekkel. A szövetspecifitás mértékét a későbbiekben részletesen is fogjuk vizsgálni.



11. ábra. Effektív permeabilitási értékek gradiens-pH (pH 7,4 → pH 4,0) rendszerben

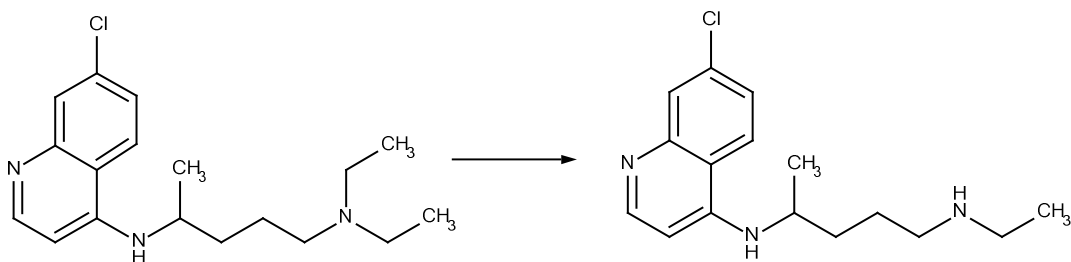
Annak ellenére, hogy az általunk kialakított modellben is azonosítottunk álpozitív és álnegatív eredményt szolgáltató vegyületeket, jóval kevesebb ilyen eset volt, mint az *in silico* modellek esetében (pl.: haloperidol, hidroxizin, klozapin, loratadin stb.). A téves előrejelzések egyik, több esetben azonosított oka a metabolizmus. Szervezetünkben a gyógyszerek nem változatlan formában vannak jelen, elsősorban májhoz köthető enzimek (főként CP450) átalakítják ezeket, de a metabolizmus végbemehet már a májba kerülés előtt is (pl. a bélhámsejtekben). A keletkező metabolitok jellemzően más fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkezhetnek, mint az eredeti anyavegyület, ezért eltérő lehet farmakokinetikai sajátságuk, de biológiai és így toxikus hatásuk is. Egy-egy funkciós csoport kilépése vagy beépülése miatt más lehet az amfifil vegyület bázicitása, valamint jellemzően csökkenhet a lipofilitása is. E két paraméter megváltozása jelentősen képes megváltoztatni a metabolitok anyavegyülethez képest fennálló permeabilitási sajátságait. Így előfordulhat, hogy míg a gyógyszer nem okoz foszfolipidózist, addig a metabolitja igen, vagy fordítva. Ezért nagyon fontos, hogy az előrejelzés során ne hagyjuk figyelmen kívül a lehetséges metabolitok hatását sem.

Az *in vivo* adatok alapján a fenacetin foszfolipidózist indukál, azonban ezt sem a saját modellünk, sem az *in silico* modellek nem tudták előre jelezni. A fenacetinnek nincs bázikus nitrogénje, nem ionizálódik, közepesen lipofil molekula. A foszfolipidózis ismert mechanizmusai alapján ez a vegyület nem okozhatna ilyen mellékhatást. Fő metabolitjai viszont már olyan fizikai-kémiai sajátságokkal rendelkeznek, ami alapján PLD+ kockázatuk fokozódik (ezt későbbi méréseink során a *p*-amino-fenol és *p*-etoxi-anilin vizsgálatával szeretnénk igazolni): van bázikus nitrogénjük, 4-es körüli pH-n ionizálattá válnak, és ezen a pH-n lipofilitásuk is némileg lecsökken (12. ábra). Ezek alapján nagy valószínűséggel mondhatjuk, hogy nem a fenacetin, hanem a metabolitjai okozzák a foszfolipidózist, ami megmagyarázhatja a modellünkben kapott ellentmondást.



12. ábra. A fenacetin metabolizmusa

A klorokvinnél hasonló következtetést vonhatunk le. Fő metabolitja egy *N*-deetilezett származék, melynek a bázikus nitrogénhez köthető pK_a -ja nagyobb, ionizált formájának lipofilitása kisebb az eredeti molekulánál. Így a lizoszómába ionizált formában bejutva már nem tud visszafelé átjutni a membránon, ezért létrejöhet a vegyület felhalmozódása (13. ábra).

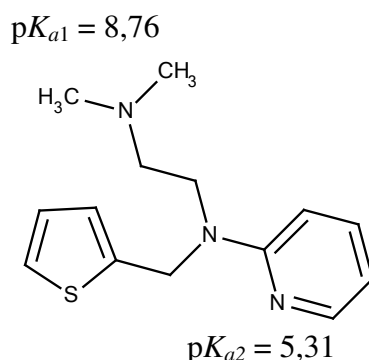


13. ábra. A klorokvin és fő metabolitja

A kinin a vese és a tüdő szöveti modellben is álnegatívnak adódott. A Ploemen modell is PLD- vegyületnek prediktálja. Az irodalomban nem egységesek az *in vivo* adatok a kininre nézve³⁵, egyes publikációkban PLD+²⁴, máshol PLD- gyógyszerként írják le²⁷.

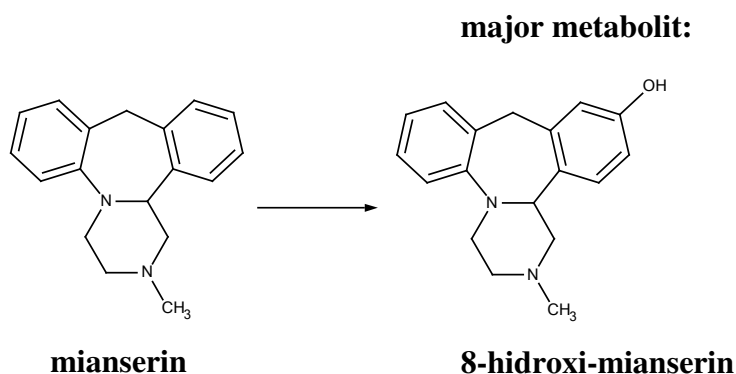
A metapirilén álpozitivitást mutat modellünkben. A Pelletier és Tomozawa modellek is hasonló előrejelzést adnak erre a vegyületre. A metapirilén tartalmaz bázikus nitrogéneket, és lipofil heteroaromás molekularészt, szervezetünkben mégsem okoz foszfolipidózist. Ennek az lehet az oka, hogy a molekula már 7,4-es pH-n is részben ionizált állapotban van

(14. ábra), a lizoszóma membránján csak limitált lehet az átjutása, így ott nem tud olyan mértékben felhalmozódni, ami a PLD kialakulásához szükséges.



14. ábra. A metapirilén

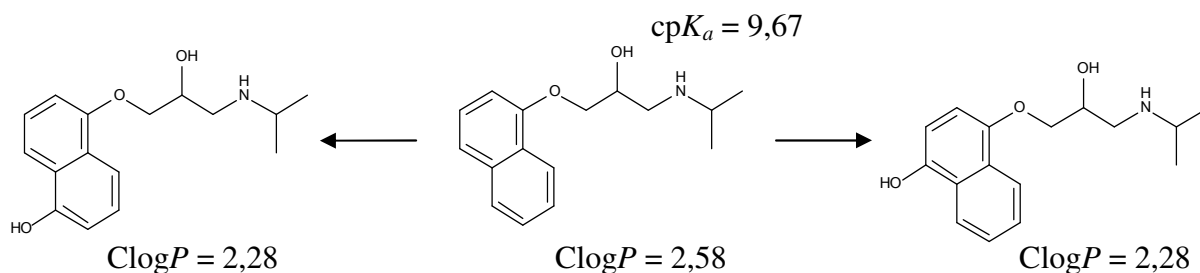
A mianszerint a mi modellünkhöz hasonlóan a Pelletier, Tomizawa és a nem-sejtes CMC modell is PLD+ vegyületként jelzi előre, de *in vivo* nem okoz foszfolipidózist. Ez a feltételezés szerint a gyógyszer metabolikus átalakulásával magyarázható: a mianszerin fő metabolitja a 8-hidroxi-mianszerin (15. ábra), mely a CMC modellben végzett vizsgálat alapján nem okoz foszfolipidózist²⁸.



15. ábra. A mianszerin és fő metabolitja

A propranolol mindhárom bemutatott *in silico* modellben álpozitivitást mutat, ami összefügg azzal, hogy fizikai-kémiai tulajdonságai (cpK_a , $ClogP$) a foszfolipidózist okozó vegyületekhez hasonlóak (16. ábra). A gradiens-pH-n (pH 7,4 $\rightarrow$ pH 4,0) mért nagy effektív permeabilitási értéke miatt a mi modellünkben is PLD+ vegyületnek mutatkozott. Ezzel szemben *in vivo* vizsgálatok alapján nem alakul ki foszfolipidózis a propranolol hatására²⁷. Feltételezzük, hogy ennek oka a vegyület oxidatív metabolikus átalakulása³⁸, melynek során

kevésbé lipofil és savas karakterű fenol származékok keletkeznek (tompítják az *NH* bázikus karakterét), amelyek ennek köszönhetően nem indukálnak foszfolipidózist.



16. ábra. A propranolol és fő metabolitjai

5. Kísérleti rész

5.1. Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált foszfolipideket (PC, Sph, PI, PG, PS, PE) és szövetspecifikus lipid frakciókat (BBB, máj, szív) az Avanti Polar Lipids Inc.-től vásároltuk. A *n*-dodekán és a dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószerek a Merck Kft.-től származtak. Az összes többi vegyszer, illetve a referencia gyógyszerek a Sigma-Aldrich Kft.-től kerültek beszerzésre. A puffer oldatokat a következő receptek alapján készítettük el:

pH 4,0-es puffer: 65 ml 0,01 M citromsav oldat + 35 ml 0,01 M Na_2HPO_4 oldat.

pH 7,4-es puffer: 1 l ioncserélt víz + 1 tasak izotóniásan kiegyensúlyozott foszfát puffer (PBS) só keverék (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma Aldrich Kft., 028K8214).

A szöveti lipideket a következő receptek alapján állítottuk össze (3. táblázat):

3. táblázat. A szöveti lipidek összeállításának receptjei

	Vese szöveti lipid ³⁹	Tüdő szöveti lipid ⁴⁰
Szfingomielin (Sph)	3,5 mg	8,7 mg
Foszfatidilinozitol (PI)	2,5 mg	1,45 mg
Foszfatidilglicerol (PG)	-	1,35 mg
Foszfatidilszerin (PS)	2,5 mg	-
Foszfatidiletanolamin (PE)	13,5 mg	9,55 mg
Foszfatidilkolin (PC)	22,65 mg	25,3 mg
Koleszterin (CHO)	5,1 mg	19,4 mg
Gliceril-tripalmitát	39,7 mg	5,8 mg
Dodekán	2,24 ml	1,79 ml

5.2. Felhasznált eszközök

A vizsgálatokhoz 96-cellás polipropilén mérőtálcákat, (angolszász elnevezése plate) (Agilent Technologies, Denmark), 96-cellás polikarbonát alapú, szűrő donor-tálcákat (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, pórusméret 0.45µm; Millipore) és 96-cellás teflon akceptor tálcát (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore) használtunk. A méréseket mérőtálca-rázó inkubátorban (Heidolph Titramax 1000) végeztük. A mérőtálcákban kialakuló anyagkoncentráció meghatározására LC/UV(DAD) (Agilent® 1100 HPLC rendszer) kromatográfiás technikát használtunk. A folyadékok kimérésére Eppendorf többcsatornás automata pipettákat, pipettahegyeket használtunk.

5.3. Kromatográfiás mérés körülményei

Kromatográfiás készülék:	Agilent® 1100 LC
Kolonna:	chromolith® fast Gradient RP-18e (50 mm x 2 mm; 3 µm)
Eluensek:	A: 0,1 % TFA víz, B: 0,1 % acetonitril:víz = 95:5 (v /v)
Gradiens program:	0-0,3 min 5-15 % B; 0,3-1,8 min 15-100 % B; 1,8-2,4 min 100 % B, 2,4-2,5 min 100-5 % B
Ekvilibrációs idő:	0,5 min
Áramlási sebesség:	1,8 ml/min
Kolonntér hőmérséklete:	40 °C
Injektált térfogat:	6 µl
Detektálás:	Diódasoros UV-VIS detektálás (abszorpció alapján) 220 nm, 254 nm, 280 nm

5.4. A PAMPA rendszer összeállítása

A donor oldatot egy 96-cellás polipropilén mérőtálcán készítettük elő. Minden alkalommal három párhuzamos mérést végeztünk. A cellákba bemértük a puffereket, majd a minták 10 mM-os DMSO-s törzsoldatát. Két különböző puffer oldatot használtunk: pH 4,0 és 7,4. A vegyületeket 100 µM-os kiindulási koncentrációban vizsgáltuk. Ennek megfelelően a bemérések a következőképpen alakultak: 297 µl puffer + 3 µl DMSO-s törzsoldat.

Az így elkészült 300 µl oldatokat egy órán át szobahőmérsékleten rázattuk, majd szűrtük. Ezt követően lipid oldatot készítettünk: 16 mg foszfatidilkolint (vagy más foszfolipidet) oldottunk 600 µl *n*-dodekánban, hidegen homogenizáltuk ultrahangos fürdő

segítségével. A kapott lipid oldatból 5 µl-t adagoltunk a donor oldali mérőtálca szűrőjére, majd 150 µl-t pipettáztunk rá a donor oldat szűrletéből. Az akceptor oldali mérőlemezbe 300 µl puffert pipettáztunk. A donor tálcákat az akceptorba illesztettük, a párolgási veszteség elkerülése érdekében nedves szűrőpapírral lefedtük, majd 36 °C-on 4 órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően a donor és az akceptor oldalon kialakuló anyagmennyiségeket LC/UV(DAD) alapján adtuk meg. A koncentrációkat a kromatogramon integrált, a vegyület retenciójának megfelelő AUC-vel (görbe alatti területekkel) közelítettük.

A mérési eredményeket a mellékletben a 4-6. táblázatok tartalmazzák.

5.5. Felhasznált egyenletek

Az effektív permeabilitás és a membránretenció megadására a következő egyenleteket használtuk fel³⁵:

$$MR = \left(1 - \frac{C_d(t)}{C_d(0)} - \frac{C_a(t)}{C_a(0)} \right) \text{ a membránretenció.} \quad (5.1)$$

Az effektív permeabilitás izo pH-n:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \frac{(V_A \cdot V_D)}{(V_A + V_D)} \cdot \lg \left[1 - \left(\frac{V_A + V_D}{(1-R) \cdot V_D} \right) \cdot \left(\frac{C_d(t)}{C_d(0)} \right) \right]; \quad \left[\frac{cm}{s} \right] \quad (2.2)$$

Az effektív permeabilitás gradiens pH-n:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_a} \right) \cdot \lg \left[-r_a + \left(\frac{1 + r_a}{1 - R} \right) \cdot \frac{C_d(t)}{C_d(0)} \right], \text{ ahol} \quad (4.4)$$

$$r_a = \left(\frac{V_D}{V_A} \right) \frac{P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}} = \frac{r_v P_e^{(A \rightarrow D)}}{P_e^{(D \rightarrow A)}}, \quad (4.5)$$

A (4.4) egyenlet két ismeretlent tartalmaz: $P_e^{(A \rightarrow D)}$ és $P_e^{(D \rightarrow A)}$. Az egyenletet a következő módszerrel oldhatjuk meg: két mérést kell végezni, egyet izo-pH 7,4-en, egyet gradiens-pH 7,4 → 4,0-en. Izo-pH-n $P_e^{(A \rightarrow D)} = P_e^{(D \rightarrow A)}$. Ezt az esetet a következő egyenlet segítségével oldhatjuk meg:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \lg \left[-r_v + \left(\frac{1 + r_v}{1 - R} \right) \cdot \left(\frac{C_d(t)}{C_d(0)} \right) \right] \quad (5.2)$$

$$\text{ahol} \quad r_v = V_D/V_A \quad (5.3)$$

Ezt követően iterációval megadhatjuk a (4.4)-et $P_e^{(D \rightarrow A)}$ -ra. Először becsüljük r_v -t, ahol az izo-pH-n kapott $P_e^{(A \rightarrow D)}$ -t helyettesíthetjük be. Így kapunk egy r_a -t, mellyel újból közelíthetjük r_v -t. Ezt addig folytatjuk, míg r_a egyenlővé nem válik r_v -vel. Ekkor már megoldható a (4.4) egyenlet.

Ahhoz, hogy a fenti módszert használni tudjuk, szükség van izo-pH és gradiens-pH rendszerben való mérésekre is. Ezeket 28 vegyülettel végeztük el. A mérési eredmények alapján látható volt, hogy ha elhagyjuk az iterációs lépést, és helyette r_a -t egy megfelelően kis konstans értéknek választjuk ($r_a = 10^{-14}$), és ezt helyettesítjük be a (4.4.) egyenletbe, akkor az ezzel a módszerrel kapott P_e értékekben a megadási pontosságon belül már nem következik be változás. E számítási mód segítségével a mérések számát felére tudtuk csökkenteni, hiszen az izo-pH rendszerbeli mérésre így nincs szükség, mely a költségeket csökkenti, a hatékonyságot növeli.

6. Összefoglalás

Diákköri munkámat a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában végeztem. Munkám során célul tűztük ki egy új, nagy áteresztőképességű, robosztus, az eddigiektől független *in vitro* nem-sejtes modell kidolgozását a gyógyszer indukálta foszfolipidózis előrejelzésére. Megállapítottuk, hogy a gradiens-pH (pH 7,4 $\rightarrow$ pH 4,0) rendszerű PAMPA módszer képes modellezni a foszfolipidózist. A mérésekből származó membránretenciós értékek (MR) a CAD – foszfolipid kölcsönhatásra utalnak. Az effektív permeabilitási érték (P_e) a kationos amfifil vegyületek lizoszómán belüli felhalmozódását modellezi. Ezek alapján részben pontosítani tudtuk a foszfolipidózis mechanizmusát. A felhasznált lipidek segítségével sikerült rámutatnunk a modell szövetspecifitására is. A gradiens-PAMPA modell robosztus és az eddigi modellekhez képest ortogonális lehetőséget biztosít a foszfolipidózis előrejelzésére.

7. Melléklet

4. táblázat. Membránretenció (%) értékek izo pH 7,4-en

	PC	BBB	Máj	Tüdő	Vese	Szív
Amitriptilén	87,7 ± 2,5	91,5 ± 1,7	90,1 ± 0,5	88,1 ± 1,4	85,6 ± 2,3	90,6 ± 0,9
Amodiakvin	37,3 ± 5,0	51,8 ± 3,5	58,4 ± 1,8	69,3 ± 1,6	60,8 ± 7,4	59,4 ± 3,6
Ampicillin	1,2 ± 1,8	5,0 ± 1,9	3,0 ± 0,7	1,6 ± 0,7	1,9 ± 1,3	0,6 ± 3,3
Atenolol	0,7 ± 1,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 1,6	5,8 ± 2,9	5,2 ± 2,0	2,0 ± 0,3
Cimetidin	1,6 ± 0,6	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,6	9,6 ± 1,2	3,5 ± 2,2	1,2 ± 0,4
Dantrolen	46,0 ± 21,7	18,2 ± 8,0	30,1 ± 3,2	27,2 ± 5,2	8,1 ± 3,2	19,7 ± 5,0
Dibukain	50,9 ± 0,9	59,3 ± 3,2	63,6 ± 3,2	56,2 ± 3,9	55,1 ± 3,1	66,1 ± 4,2
Diflunizal	0,2 ± 1,3	2,2 ± 0,6	3,0 ± 1,2	3,2 ± 0,8	2, ± 00,3	14,4 ± 11,6
Famotidin	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,1	2,8 ± 1,1	5,5 ± 4,8	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,2
Flutamid	59,4 ± 2,3	49,7 ± 1,5	51,9 ± 5,2	57,4 ± 1,7	46,6 ± 6,3	47,1 ± 3,1
Gemfibrozil	23,9 ± 5,9	28,9 ± 2,5	29,8 ± 1,4	27,8 ± 0,2	25,9 ± 2,0	28,6 ± 1,9
Hidroxizin	48,8 ± 4,9	55,1 ± 3,7	58,0 ± 2,7	60,6 ± 2,4	5 8,3 ± 3,4	54,7 ± 5,6
Imipramin	74,5 ± 1,7	79,6 ± 0,3	79,5 ± 1,3	75,2 ± 3,3	74,7 ± 1,2	77,9 ± 0,6
Kinin	17,9 ± 0,9	30,9 ± 1,2	40,2 ± 1,4	21,1 ± 5,8	30,3 ± 1,7	32,0 ± 1,8
Klorokvin	21,2 ± 3,0	27,3 ± 8,3	22,1 ± 2,2	11,7 ± 0,6	14,5 ± 2,0	18,5 ± 3,3
Klozapin	54,5 ± 2,4	55,7 ± 2,5	61,9 ± 2,5	53,7 ± 4,7	55,3 ± 1,7	57,4 ± 2,5
Maprotilin	28,9 ± 2,4	43,5 ± 8,2	55,7 ± 1,6	49,3 ± 2,9	50,7 ± 1,0	51,6 ± 1,4
Metapirilén	42,5 ± 0,0	41,6 ± 1,0	44,0 ± 0,6	42,0 ± 1,8	47,7 ± 1,0	52,4 ± 8,9
Mianszerin	92,8 ± 0,8	93,6 ± 0,4	93,7 ± 0,5	93,4 ± 0,4	93,4 ± 1,3	94,2 ± 0,4
Prokain	11,4 ± 0,9	14,6 ± 1,0	15,3 ± 1,6	13,3 ± 2,6	11,2 ± 4,8	13,5 ± 1,4
Propranolol	24,9 ± 1,5	35,5 ± 1,3	41,9 ± 1,2	29,6 ± 2,6	30,3 ± 6,3	37,6 ± 2,0
Rifampicin	27,4 ± 4,9	20,3 ± 1,3	19,8 ± 2,1	19,9 ± 0,4	17,8 ± 1,8	14,3 ± 5,8
Rolitetraciklin	34,3 ± 3,0	28,1 ± 1,9	15,2 ± 1,9	15,0 ± 1,5	18,1 ± 4,0	4,2 ± 6,3
Szulindak	0,6 ± 1,6	2,3 ± 1,7	2,0 ± 2,0	1,6 ± 0,1	2,8 ± ,3	1,2 ± 0,2
Takrin	0,6 ± 3,9	13,0 ± 8,8	18,4 ± 1,7	18,5 ± 0,2	16,4 ± 0,4	30,8 ± 15,0
Tamoxifen	99,0 ± 0,0	99,0 ± 0,0	98,0 ± 0,0	99,7 ± 0,0	99,8 ± 0,0	99,8 ± 0,0
Zileuton	23,8 ± 1,3	24,6 ± 2,3	27,3 ± 1,5	24,5 ± 0,4	9,7 ± 2,0	20,1 ± 5,4
Zimelidin	40,5 ± 1,0	46,7 ± 3,2	47,2 ± 3,0	51,4 ± 0,5	50,3 ± 1,1	47,7 ± 2,3

Párhuzamos mérések száma: n = 3

5. táblázat. Membránretenció (%) értékek izo pH 4,0-en

	PC	BBB	Máj	Tüdő	Vese	Szív
Amitriptilén	11,0 ± 2,3	1,8 ± 6,6	16,1 ± 5,5	9,9 ± 4,1	12,6 ± 2,1	26,3 ± 9,5
Amodiakvin	2,6 ± 3,9	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,2
Ampicillin	7,1 ± 1,9	14,8 ± 5,6	8,6 ± 0,0	5,7 ± 2,4	7,6 ± 2,0	8,6 ± 6,5
Atenolol	3,2 ± 1,8	1,1 ± 0,9	8,1 ± 16,0	4,4 ± 1,6	5,9 ± 6,4	0,0 ± 0,9
Cimetidin	5,1 ± 6,5	1,2 ± 3,9	2,4 ± 1,9	0,6 ± 13,5	1,0 ± 0,4	1,2 ± 1,3
Dantrolen	33,9 ± 6,8	37,5 ± 2,3	39,6 ± 6,7	36,9 ± 1,8	36,4 ± 9,6	17,6 ± 8,7
Dibukain	6,5 ± 1,0	0,4 ± 1,7	12,6 ± 1,8	7,3 ± 1,7	10,9 ± 2,4	18,8 ± 7,3
Diflunizal	57,7 ± 0,1	56,7 ± 3,8	75,3 ± 1,0	81,7 ± 0,8	74,2 ± 1,3	72,6 ± 1,1
Famotidin	0,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,4 ± 2,6	5,8 ± 3,7
Flutamid	57,8 ± 0,8	47,6 ± 4,1	52,9 ± 3,2	51,2 ± 2,8	61,6 ± 6,9	59,5 ± 3,0
Gemfibrozil	93,9 ± 0,4	93,1 ± 1,1	93,4 ± 0,2	92,4 ± 1,3	91,1 ± 1,0	92,3 ± 0,5
Hidroxizin	0,2 ± 0,4	2,2 ± 1,8	4,7 ± 2,5	6,7 ± 3,6	3,7 ± 3,0	0,7 ± 5,5
Imipramin	7,8 ± 1,1	2,4 ± 1,3	8,9 ± 3,1	7,3 ± 2,0	7,1 ± 4,4	12,1 ± 2,6
Kinin	1,6 ± 1,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 1,2	0,5 ± 0,4	3,6 ± 1,2	1,5 ± 0,1
Klorokvin	11,7 ± 13,6	10,8 ± 10,4	19,3 ± 16,4	10,6 ± 23,0	9,8 ± 6,7	11,4 ± 18,2
Klozapin	4,5 ± 2,0	0,4 ± 0,1	3,6 ± 1,0	1,3 ± 3,0	6,3 ± 1,2	0,5 ± 2,8
Maprotilin	1,1 ± 1,5	3,2 ± 5,2	3,8 ± 6,3	5,4 ± 2,5	1,7 ± 7,4	6,0 ± 5,0
Metapirilén	2,2 ± 1,0	0,8 ± 0,9	2,9 ± 0,4	2,4 ± 3,1	2,6 ± 1,4	2,9 ± 3,9
Mianszerin	17,5 ± 0,9	13,7 ± 2,2	24,9 ± 0,8	17,0 ± 2,5	9,1 ± 3,9	22,5 ± 2,1
Prokain	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,5 ± 1,0	0,2 ± 0,0	3,3 ± 3,0
Propranolol	3,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	4,3 ± 1,7	4,1 ± 1,5	4,2 ± 3,1	9,0 ± 5,0
Rifampicin	36,6 ± 7,6	36,9 ± 3,5	47,2 ± 4,5	64,4 ± 3,4	61,3 ± 3,1	63,5 ± 2,5
Rolitetraciklin	0,3 ± 0,2	5,4 ± 0,9	14,2 ± 6,0	7,1 ± 9,1	10,2 ± 24,9	5,5 ± 7,2
Szulindak	29,3 ± 4,1	23,5 ± 6,1	32,2 ± 6,1	32,3 ± 6,3	21,4 ± 6,5	22,1 ± 8,0
Takrin	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Tamoxifen	77,9 ± 1,1	72,4 ± 2,3	84,1 ± 1,5	64,3 ± 7,9	81,9 ± 7,5	80,1 ± 2,8
Zileuton	21,7 ± 4,1	20,4 ± 2,9	28,1 ± 4,5	18,1 ± 4,3	10,4 ± 1,0	9,0 ± 6,7
Zimelidin	0,3 ± 3,2	2,2 ± 0,9	2,3 ± 2,0	0,3 ± 4,3	8,3 ± 3,7	1,4 ± 2,4

Párhuzamos mérések száma: n = 3

6. táblázat. Effektív permeabilitás értékek gradiens pH 7,4 → 4,0-en (cm/s*10⁶)

	PC	BBB	Máj	Tüdő	Vese	Szív
Acetilszalicilsav	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Amitriptilén	90,0 ± 2,8	114,7 ± 6,4	107,7 ± 2,8	86,2 ± 10,0	87,8 ± 1,0	107,4 ± 3,4
Amodiakvin	28,5 ± 1,6	33,0 ± 1,3	37,0 ± 1,3	27,0 ± 0,8	32,8 ± 1,4	32,8 ± 1,2
Ampicillin	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Atenolol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cimetidin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Dantrolen	3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,4	5,3 ± 0,2	4,0 ± 0,5	3,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Dezipramin	88,2 ± 1,0	114,8 ± 5,0	114,0 ± 3,9	86,8 ± 0,8	79,6 ± 1,3	80,8 ± 4,0
Dibukain	93,5 ± 1,9	93,7 ± 3,1	83,3 ± 15,2	64,6 ± 11,0	62,0 ± 12,7	76,7 ± 11,1
Diflunizal	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Diklofenák	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Doxiciklin	0,0 ± 0,0	4,6 ± 0,3	3,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Etoposid	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Famotidin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Fenacetin	8,0 ± 0,1	8,9 ± 0,4	9,8 ± 0,1	8,7 ± 0,1	9,5 ± 0,3	8,5 ± 0,1
Fenobarbital	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Fluoxetin	73,4 ± 16,0	74,3 ± 14,3	77,7 ± 5,8	73,8 ± 20,7	64,5 ± 19,1	67,2 ± 22,2
Flutamid	16,9 ± 2,5	18,8 ± 1,4	20,9 ± 3,2	18,4 ± 3,6	18,3 ± 3,4	20,0 ± 4,4
Gemfibrozil	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Haloperidol	90,0 ± 13,3	100,2 ± 11,5	103,0 ± 12,9	111,3 ± 5,3	91,7 ± 16,9	96,5 ± 20,5
Hidroxizin	68,6 ± 13,1	59,1 ± 2,9	99,0 ± 11,7	84,9 ± 8,2	89,9 ± 7,3	102,0 ± 15,2
Imipramin	77,3 ± 5,0	89,7 ± 1,5	101,6 ± 3,9	92,1 ± 2,4	81,1 ± 2,6	102,7 ± 1,9
Karbamazepin	7,4 ± 0,1	9,6 ± 0,2	11,3 ± 0,2	9,3 ± 0,1	9,7 ± 0,0	9,2 ± 0,1
Ketokonazol	34,8 ± 1,0	58,2 ± 2,4	68,4 ± 11,7	54,7 ± 0,0	51,2 ± 6,6	41,1 ± 2,3
Kinakrin	60,1 ± 4,0	80,0 ± 4,9	79,6 ± 4,6	59,0 ± 7,1	52,8 ± 10,0	53,4 ± 6,5
Kinin	10,2 ± 1,2	33,2 ± 6,2	56,0 ± 6,4	15,9 ± 0,8	19,7 ± 0,9	33,7 ± 3,6
Klorokvin	3,7 ± 0,7	7,6 ± 4,5	12,5 ± 0,6	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,3	6,6 ± 0,6
Klórpromazin	130,1 ± 18,3	153,4 ± 5,3	119,5 ± 16,7	99,9 ± 2,1	94,4 ± 17,5	119,0 ± 4,8
Klozapin	43,3 ± 0,6	40,7 ± 0,9	96,2 ± 4,1	76,8 ± 1,6	70,6 ± 3,7	96,5 ± 4,9
Koffein	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0
Kolhicin	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Loratadin	69,7 ± 3,8	110,4 ± 21,2	69,2 ± 5,0	72,8 ± 27,6	66,4 ± 11,1	91,4 ± 9,9
Maprotilin	56,2 ± 22,6	58,1 ± 17,8	107,0 ± 1,0	81,5 ± 1,9	89,0 ± 1,6	102,6 ± 0,7
Metapirilén	66,5 ± 20,9	81,6 ± 43,4	117,6 ± 11,5	90,3 ± 10,4	88,1 ± 5,8	114,5 ± 8,4
Metildopa	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Mianszerin	116,5 ± 12,0	129,8 ± 12,2	108,4 ± 3,8	80,3 ± 29,9	81,5 ± 20,0	105,1 ± 14,2
Piroxikam	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Prokain	4,7 ± 0,1	6,9 ± 0,2	10,8 ± 1,2	16,3 ± 1,2	9,7 ± 0,6	7,1 ± 0,5
Promazin	88,9 ± 4,7	95,1 ± 3,5	97,1 ± 4,9	90,9 ± 3,2	74,5 ± 3,0	82,1 ± 1,3
Propranolol	37,4 ± 2,8	74,2 ± 5,3	36,3 ± 0,4	22,1 ± 0,8	25,4 ± 0,1	26,2 ± 1,1
Ranitidin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rifampicin	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Rolitetraciklin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Szulindak	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Takrin	1,2 ± 0,0	11,3 ± 1,3	12,9 ± 1,0	5,0 ± 0,3	6,4 ± 0,5	5,2 ± 0,2
Tamoxifen	30,1 ± 0,0	30,1 ± 0,0	30,1 ± 0,0	30,1 ± 0,0	30,1 ± 0,0	30,1 ± 0,0
Tiloron	49,7 ± 1,8	53,8 ± 2,1	54,1 ± 1,1	46,7 ± 1,0	41,9 ± 0,7	41,4 ± 0,3
Tioridazin	79,4 ± 8,5	114,3 ± 18,1	68,6 ± 13,0	48,7 ± 7,1	53,7 ± 3,4	88,0 ± 21,6

Folytatás: 6. táblázat

Verapamil	50,6 ± 3,3	57,2 ± 2,4	57,8 ± 0,7	51,1 ± 1,5	45,7 ± 1,3	46,5 ± 1,8
Warfarin	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Zileuton	9,0 ± 0,3	9,8 ± 0,3	14,0 ± 0,3	10,6 ± 0,2	10,9 ± 0,7	6,6 ± 0,1
Zimelidine	73,8 ± 10,8	78,0 ± 25,9	70,3 ± 1,7	59,3 ± 0,5	62,5 ± 1,2	71,8 ± 1,6

Párhuzamos mérések száma: n = 3

8. Irodalomjegyzék

-
- ¹ Lipinski, C. A. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000.** 44, 235-249.
- ² Testa, B. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, **2001.** Wiley-VCH, Zürich
- ³ Kerns, E. H.; Di, L.: *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008.** Elsevier Inc. p. 6-16.
- ⁴ Kodavanti, U. P.; Mehendale, H. M. *Pharmacological Reviews* **1990.** 42, 4, 327-354.
- ⁵ Nelson, A. A.; Fitzhugh, O. G. *Archives of Pathology* **1948.** 45, 454-462.
- ⁶ Gleiser *et al.* *The American Journal of Pathology.* **1968.** 53(1), 27-45.
- ⁷ Lüllmann, H.; Lüllmann-Rauch, R.; Wassermann, O. *Critical Reviews in Toxicology* **1975.** 4, 185-218.
- ⁸ A mikroszkópos felvételért köszönet dr. Selényi Györgynek és dr. Krajcsovicz Zoltánnak
- ⁹ Halliwell, W. H. *Toxicologic Pathology* **1997.** 25,1, 53-60.
- ¹⁰ Sadrieh, N. *The Regulatory Challenges of Drug-induced Phospholipidosis*, **2010.** FDA ACPS meeting
- ¹¹ Mesens, N.; Steemans, M.; Hansen, E.; Verheyen, G. R.; Van Goethem, F.; Van Gompel, J. *Toxicology in Vitro*, **2010.**, 24, 1417-1425
- ¹² Kaufmann, A. M.; Krise, J. P. *Journal of Pharmaceutical Science* **2007.** 4, 729-746.
- ¹³ Hein, L.; Lüllmann-Rauch, R.; Mohr, K. *Xenobiotica* **1990.** 20, 1259-1267.
- ¹⁴ Hruban, Z. *Environmental Health Perspectives* **1976.** 16, 111-118.
- ¹⁵ Cramer, C. T.; Ulrich, R. G. *Toxicology in Vitro* **1994.** 8, 1083-1090.
- ¹⁶ Kacew, S. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1987.** 91, 469-476.
- ¹⁷ Yamanaka *et al.* *Toxicologic Pathology* **1997.** 25, 150-157.
- ¹⁸ Lüllmann-Rauch, R.; Nassberger, L. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **1983.** 52, 161-167.
- ¹⁹ Liscum, L. *Traffic* **2000.** 1, 218-225.
- ²⁰ Albay, D.; Adler, S. G.; Philipose, J.; Calescibetta, C. C.; Romansky, S. G.; Cohen, A. H. *Modern Pathology* **2005.** 18, 733-738.
- ²¹ Anderson, N.; Borlak, J. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **2006.** 580, 5533-5540.

-
- ²² Ploemen, J. H. T. M.; Kelder, J.; Hafmans, T.; van de Sandt, H.; van Burgsteden, J. H.; Salemink, P. J. M.; van Esch, E. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2004**. 55, 347-355.
- ²³ Pelletier, D. J.; Gelhaar, D.; Tilloy-Ellul, A.; Johnson, T. O.; Greene, N. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**. 47, 1196-1205
- ²⁴ Tomizawa, K.; Sugano, K.; Yamada, H.; Horii, I. *The Journal of Toxicological Sciences* **2006**. 31, 4, 315-324.
- ²⁵ Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D. *Chimia* **2000**. 54, 640-645.
- ²⁶ Kruhlak, N. L. *et al. Toxicology Mechanisms and Methods* **2008**. 18, 217-227.
- ²⁷ Vitovic, P.; Alakoskela, J-M.; Kinnunen, P. K. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**. 51, 6, 1842-1848.
- ²⁸ Zhou, L. *et al. Analytical Chemistry* **2011**. közlés alatt
- ²⁹ Monteith, D. K.; Morgan, R. E.; Halstead, B. *Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology* **2006**. 2, 5, 687-696.
- ³⁰ Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**., 41, 1007-1010.
- ³¹ Kansy, M.; Avdeef, A.; Fischer, H., *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**., 1.(4), 349-355.
- ³² Schmidt, D; Lynch, J. MultiScreen™ Permeability Plates, Millipore application note
- ³³ Wohnsland, F.; Faller, B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**. 44, 923-930.
- ³⁴ Kerns, E. H.; Di, L.: *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008**. Elsevier Inc. p. 86-99.
- ³⁵ Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons
- ³⁶ Hanumegowda, U. M.; Wenke, G.; Regueiro-Ren, A.; Yordanova, R.; Corradi, J. P.; Adams, S. P. *Chemical Research in Toxicology* **2010**. 23, 749-755
- ³⁷ MarvinSketch Version 5.3.8, ChemAxon Ltd.
- ³⁸ Sasame, A. H.; Liberato, D. J.; Gillette, J. R. *Drug Metabolism and Disposition* **1987**. 15, 349.
- ³⁹ Yamanaka et al. *Journal of Nutrition* **1968**. 95, 3, 381-387.
- ⁴⁰ Nakamura et al. *Lipids* **1980**. 15, 9, 616-623.