



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

Új szövetspecifikus *in vitro* permeabilitási modell kidolgozása gyógyszerhatóanyagok eloszlásának előrejelzésére

Tudományos diákköri dolgozat

Dávid Barnabás

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor,
Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium,
osztályvezető, c. egyetemi docens

Konzulens: Müller Judit, Ph.D. hallgató
Dr. habil. Hell Zoltán, egyetemi docens



2014

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi rész.....	4
2.1 Proton-disszociáció vizes rendszerekben.....	4
2.1.1 A pK_a meghatározásának kísérletes módszerei	6
2.2 Lipofilitás és megoszlási hányados	7
2.2.1 A megoszlási hányados ($\log P^0$, $\log D_{pH}$) meghatározásának kísérletes módszerei	9
2.3 Oldhatóság.....	10
2.3.1 Az oldhatóság meghatározásának kísérletes módszerei	11
2.4 Permeabilitás	12
2.4.1 Permeabilitás, membrántranszport meghatározásának kísérletes módszerei	13
2.5 Sejtmembránok felépítése és összetétele.....	16
2.6 Gyógyszerhatóanyagok és metabolitjaik szervezeten belüli követésének módszerei.....	20
3. Célkitűzések.....	23
4. Kísérleti rész	23
4.1 Felhasznált anyagok.....	23
4.2 Felhasznált eszközök.....	23
4.3 Kromatográfiás paraméterek.....	24
4.4 PAMPA permeabilitás vizsgálatok kivitelezése.....	25
5. Eredmények és értékelésük	26
5.1 Szövet specifikus lipid rendszerek összehasonlítása	27
5.2 Lipidek és oldószer-rendszerük hatása a permeabilitásra és membránretencióra.....	28
5.3 Összefüggések a membránretenció és a fizikai-kémiai paraméterek között	33
5.4 P_e és $\log P$ kapcsolata a vegyületek sav-bázis tulajdonságának szemszögéből	35
5.5 Fizikai-kémiai jellemzés in vivo szempontjai a diklofenak, fenobarbitál, és lidokain példáján keresztül.....	37
5.6 Fizikai-kémiai paraméterek molekulaszervezeti összefüggései	39
6. Összefoglalás.....	44
7. Köszönetnyilvánítás.....	44
8. Melléklet	45
9. Irodalomjegyzék.....	51

1. Bevezetés

A gyógyszer molekulák célszövethez történő eljutása igen összetett folyamat. A helyileg alkalmazott készítmények kivételével a gyógyszerhatás kialakulásához nélkülözhetetlen, hogy a hatóanyag bekerüljön a keringésbe, majd onnan eljusson a terápiás hatásának megfelelő helyre. Emellett a célszövetben a hatás kifejtéséhez megfelelő koncentrációban kell jelen lennie, más esetben nem alakul ki az elvárt farmakodinámiás válasz vagy nem kívánt toxikus hatás jöhet létre. Farmakokinetikai oldalról megközelítve felszívódásnak nevezzük a keringésbe történő bejutást, míg a keringésből a célszövetbe való transzport az eloszlás folyamata. A humán klinikai fázis I. vizsgálatokba bekerülő gyógyszerjelöltek jelentős része azért nem vehet részt a további vizsgálatokban, mert nem megfelelő ADME (felszívódás, eloszlás, metabolizáció, kiürülés) tulajdonságokkal rendelkezik. [1] A gyógyszerkutatási folyamatban résztvevő vegyületek nagy mennyisége (~10.000 db) és a befektetett idő, költségkeret ésszerű korlátok közé szorítása érdekében szándék mutatkozott a fejlesztésben résztvevő molekulák körének már a kutatási folyamat korai fázisában történő szűkítésére. Ebben a szakaszban farmakokinetikai szempontból főként a fizikai-kémiai paramétereik alapján szűrik a vegyületeket. A mérhető fizikai-kémiai paraméterek körébe tartozik a savi disszociációs állandó (pK_a), a lipofilitás ($\log P$, $\log D_{pH}$) az oldhatóság ($\log S$) és a permeabilitás (P_e). A gyógyszeriparban manapság is uralkodó szemlélet jegyében az említett paraméterek meghatározását, rövid idő alatt és minél pontosabban szükséges elvégezni nagyszámú vegyületre. Munkánk révén új, szövet specifikus lipid – oldószer rendszereken alapuló *in vitro* permeabilitási modellekkel kívántuk feltárni, pontosítani a gyógyszervegyületek farmakokinetikai hátterében és az ehhez kapcsolódó fizikai-kémiai paraméterekben rejlő molekuláris folyamatok megértéséhez szükséges összefüggéseket.

2. Irodalmi rész

2.1 Proton-disszociáció vizes rendszerekben

A gyógyszermolekulák döntő hányada gyenge bázis vagy gyenge sav (75%), esetleg amfoter (20%), a fennmaradó 5% pedig nem-ionizálható.[2] Az ionizációs készség jelentős mértékben befolyásolja az adott vegyület *in vivo* felszívódását, eloszlását és kiürülését, ezért nélkülözhetetlen az ismerete.[3] A biológiai membránokon való átjutás szempontjából a semleges vegyület, az ún. transzport-forma jut jelentős szerephez, míg az ionizált molekula vagy receptor-forma a célmolekulához való kötődés szempontjából fontos.[4] A vegyületek pH-tól függő töltöttségi állapotáról a K_a disszociációs állandó nyújt kvantitatív információt, mely függ a közeg ionerősségétől és hőmérsékletétől. A K_a disszociációs állandó helyett sokkal elterjedtebben találkozhatunk annak tízes alapú negatív logaritmusával, a pK_a értékkel. Általánosan savakra és bázisokra, továbbá amfoter vegyületekre érvényesek az (1-6) egyenletek, melyek a pK_a érték megadását mutatják.

$$\text{SAV: } HA \rightleftharpoons H^+ + A^- \text{ (1), ekkor} \quad pK_a = -\log \left(\frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \right) \text{ (2)}$$

$$\text{BÁZIS: } BH^+ \rightleftharpoons H^+ + B \text{ (3), ekkor} \quad pK_a = -\log \left(\frac{[H^+] \cdot [B]}{[BH^+]} \right) \text{ (4)}$$

$$\text{EGYSZERŰ AMFOTER: } HABH^+ \rightleftharpoons HAB + H^+ \rightleftharpoons BA^- + H^+ \text{ (5), ekkor}$$

$$pK_a \text{ bázikus} < pK_a \text{ savas}$$

$$\text{IKERIONOS AMFOTER: } HABH^+ \rightleftharpoons BH^+ A^- + H^+ \rightleftharpoons BA^- + H^+ \text{ (6), ekkor}$$

$$pK_a \text{ bázikus} > pK_a \text{ savas}$$

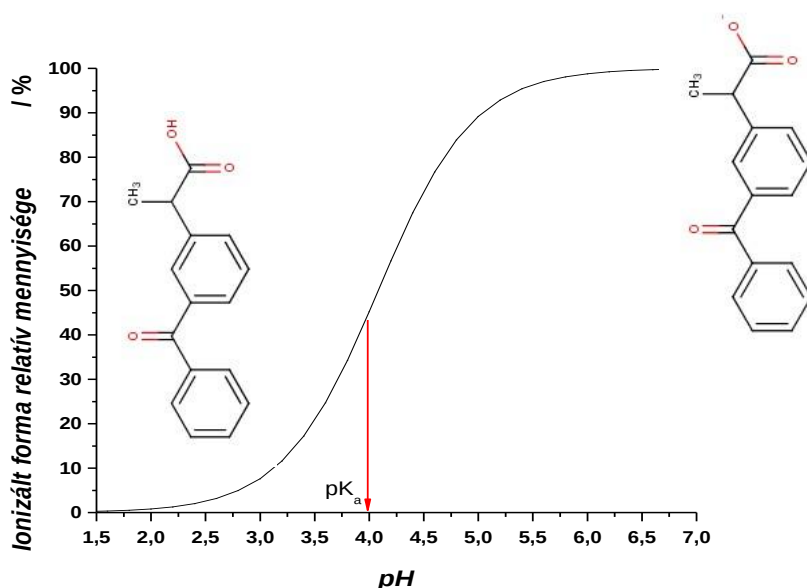
A savakra és bázisokra felírt logaritmizált egyenletek átalakításával juthatunk a Henderson-Hasselbalch összefüggés jól ismert alakjához, melynek formuláit alább láthatjuk (7-9).

$$\text{SAV: } pK_a = pH + \log \left(\frac{[HA]}{[A^-]} \right) \text{ (7)}$$

$$\text{BÁZIS: } pK_a = pH + \log \left(\frac{[BH^+]}{[B]} \right) \text{ (8)}$$

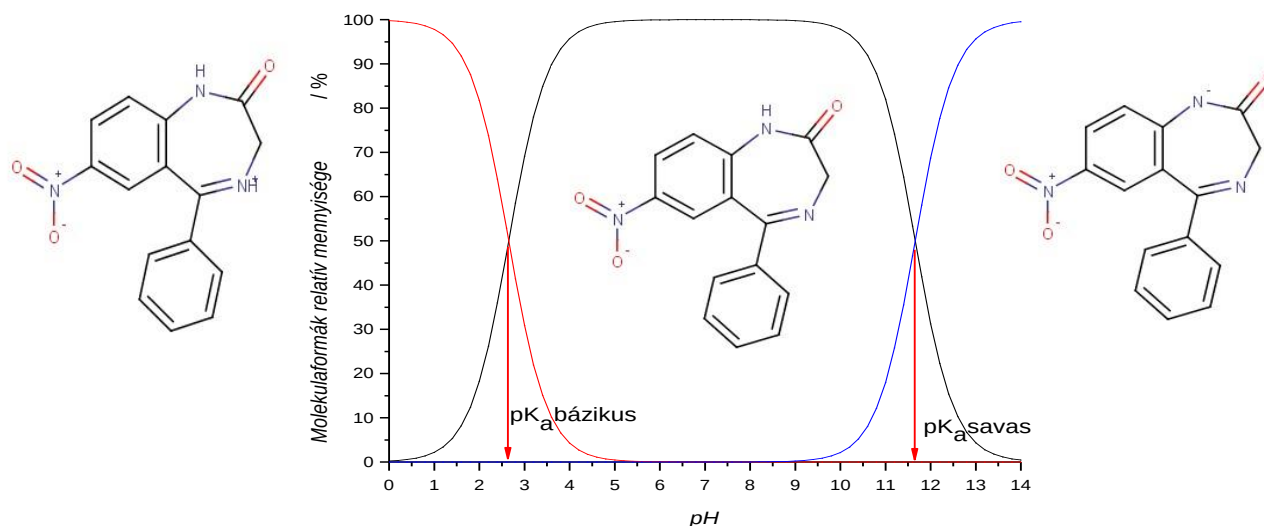
$$\text{ÁLTALÁNOSAN: } pK_a = pH + \log \left(\frac{[H^+ \text{Donor}]}{[H^+ \text{Akceptor}]} \right) \text{ (9)}$$

A Henderson-Hasselbalch egyenletek segítségével, továbbá a pK_a ismeretében, tetszőleges pH-értéken megadható a neutrális és az ionizált forma aránya. Abban az esetben, ha a semleges töltésű és az ionos forma mennyisége megegyezik, akkor a pH megegyezik a pK_a -val. Savakat tekintve a pK_a értéknél két egységgel kisebb pH-n a vizsgált vegyület teljes mértékben neutrális formában van jelen, míg a pK_a -nál két egységgel nagyobb pH-értéken a disszociálatlan molekulák mennyisége végtelen kicsi. Bázisok esetében az előbbi megállapítás fordítottan igaz. A neutrális és az ionizált formák pH függő egymásba alakulását szemlélteti az 1. ábra egy gyenge sav, a ketoprofen példáján keresztül.



1. ábra Ketoprofen ionizációja vizes közegben a pH függvényében

Az egyszerű amfoter vegyületek jellemzője, hogy a protonált, így pozitív töltésű forma bázikus pK_a állandója kisebb, mint a savas csoporté. Ebből kifolyólag a pH növelésével először a molekula bázikus csoportja fog deprotonálódni, így módon elveszíti töltését. Folytatva a gondolatmenetet, tovább növelve a pH-t protonvesztés következik be a neutrális forma savas funkcióján. Ennek köszönhetően negatív töltésű formát kapunk végeredményül (2. ábra).



2. ábra Nitrazepam ionizációja vizes közegben a pH függvényében

Ikerionos amfoter vegyületek esetében a bázikus pK_a nagyobb értéket vesz fel, mint a savas. Az ikerionos forma ismérve, hogy molekuláris léptékben tekintve töltés inhomogenitás jelenik meg rajta, ugyanakkor eredő töltése semleges. Azt a kitüntetett pH értéket, ahol az ikerionos amfoter vegyület kifelé neutrális töltést mutat, izoelektromos pontnak nevezzük. Az izoelektromos pont pH-ja kiszámítható a (10) egyenlet segítségével.

$$pH_{Izo.} = \left(\frac{pK_{a\text{savas}} + pK_{a\text{bázikus}}}{2} \right) \quad (10)$$

2.1.1 A pK_a meghatározásának kísérletes módszerei

Számos, különböző elveken alapuló eljárás honosodott meg a hatóanyagjelöltek fizikai-kémiai jellemzésével foglalkozó laboratóriumokban, melyek a proton-disszociációs állandó meghatározására irányulnak. Legelterjedtebb, és a legegyszerűbb módszer is egyben a potenciometrikus titrálás, melynek kétféle megközelítése létezik. Az ún. direkt mérésnél a kérdéses vegyületből oldatot készítenek, majd a vegyület sav / bázis jellegének megfelelően erős bázis vagy sav oldatával titrálják. A titrálási görbe inflexiós pontja alapján a keresett pK_a megadható. A módszer hátránya, hogy viszonylag nagy mennyiségű mérendő vegyületet igényel (~100 mg). Kisebb (1-3 mg) anyagigénnyel jellemezhető az indirekt potenciometriás titrálás, ahol az erős savval vagy erős bázissal történő titrálást a mérendő vegyület távollétében és jelenlétében egyaránt elvégzik. Mindkét esetben felveszik a teljes titrálási görbét, és a két szigmoid görbe különbségéből, valamint függvény transzformációk alkalmazásával jutnak az ún. Bjerrum-függvényhez. A Bjerrum függvény inflexiós pontja

vagy pontjai adják meg a kérdéses pK_a értéket, illetőleg értékeket.[5] Lehetőség szerint oldószerként vizet alkalmaznak, ugyanakkor gyakran szükség van a rossz vízoldhatóság miatt szerves módosítók (koszolvensek) hozzáadására. Az oldathoz az ionerősség magas és állandó értéken tartása végett $0,15 \text{ mol / dm}^3$ koncentrációban nátrium- vagy kálium-kloridot adagolnak, melyek a fiziológiás körülmények modellezésében is szerepet játszanak.

Alternatív választási lehetőségként alkalmazható szinte minden olyan mérési módszer, mely az analizálandó vegyület pH függő tulajdonságait célozza vizsgálni. Ebből kiindulva a proton-disszociációs állandó meghatározására alkalmas lehet az UV-pH titrálás, elektroforetikus mobilitás mérése, továbbá a mágneses magrezonancia spektroszkópiával mérhető pH függő kémiai eltolódás jelensége. Ezeken felül a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia jelenthet alternatívát. Utóbbi mérési módszer azonban nem elterjedt, sokkal inkább egzotikus kérdéseket hivatottak megválaszolni.

2.2 Lipofilitás és megoszlási hányados

A vegyületek lipofilitásának ismerete a hatóanyagjelöltek jellemzésére egyik legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter. A lipofilitás jelentősen befolyásolja egy vegyület *in vivo* farmakokinetikai, illetve farmakodinámiás viselkedését, tehát összességében az emberi szervezeten belüli sorsát. [2] Meyer és Overton az 1900-as évek kezdetén elsőként tanulmányozta a farmakológiai hatás és a lipid oldékonyság közötti összefüggést. Munkájuk alapját az a megfigyelés adta, hogy sok szerkezetileg különböző, de lipofil vegyület képes narkózist előidézni. Kísérleteik eredménye rámutatott arra, hogy ebihalakon a narkotikus hatás és az olaj / víz megoszlási hányados között lineáris összefüggés áll fenn. Kutatásuk eredménye volt a kiindulópontja az anesztetikumok hatásmechanizmusát hosszú időn keresztül egyeduralkodó módon leíró ún. lipid-teóriának, melyet ma már a receptor alapú ún. protein-teória váltott fel. A célmolekulát leíró elmélet többek között már képes magyarázni az enantiomerek közti eltérő hatás erősséget. [6] Közel hatvan év elteltével Gaudette és Brodie összefüggést fedezett fel egyes vegyületekre vonatkozóan a jó lipid-oldékonyság és a máj-specifikus metabolizmus között, melyet McMahon 1961-ben szisztematikus kísérletekkel erősített meg. [7] Alapvető mérföldkőhöz érkeztek a kutatók 1964-ben, amikor Hansch és Fujita javaslata szerint n-oktanol / víz - rendszerben kezdték vizsgálni a vegyületek megoszlását. Hét évvel később Leo, Hansch és Elkins már 800 vegyület n-oktanol / víz - rendszerben való megoszlásáról rendelkezett információval.

Lényeges különbséget kell tennünk az első ránézésre azonos tulajdonságot leíró hidrofóbitás és lipofilitás között. A hidrofóbitás az apoláris csoportok és a molekula vizes közegben kialakuló kölcsönhatásaira vonatkozik, míg a lipofilitás a molekula vagy molekularész affinitását mutatja a lipofil közeggel. A vegyületek lipofilitásának leírására kétféle megoszlási hányados terjedt el. A Nernsti definíció alapján egy vegyület azonos molekuláris formában történő megoszlását írja le a "valódi" megoszlási hányados, két egymással elhanyagolható mértékben elegyedő folyadékban, állandó hőmérsékleten. A "valódi" megoszlási hányadost általában annak tízes alapú logaritmusaként szokás megadni ($\log P$ vagy $\log P^0$) jelöléssel. A "látszólagos" megoszlási hányados pedig, egy adott pH-jú vizes fázisban jelen lévő összes molekuláris forma megoszlására vonatkozik ($\log D_{pH}$). [5] Monoprotikus savak, illetve bázisok összes folyamatának leírására szolgál az ún. "négy-egyensúly" modell, melyet most savakra részletesen a **3. ábrán** láthatjuk.

1. Proton-disszociációs egyensúly vízben

$$pK_a = -\log\left(\frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA^0]}\right) \quad (11)$$

2. Neutrális forma megoszlása n-oktanol / víz rendszerben

$$\log P^0 = \log\left(\frac{[HA^0]_{okt.}}{[HA^0]_{viz}}\right) \quad (12)$$

3. Ionos forma megoszlása n-oktanol / víz rendszerben

$$\log P^{(-)} = \log\left(\frac{[A^-]_{okt.}}{[A^-]_{viz}}\right) \quad (13)$$

4. Proton-disszociációs egyensúly n-oktanolban (Scherrer pK_a)

$$pK_a^{okt.} = -\log\left(\frac{[H^+] \cdot [A^-]_{okt.}}{[HA]_{okt.}}\right) \quad (14)$$

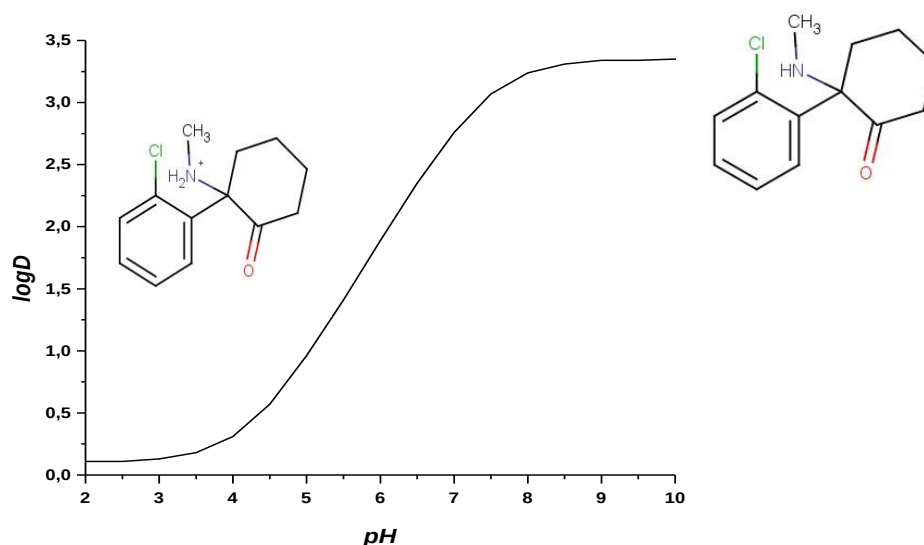
3. ábra Négy-egyensúly modell

Az egyensúlyokat leíró egyenletek és a Henderson-Hasselbalch összefüggés alapján a $\log D$ a pH-val változik, tehát érvényes a (15) egyenletben megadott összefüggés.

$$\log D = \log P^0 + \log(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (15)$$

A pK_a értéknél kisebb pH-kon a gyenge savak egyre inkább neutrális állapotba kerülnek, lipofilitásuk eléri maximumát. A pK_a -nál nagyobb pH értékeken egyre nagyobb mértékű lesz az ionizáció, végül az összes molekula ionos állapotba jutásával a lipofilitás minimálisra csökken. A bázikus karakterű hatóanyagok látszólagos megoszlási

hányadosának pH függő görbéje éppen ellentétes lefutást mutat, melyet a ketamin példája szemléltet a 4. ábrán.



4. ábra Ketamin látszólagos megoszlási hányadosának változása a pH függvényében, vizes közegben

Szabályos és ikerionos amfoter vegyületek jellemzője, hogy a lipofilitás a savas és a bázikus pK_a értékek között maximális.

2.2.1 A megoszlási hányados ($\log P^0$ és $\log D_{pH}$) meghatározásának kísérletes módszerei

Legrégebben ismert és használt módszer a rázó-tölcséres eljárás, mely definíció szerint méri az adott vegyület $\log P$ értékét. Egyszerűsége ellenére számos korlátozó tényező nehezíti alkalmazhatóságát. Egyrészt nehézkesen oldható meg a rendszer termosztálása, amely így pontatlan és összehasonlíthatatlan adatokhoz vezethet, másrészt a vízben nagyon rosszul oldódó vegyületek mérésére nem alkalmas. Ezeken túlmenően idő és munkaigényes, illetve kicsi az áteresztőképessége. A manapság legelterjedtebb módszer, a pH-metriás mérés során a vizsgálandó vegyületet először vizes, majd n-oktanol / víz kétfázisú rendszerben titráljuk, meghatározzuk a pK_a és $p_{oktanol}K_a$ értékeket. A titrálás folyamatát potenciometriás méréssel követjük nyomon. Amennyiben a két titrálási görbe nem esik egybe, számolnunk kell a vizsgált vegyület egy formájának megoszlásával a fázisok között. A két szigmoid görbe eltéréséből számítható a megoszlási hányados.[8] Az eljárás nagy előnye, hogy egyetlen mérés adatai alapján megadható a kérdéses vegyület $\log D$ -pH görbéje. A nagyobb

átersztőképeség iránti igény kielégítésére megjelentek a kromatográfiás módszerek, melyek pontosságukban sajnálatos módon alulmúlják a már említett eljárásokat. A kromatográfiás vizsgálatok alapja, hogy fordított fázisú kromatográfiás (jellemzően C_8 , C_{18}) oszlopon a retenció mértéke összefügg a vegyület lipofilitásával. Hasonló megközelítést követve kapilláris elektroforézis berendezés segítségével, illetve mikroemulziós elektrokinetikus technikát (MEEKC) alkalmazva is megadható a lipofilitás. [5]

2.3 Oldhatóság

A gyógyszerhatóanyagok fiziológiás környezetbeli oldhatósága számottevően befolyásolja azok farmakokinetikai viselkedését a szervezetben. Kiemelt szerephez jut a hatóanyagok oldhatósági sajátsága a szájon át adagolt szilárd gyógyszerkészítmények (tabletta, kemény kapszula, szuszpenzió stb.) esetében. Ekkor a tápcsatorna megfelelő szakaszából való felszívódás megindulásához elengedhetetlen a hatóanyag oldatba jutása, melyet jó néhány gyógyszer technológiai szempontból releváns esemény előz meg (tabletta nedvesedése, szétesése stb.). Az oldódás folyamatát három részlépésre oszthatjuk. Először az oldandó hatóanyagnak az oldószerhez (jellemzően a gyomornedvhez) el kell jutnia, ezt követően megtörténik az oldódás, végül az oldott vegyület az oldat belseje felé távozik. [9] Az oldódás közben a szilárd anyag és az oldószer határfelületén diffúziós határréteg alakul ki, melyben a hatóanyag koncentrációja meghaladja az oldat más részeiben lévő koncentrációt. Abban az időpillanatban, amikor a diffúziós határrétegben mérhető koncentráció megegyezik az oldat bármely, tetszőleges pontjában mérhető koncentrációval, termodinamikai értelemben telített oldatot kapunk. Az oldatban mérhető koncentráció megegyezik a vegyület adott körülmények között mért oldhatóságával. Ilyenkor tehát, a diffúziós határréteg a továbbiakban megszűnik létezni, míg nem hígul az oldat vagy nem következik be hőmérséklet emelkedés, illetve ionizálható vegyületek esetében nem változik meg a pH megfelelő irányba. Gyenge savakat tekintve a pK_a értéknél kisebb pH-n a kérdéses vegyület ionvisszatartott formában van jelen, itt az oldhatóság minimális. A pK_a érték átlépése után a vegyület egyre nagyobb hányada kerül ionos állapotba, ezzel párhuzamosan nő a vizes oldhatóság, míg eléri maximumát. Gyenge bázisok természetesen éppen fordított módon viselkednek, így esetükben a pK_a -nál nagyobb pH-n van jelen legnagyobb mennyiségben a molekula neutrális formája. Amfoter vegyületek tulajdonsága, hogy az oldhatóság a két pK_a érték között a legkisebb. A hatóanyagok oldhatóságának ($\log S$) leírására kétféle megközelítés terjedt el, az egyiket termodinamikai, a másikat kinetikai oldhatóságnak nevezzük. A termodinamikai oldhatóság

ismerete szilárd-folyadék egyensúlyi állapot fennállását valószínűsíti állandó hőmérsékleten. A termodinamikai oldhatóság emellett nagyban függ az oldandó anyag kristályszerkezetétől is. Legtöbbször moláris koncentráció egységben adják meg. A kinetikai oldhatóság ezzel szemben sokkal inkább az anyag "belső" molekuláris tulajdonságairól hordoz információt, mintsem kristályformájáról. A kinetikai oldhatóság sebességgel jellemezhető mennyiség, így koncentráció / időegységben szokás megadni.

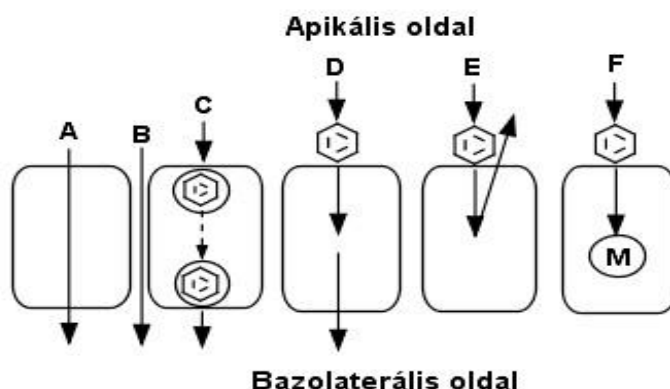
2.3.1 Az oldhatóság meghatározásának kísérletes módszerei

A termodinamikai oldhatóság meghatározásához alapvető a szilárd-folyadék egyensúly létrejötte, ezért a vizsgálandó vegyületből minden esetben feleslegben adagolt mennyiséget juttatnak vizes közegbe. A mérést az egyensúlyi állapot eléréséig (24-48 h) folytatják állandó hőmérsékleten, majd a két fázist elválasztják egymástól, és az oldat koncentrációját alkalmas analitikai módszerrel határozzák meg. A klasszikus termodinamikai oldhatóság mérést szokványos módon rázótolcsér segítségével végezték. Azonban a hagyományos lipofilitás vizsgálathoz hasonlóan a rázótolcséres oldhatóság mérés közben is a már említett nehézségek merülnek fel. Stuart és mtsai. 2005-ben leírt új módszerével már 80 perc alatt megkaphatjuk egy gyenge sav, bázis vagy amfoter vegyület termodinamikai oldhatóság értékét. Eljárásuk alapját az képezi, hogy megfelelő pH beállításával a kérdéses vegyületet ionos formába hozzák, majd a pH eltolásával az anyag kiválását idézik elő. A kicsapódás torzulást okoz a titrálási görbék lefutásában, melyből a termodinamikai oldhatóság megállapítható.[10]

A kinetikai oldhatóság meghatározásához a kérdéses vegyületből szerves oldószerrel, legtöbbször dimetil-szulfoxiddal (DMSO) oldatot készítenek. Itt érdemes megjegyezni a termodinamikai- és a kinetikai oldhatóság közötti különbség forrását. Ugyanis utóbbi esetben, ezután már nincs szükség a kristályrácsot összetartó erők legyőzésére, hiszen ezt a dimetil-szulfoxid már megtette. Ezek után a DMSO-val készült oldat adott térfogatait adják vizes közeghez. Az így elkészült elegyet néhány órán keresztül inkubálják, rázatják, majd a kivált részeket pl. szűrővel eltávolítják. Végül az oldat koncentrációját egy alkalmasan kiválasztott analitikai módszer segítségével állapítják meg. A kinetikai oldhatóság esetében lehetőség van a méréseket 96 vagy ennél több férőhelyes mérőtálcán elvégezni a vizsgálatokat, mely hozzájárul a nagy áteresztőképesség biztosításához. A kinetikai oldhatóság meghatározására már a kutatás korai szakaszában szükség van a hatóanyagjelöltek rendszerezése érdekében, míg a termodinamikai oldhatóság megállapítása a későbbi fázis feladata.

2.4 Permeabilitás

A hatóanyag molekulák sejtmembránon való áthatolókéességének mérőszámát a permeabilitás adja meg. A permeációs készség ismerete hasznos információt szolgáltat elsősorban a gyógyszerek felszívódásáról, illetve összességében a biológiai membránokon való átjutásáról. A sejtmembránon keresztüli penetráció alapvetően hat-féle mechanizmus szerint játszódhat le. [5]



5. ábra Penetrációs mechanizmusok

A passzív diffúzió (A) az extracelluláris tér irányából az intracelluláris tér felé történő, energia befektetés nélkül végbemenő folyamat, melynek hajtóereje a sejtmembrán két oldala között létrejött koncentráció gradiens. A diffúziós sebességéről Fick I. törvénye ad kvantitatív felvilágosítást.[9] ((16)-os egyenlet)

$$\frac{dC}{dt} = \Delta C \frac{AD}{l} \quad (16),$$

ahol

ΔC – Koncentráció különbség [mol / m³] A – Membrán felület [m²]

D – Diffúziós állandó [m² / s] l – Membrán vastagsága [m]

Az elsősorban kisméretű és hidrophil karakterű vegyületek előtt nyitva áll az ún. paracelluláris diffúziós (B) út, amely a szoros sejtkapcsolatokon (tight-junction) keresztül valósul meg. A maximális molekulaméret, ahol még a paracelluláris diffúziós folyamattal számolni lehet közelítőleg 250 Da.[5] Nagyobb molekulaméretű (>>500 Da) vegyületek egy lehetséges transzportfolyamata az endocitózis (C), melyhez lipofil tulajdonságú anyagok szükségesek. Az endocitózis során a lipid kettősrétegből vezikulák fűződnek le, melyek belsejében a vegyület átjuthat az ellentétes oldalra. A sejtek lipid membránjában elhelyezkedő

transzportfehérjék segítségével egyes molekulák, ionok képesek koncentráció gradiens ellenében is közlekedni a biológiai membránokon keresztül. A transzport két irányba valósulhat meg, vagy apikális irányból a bazolaterális oldal felé, ekkor van szó influxról (**D**), vagy fordított irány esetében, efflux folyamatról beszélhetünk (**E**). Az efflux transzporterek működése akadályozza meg a szervezetbe kerülő exogén anyagok sejtekbe jutását, ugyanakkor sok esetben veszélyezteti a gyógyszeres terápia sikeres kimenetelét is. A legismertebb efflux folyamatokért felelős fehérje egy 170 kDa tömegű glikoprotein (P-gp), mely képes többek között a doxorubicin, daunorubicin, vinca alkaloidok, taxánok és a podofillotoxin származékok eltávolítására.[11] A gyógyszerhatóanyagok sejtekbe jutását metabolikus folyamatok is akadályozhatják (**F**), ezekben a folyamatokban főleg a citokróm P450 izoenzim család játszik szerepet.

2.4.1 Permeabilitás, membrántranszport meghatározásának kísérletes módszerei

A permeabilitás *in vitro* körülmények közötti mérésével kapcsolatban kétféle kísérletes rendszer ismert a szakirodalomban.[5,12] Ezek alapján megkülönböztetünk sejtes és nem-sejtes elrendezésű modelleket. A leggyakrabban alkalmazott sejtes vizsgálati módszerek összefoglalása a 1. táblázatban [5] látható.

1. táblázat Permeabilitás, membrántranszport modellezésében alkalmazott sejtes rendszerek

Sejtvonal	Sejt eredete
Caco-2	Emberi vastagbél adenokarcinóma
MDCK	Madin-Darby kutya-vese epitélum
MDR1-MDCK	P-gp-t kódoló génnel transzfektált MDCK
T24	Emberi húgyhólyag karcinóma
ECV304	Emberi köldök véna endotélum

A sejtes modellek általános jellemzői közé tartozik, hogy lehetőséget biztosítanak a passzív diffúzió mellett az efflux és a metabolikus folyamatok tanulmányozására egyaránt. Az MDR1-MDCK sejtvonal érdekessége, hogy az MDR1 génnel történő transzfekció következtében a sejtvonalban fokozott mértékben van jelen az efflux folyamatokban kitüntetett szerephez jutó P-glikoprotein. Ennek köszönhetően, alkalom nyílik az efflux mechanizmusok mélyreható elemzésére, mely adott esetben hozzájárulhat a nem P-gp szubsztrát tulajdonságú hatóanyagok kifejlesztéséhez. Sejtes modellek segítségével az ún. látszólagos permeabilitási állandó meghatározása lehetséges a (17) összefüggés alapján.

$$P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \cdot \frac{V_r}{A \cdot C_0} \quad (17),$$

ahol

dC_r / dt – Hatóanyag koncentrációjának időbeli változása a bazolaterális oldalon [(mol / cm³)* s⁻¹]

V_r – Bazolaterális oldal térfogata [cm³]

A – Sejtkultúra felülete [cm²]

C_0 – Apikális oldalon mérhető kiindulási farmakon koncentráció [mol / cm³]

Jóllehet, a sejtes modellek komplexitásából fakadó információhalmaz nagy segítséget jelent a hatóanyagjelöltek szelektálási és fejlesztési folyamatában, biológiai forrásuk és ilyen értelemben vett összetettségük buktatókat is hordoz magában. A sejtrétegek mérésre alkalmas elkészítése akár két-három hetet is igénybe vehet, ezzel összhangban költségvonzatuk is nagy, továbbá a kísérleti paraméterek vizsgálható tartománya (pl. a rendszer pH-ja csak szűk tartományban változtatható) korlátozott. Mindemellett felmerül a nehézkes reprodukálhatóság kérdése is.

A nem-sejtes modellek közül a legelterjedtebb mérési módszer a PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Emellett kisebb szerephez jut és csak speciális esetekben alkalmazható a Franz-féle diffúziós cella, amelyet dermális és transzdermális gyógyszerkészítmények vizsgálatára alkottak meg. Ekképpen nemcsak a mesterséges membránon keresztüli diffúzió, hanem a hatóanyag gyógyszerformából való felszabadulása is vizsgálható a segítségével.[9] A PAMPA módszert elsőként az *in vitro* permeabilitási vizsgálatok fejlesztésében úttörő szerepet vállaló Kansy és mtsai. által 1998-ban megjelent közlemény ismerteti.[13] Elképzelésük alapját képezte egymásba illeszthető, 96 helyet tartalmazó mérőtálca képezte, amiket egy-egy pórusos polimer membrán választ el egymástól. A membrán két oldalán így létrejön a donor (adó) és az akceptor (fogadó) oldali kompartment. A pórusos membránt 10 m/v %-os lipid keverék n-dodekános oldatával borították. A lipid keverék fő tömegében foszfatidilkolint (PC), foszfatidiletanolamint (PE) és csekély mennyiségben foszfatidilinozított, illetve koleszterint tartalmazott. Faller és Wohnsland a Novartis kutatói lipid nélküli PAMPA membránok segítségével először kínáltak alternatívát a rázótolcséres módszer helyett az alkán / víz megoszlás, nagy áteresztőképességű rendszerben való mérésére. [14] Sugano és mtsai. egy 2001-ben megjelent cikkükben számoltak be arról, számos oldószer tesztelése és a lipid összetétel szisztematikus változtatása után, hogy az orális felszívódás előrejelzésére az ún. BML (bio-(intestinal) mimetic lipid) 1,7-

oktadiénes oldata jobb eredményt biztosít. Szemben azzal a módszerrel, amikor foszfatidilkolint 1,9-dekadiénben oldottak és ezt alkalmazták, mint mesterséges membránt. A szerzők, ugyanakkor hangsúlyozzák az alkildiének szervezetre gyakorolt káros hatásait. [15] Zhu és kutatócsoportja hidrofíl polimer membránt borított 1 m/v %-os lecitin n-dodekános oldatával. A hidrofíl membrán használatakor szignifikáns növekedést tapasztaltak a permeabilitási értékekben, emellett a kísérletekhez szükséges permeációs időt mintegy ötödére tudták csökkenteni. Ezen kívül összehasonlították a felszívódás előrejelzésére alkalmas sejtes Caco-2 modellt a nem sejtes mesterséges membránok és a fizikai-kémiai paraméterek ($\log P$, $\log D$, PSA-poláris felszín (polar surface area), QSPR-quantitatív szerkezet-permeabilitás kapcsolat (quantitative structure-permeability relationship) predikciós képességével. Azt találták, hogy a Caco-2 és a mesterséges membránok felszívódási előrejelzésben való pontossága összemérhető egymással, ezen felül szignifikánsan jobbnak bizonyultak ebből a szempontból, mint a fizikai-kémiai paraméterek. [16]

A PAMPA permeabilitás vizsgálatokhoz a kérdéses vegyület dimetil-szulfidos oldatát a modellezni kívánt szövet apikális oldalának megfelelő pH-jú pufferhez adják, ez az elegy képezi a donor kompartment összetételét. Az akceptor mérőlemezbe juttatják az intracelluláris közeget reprezentáló pH = 7,4 kémhatású puffert, mely esetenként tartalmazhat albumint is. Az albumin az α_1 -savas-glikoprotein (AGP) mellett a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a humán vérplazmában, melyek reverzibilis módon köthetnek meg gyógyszermolekulákat (warfarin stb.), így csökkentve azok szabad plazma koncentrációját. Rossz oldhatóságú vegyületek esetén koszolvensek (dimetil-szulfid, acetonitril) segítségével javítható az oldhatóság. A donor és az akceptor oldalt a már említett módon egy mesterséges membrán választja el, az összeállított rendszert meghatározott ideig állandó hőmérsékleten inkubálják. Az inkubáció alatt lehetőség van az akceptor oldali kompartment oldatok kevertetésére, mely a membrán közelében kialakuló nagyobb koncentrációjú oldatréteg vastagságát hivatott minimalizálni. Ugyanis ebből az oldatrészletből a vegyület kizárólag diffúzió kontrollált módon juthat ki, mely lassú folyamat. A kevertetés ennek ellenére nem elterjedt nehézkes megvalósíthatósága miatt. Az inkubációs idő alatt a vegyület passzív diffúziós mechanizmus útján jut át a donor oldalról a fogadó mérőlemezbe. Az inkubációs idő letelte után a mérőlemezeket kiemelik egymásból és spektrofotometriás vagy kromatográfiás módszerekkel meghatározzák az adó és fogadó oldalon mérhető koncentrációkat. A mérések alapján az egyes vegyületeket az effektív permeabilitás [17] (18) értékkel jellemzik.

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - t_{ss})} \cdot \left(\frac{V_A \cdot V_D}{V_A + V_D} \right) \cdot \log \left(1 - \left(\frac{V_A + V_D}{(1-R) \cdot V_D} \right) \cdot \left(\frac{C_D^t}{C_D^0} \right) \right) = \left[\frac{cm}{s} \right] \quad (18),$$

ahol

A - Szűrő felülete [cm^2]
 t – Inkubációs idő [s]
 t_{ss} – Membrán szempontjából V_A – Akceptor lyukban lévő oldat térfogata
kvázistacionárius állapot eléréséhez [cm^3]
szükséges idő [s]
 V_D – Donor lyukban lévő oldat térfogata R – Lipid-membránban abszorbeálódott
[cm^3] hatóanyag hányad (Retenciós faktor)
 C_D^t - Donor oldalon mérhető koncentráció t C_D^0 – Donor oldalon mérhető koncentráció a
idő elteltével [mol / cm^3] $t \equiv 0$ időpillanatban [mol / cm^3]

Annak figyelembe vételére volt szükséges bevezetni a retenciós faktort, hogy kezelhetővé váljon a mesterséges membrán nem "ideális" volta. Azaz a membránba belépő részecskék sok esetben nem elhanyagolhatóan kicsiny mennyisége a határrétegben marad. A retenciós faktor segítségével számszerűsíthető a membránban ragadt részecskék hányada, melynek kiszámításához a (19) összefüggés szükséges. [17]

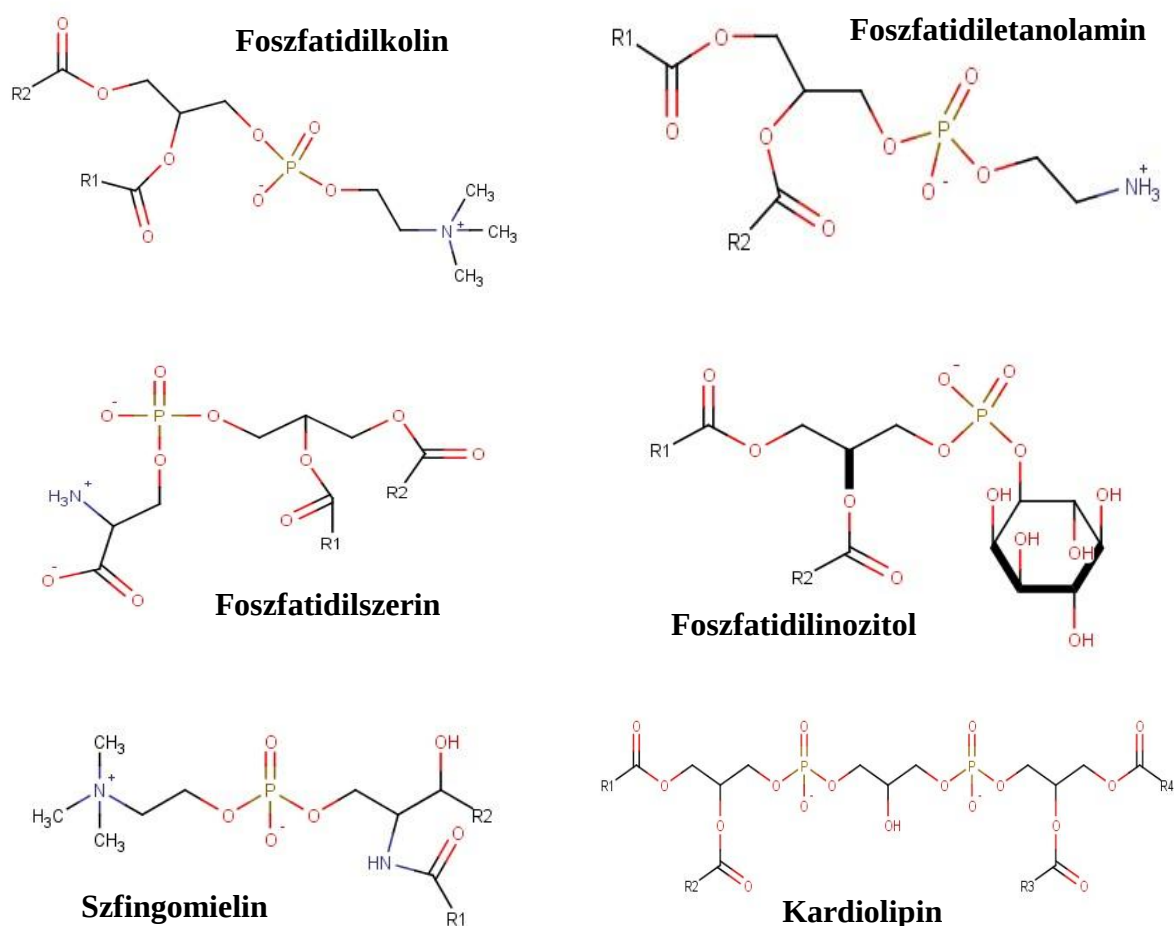
$$R = 1 - \frac{C_D^t}{C_D^0} - \frac{V_A \cdot C_A^t}{V_D \cdot C_D^0} \quad (19)$$

Mindent összevetve a PAMPA rendszer alkalmas jól reprodukálható módon nagyszámú vegyület gyors és költséghatékony vizsgálatára. A sokféle kísérleti paraméter (inkubációs idő, pH, koszolvens, lipid összetétel stb.) széles tartományban való változtathatósága nélkülözhetetlenné teszi alkalmazását a hatóanyagjelöltek kiválasztási folyamatában.

2.5 Sejtmembránok felépítése és összetétele

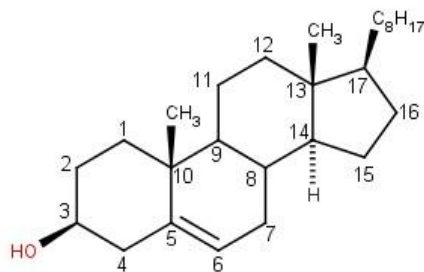
Az extra- és intracelluláris tér, valamint a szervezet különböző folyadékterei közötti anyagtranszport a biológiai membránokon keresztül valósul meg. A gyógyszerhatóanyagok célba jutását befolyásolja a molekula fizikai-kémiai jellemzőin túlmenően a biológiai határrétegek felépítése és tulajdonságai. A biológiai membránok jellemzően 6-10 nm vastagságú lipid kettősrétegből állnak, melyek fő tömegét változatos összetételben jelenlévő foszfolipidek alkotják. [9] A foszfolipidek amfipatikus molekulák, ezért vizes közegben kettősréteget képeznek. Az apoláris felükkel egymás felé, míg a poláris végükkel a vizes

rendszer felé orientálódnak. Az egyes foszfolipid molekulák tengely menti forgó mozgása, ezen kívül oldalirányú laterális diffúziója termodinamikailag kedvezményezett, szemben az egyes rétegek közti kicserélődéssel. A biológiai membránok változatos lipid összetétellel jellemezhetőek, ezek közül a legjelentősebbek a foszfatidilkolin (PC), foszfatidiletanolamin (PE), foszfatidilszerin (PS), foszfatidilinozitol (PI), szfingomielin (Sph), lizo-foszfatidilinozitol (LPI) és a kardiolipin / difoszfatidilglicerol (CL)(6.ábra). [17]



6. ábra Foszfolipidek molekulaszervezete, R1 és R2 zsírsavláncot jelöl.

A foszfolipidek mellett a kettős rétegben jelen vannak fehérje molekulák és koleszterin egyaránt. A koleszterin szterán vázas molekula, melyben a harmadik szénatomon hidroxil-csoport van, illetve az ötös-hatos szénatom közti kötés egyszeresen telítetlen, továbbá a 17-es szénatomon nyolcatomos alifás lánc épül ki. [18]



7. ábra Koleszterin

A koleszterin biológiai membránokban betöltött szerepére jellemző, hogy a megfelelő fluiditás kialakításaért felel, a foszfolipid molekulák közé ékelődve, azokkal párhuzamosan elhelyezkedve. Az egyes szövetek lipid összetétele más és más, mely számottevően befolyásolja a gyógyszermolekulák szervezeten belüli sorsát (felszívódás, eloszlás, esetleges felhalmozódás). Az adott szövetre jellemző lipid összetétel, m/m%-os megoszlása a 2. táblázatban található. [17]

2. táblázat Szövetek lipidösszetétele m/m %-ban. BBB = Vér-agy gát, PC = foszfatidilkolin, PE = foszfatidiletanolamin, PI = foszfatidilinozitol, PS = foszfatidilszerin, PA = Foszfatidsav, PG = foszfatidilglicerin, Sph = szfingomielin, LPI = lizo-foszfatidilinozitol, Neutr. lipid = semleges lipid,

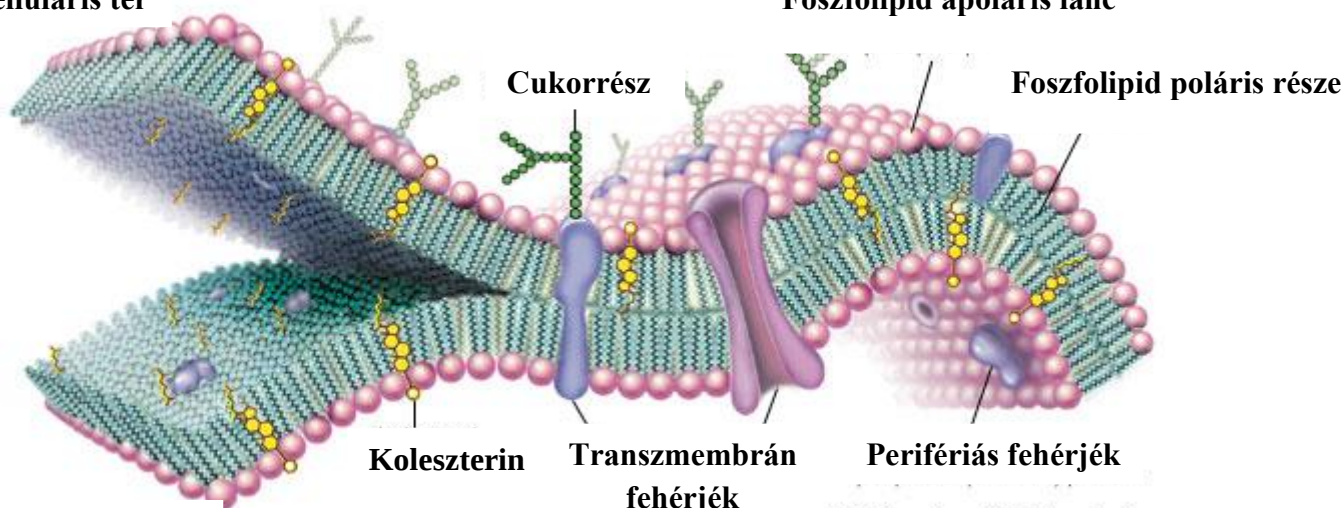
Lipid	BBB	Szív	Máj	Vese	Tüdő
PC	12,6	8,6	42,0	22,7	35,4
PE	33,1	13,6	26,0	15,1	13,3
PI	4,1	1,0	9,0	2,8	2,0
PS	18,5	-	-	2,8	-
PA	0,8	0,6	-	-	-
PG	-	-	-	-	1,9
Sph	-	-	-	3,9	12,2
LPI	-	-	1,0	-	-
Koleszterin	-	-	5,0	5,7	27,0
Neutr. lipid	-	57,7	-	-	-
Egyéb	30,9	16,8	17,0	44,4	8,1

Az itt bemutatott foszfolipidek közül a *foszfatidilkolin* kvaterner nitrogén atomot tartalmaz, illetve szöveti pH-n (7,4) a foszfát csoport deprotonálódott állapotban van, ezért a molekula összességében neutrális formában található a kettősrétegben. A *foszfatidiletanolamin* nitrogénje pozitív töltésű, míg a foszfát rész ugyancsak negatív (pH = 7,4), ezért a nettó töltés nulla. A *foszfatidilinozitol* és a *lizo-foszfatidilinozitol*(hidrolizátum) savas csoportja, szöveti pH-n ionizált, így a molekula egyszerűen negatív töltésű. A *foszfatidilszerin*nel kapcsolatban megállapítható, hogy a már említett körülmények között a szerin oldallánc ikerionos formát

vesz fel, ez lokális neutralitást okoz, azonban a molekula foszfát csoportjának negatív töltése, végeredményben a molekula nettó töltését egyszeresen negatívvá teszi. Negatív töltésű a *foszfatidsav* is, mely az előbb elmondottakból egyenesen következik. A *foszfatidilglicerín* a foszfát csoport deprotonálódása következtében szintén negatív töltésű. Ezeken kívül a *szfingomielin* és a *koleszterin* neutrális. Érdekes említést tenni még a sejtmembrán szerves részét képező fehérjékről is. A perifériás fehérjék a membrán külső vagy belső felszínéhez kapcsolódnak, és jellemzően a sejtben belüli jelátvitelben töltenek be szerepet. [19] Az integráns vagy transzmembrán fehérjék feladatukra szerteágazó, segítségükkel meghatározott ionok és vízmolekulák juthatnak ki vagy be a sejtől, továbbá betölthetnek receptor szerepet is. A 8. ábrán a sejtmembrán felépítése látható a fontosabb alkotóelemekkel.

Extracelluláris tér

Foszfolipid apoláris lánc



Intracelluláris tér

© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

8. ábra Sejtmembrán felépítése

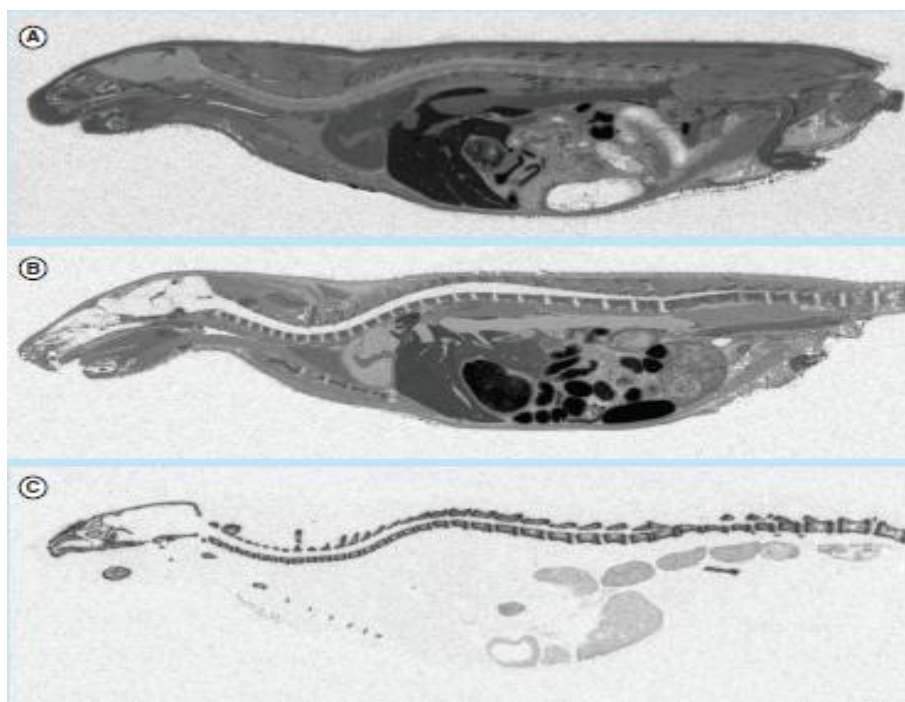
A szövetek különböző lipid összetételéből adódó eltéréseket vették számba azok a kutatók, akik *in vitro* mesterséges membránokon alapuló permeabilitási modelleket dolgoztak ki. Ezek közül legjelentősebb a már említett Sugano és kutatócsoportja (2001) által fejlesztett modell az orális felszívódás vizsgálatára. [15] Li Di és mtsai. 2003-as publikációjukban leírtak alapján, a gyógyszervegyületek eloszlásában kiemelt figyelmet érdemlő vér-agy gát (BBB) rendszer modellezését oldották meg. [20] Sinkó és mtsai. (2012) a bőr, mint gyógyszerbeviteli kapu problémakörét tanulmányozták. Közleményük alapján sikerrel fejlesztették ki a bőr-PAMPA modellt, amely alkalmas a gyógyszervegyületek és kozmetikumok bőrön keresztüli felszívódásának előrejelzésére. [21] Bigogno és mtsai. vizsgálták BBB modell esetében az oldószer és a lipid összetétel hatását a permeabilitásra. Azt találták, hogy a permeabilitás nagyban függ a lipidek feloldására használt n-dodekán / n-hexán aránytól, továbbá rámutattak

a lipidek közepes permeabilitású vegyületek esetén számottevő hatására. Az 1:1 térfogatarányban adagolt n-dodekán / n-hexán elegy esetében volt észlelhető legjobban a lipidek permeabilitásra gyakorolt hatása. [12]

2.6 Gyógyszerhatóanyagok és metabolitjaik szervezeten belüli követésének módszerei

A gyógyszerjelölt vegyületek preklinikai és *in vivo* humán farmakokinetikai vizsgálatait gyakran radioaktívan jelzett vegyületekkel végzik. A legtöbb képalkotó technika lehetőséget nyújt nem-invazív módon a hatóanyagok és a belőlük képződő metabolitok *in vivo* körülmények közötti helytől, időtől és koncentrációtól függő követésére. A preklinikai szakaszban leggyakrabban egerek és patkányok bevonásával tanulmányozzák a kérdéses vegyület felszívódását, szöveti eloszlását, metabolikus folyamatait és kiürülését, a mindenkori etikai elvek és jogszabályok betartása mellett. Az állatmodellek alkalmazáskor és a humán fázisban egyaránt, jellemzően a szájon át (*per os*) és vénába (intravénásan) történő beadást részesítik előnyben a farmakokinetikai vizsgálatok elvégzésekor.

Az egész testre kiterjedő autoradiográfiás módszer célja elsősorban a szöveti eloszlás feltérképezése. Az analizálandó vegyületnek rendelkezésre kell állnia izotópjelzett formában, melyet elterjedten a molekula egy atomjának trícium (^3H) vagy ^{14}C nuklidra történő cseréjével érnek el. Az izotóp jelzés kivitelezésekor, jó néhány szempont figyelembevételével kell kiválasztani a jelzett atomot. Ilyenek lehetnek a molekulán belüli elhelyezkedés, a jelzett molekula radiolízisre való hajlama, izotópcsere lehetősége stb. [22] A beadást követően, adott idő elteltével az állat életét kioltják és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtik, ezután ún. mikrotóm segítségével 20-40 μm vastag metszeteket készítenek belőle, amelyeket liofilizálnak. Fagyasztva szárítást követően készítik el az autoradiogramokat hagyományos röntgenfilmmel vagy digitális autoradiográfiával (DAR), esetleg foszfor imaging technikával (PIT-phosphorous imaging technique). Hagyományos röntgenfilmmel félkvantitatív, míg az utóbbi két eljárással kvantitatív eredmény nyerhető (9. ábra). [23]



9. ábra A felvételeken az egész testre kiterjedő kvantitatív autoradiográfias kísérletek eredménye látható. (A) Ebben az esetben az állatot olyan hatóanyaggal kezelték, amely átjut a vér-agy gáton. (B) A vizsgált vegyület központi idegrendszerbe való bejutása gátolt. A (C) vegyület a megszokottól eltérően a csontcsövekben oszlik meg nagymértékben. [24]

A pozitron emissziós tomográfia (PET) alkalmas a gyógyszervegyületek farmakokinetikájának az autoradiográfias módszertől eltérően emberben történő tanulmányozására, ezen kívül diagnosztikai célokat is szolgál különösen onkológiai területen. A vizsgálati módszer elvi háttere az, hogy léteznek olyan izotópok (pl. ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N), amelyek az elektron anti részecskéjét, azaz pozitront emittálnak bomlásuk során. Ennek az lesz a következménye, hogy a kibocsájtott pozitron rövid időn belül, nagy valószínűséggel fog elektronnal ütközni. Találkozásuk eredményeként, pedig a pozitron-annihiláció jelensége következik be, melynek során az elektron és antirészecskéje egyaránt megsemmisül, eközben a tömegükkel ekvivalens energia fotonként sugárzódik szét a megmaradási törvények figyelembevételével. A fotonok energiája jellemzően 511 keV, ezért ezek γ -fotonoknak felelnek meg, amelyeket szcintillációs detektorral érzékelnek és alakítanak elektromos jellé. A PET technikában alkalmazott detektorok körgyűrű alakban veszik körül a vizsgálatban résztvevő kísérleti állatot vagy embert. A pozitron-annihilációs folyamat jellemzője, hogy két foton egymással szinte tökéletesen 180° -os szöget bezárva hagyja el az esemény helyszínét, így az általuk megtett út egy egyenesre esik, mely az annihiláció helyének megállapításában alapvető szerephez jut. [25]

A nem-ionizáló sugárzáson alapuló mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia segítségével a bejuttatott hatóanyagok szervezeten belüli elhelyezkedésének vizsgálatán túlmenően azok metabolizmusa egyaránt tanulmányozható. [26] Az NMR spektroszkópia arra a természeti tényre támaszkodik, hogy az atommagok egy része mágneses momentummal rendelkezik. NMR aktívak azok a magok, amelyek tömegszáma páratlan (pl. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F), valamint a páros tömegszámú, de páratlan rendszámú magok. [27] A leggyakrabban mért feles spinű magok spin állapotainak degenerált energiaszintjei mágneses térben kétfelé hasadnak. A két energiaszint közötti átmenet rádiófrekvenciával gerjeszthető abban az esetben, ha a szintek energiakülönbsége éppen azonos az elektromágneses tér fotonjának energiájával. [28] Noha az NMR technika érzékenységben és térbeli felbontásban alulmarad a pozitron emissziós tomográfiával szemben, nagy előnyt jelent, hogy különbséget képes tenni az anyavegyület és metabolitjai között. Összességében a PET és az NMR módszerek egymás kiegészítői az *in vivo* farmakokinetikai kutatásokban. [29]

A célszövet extracelluláris teréből történő mintavétel *in vivo* eszközeként gyakran alkalmazott módszer a mikrodialízis, amely elsősorban a vízben jól oldódó anyagok mintázására alkalmas. A mintavételt egy maximálisan 500 μm átmérőjű kanül bevezetésével végzik. Az eszköz két egymásba illesztett csőből áll a külső cső falát porózus membrán alkotja, mely ionok és kismolekulák számára átjárható, de ez a pórusmérettel befolyásolható. A dialízis alatt a kanülben sóoldat áramlik, ami a koncentráció gradiens állandó fenntartása mellett az extracelluláris térből anyagtranszportot indít a kanül felé. [30] Az eszközből kivezetett folyadékot a mérendő vegyület tulajdonságai és az analitikai módszer ismeretében mintaelőkészítésnek vetik alá, ezután meghatározzák a koncentrációját.

3. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, olyan még le nem írt szövet specifikus lipid-oldószer - rendszereken alapuló *in vitro*, nagy áteresztőképességű permeabilitási modell kidolgozását, amely alkalmas lehet a gyógyszerjelölt molekulák felszívódásának / egyes szövetekre vonatkozó eloszlásának előrejelzésére. Ezen elsődleges problémakörön belül részlegesen vizsgálni kívántuk a lipid-oldószer - rendszerek permeabilitásra gyakorolt hatását is, melynek segítségével fel akartuk térképezni, hogy van-e kapcsolat a permeabilitás, illetve a membránretenció és a hatóanyagok fizikai kémiai-paraméterei között. Ennek érdekében az általunk kiválasztott modellvegyületek azonos szerkezeti körbe tartozó tagjain részletesen is kívántuk vizsgálni a molekulaszerkezet, a fizikai-kémiai paraméterek és a P_e , MR között fennálló összefüggéseket.

4. Kísérleti rész

4.1 Felhasznált anyagok

A kísérletekhez szükséges lipideket a koleszterin és a foszfatidilkolin kivételével az Avanti Polar Lipids Inc.-től szereztük be. Az oldószerek közül az n-dodekánt és a dimetil-szulfoxidot a Merck Kft.-től vásároltuk. A kromatográfiás eluensek közül az acetonitril (gradient grade) és a pH beállításhoz szükséges hangyasav a Merck Kft.-től került beszerzésre. A kísérleteinkben alkalmazott vizet a Milli-Q készülék által tisztítotva és 0,45 μm -es pórusméretű szűrőn átbocsájtva nyertük. A gyógyszerhatóanyagokat és minden egyéb vegyszert a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. A pH-7,4-es (25 °C) puffer oldat előállításához 1 dm^3 tisztított vízben oldottunk 1 tasak foszfát puffer (PBS) só keverékét (Sigma-Aldrich Kft.). Az így nyert oldat izotóniás mennyiségben tartalmaz nátrium-kloridot 0,138 mol / dm^3 , illetve kálium-kloridot $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol / dm^3 .

4.2 Felhasznált eszközök

A PAMPA permeabilitás vizsgálatokhoz minden esetben 96-cellás mérőlemezeket (plate) használtunk. A dimetil-szulfoxidos törzsoldatot és a puffer oldatokat polipropilén tálcákon elegyítettük (Agilent Technologies, Denmark). A szűréshez MultiScreen HTS, MSSLBPC10, Merck-Millipore tálcát használtunk. Polikarbonátból készült 0,45 μm -es pórusméretű szűrővel ellátott tálcát (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, Merck-Millipore) és teflon (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR, Merck-Millipore) mérőlemezt alkalmaztunk a donor,

illetve akceptor oldalon. Az oldatok rázatását és inkubálását a Heidolph cég Titramax 1000 készülékével végeztük. A szilárd anyagokat 0,01 mg-os pontosságot biztosító Mettler Toledo analitikai mérlegen mértük be. A folyadékokat kalibrált, egy- és többcsatornás Eppendorf automata pipetták segítségével mértük ki egyszer használatos pipetta hegyekkel. A DMSO-os oldatok és a lipid oldatok elkészítéséhez ultrahangos vízfürdőt használtunk. Az inkubációs idő végére kialakult hatóanyag mennyiségeket nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás készülékkel határoztuk meg, melynek paraméterei alább láthatóak részletesen.

4.3 Kromatográfiás paraméterek

Folyadékkromatográfiás készülék: SHIMADZU Prominence Modular HPLC

Kolonna: Kinetex 2,6 μm XB – C18 100A (30x3 mm)

Eluensek: **A:** 0,1 V/V% vizes hangyasav,

B: 95 V/V% acetonitril, 4,9 V/V% víz, 0,1 V/V% hangyasav

Tümosó folyadék: 1:1 térfogatarányú acetonitril-víz elegy

Gradiens program: 0-0,3 min 0% B; 0,3-1,8 min 0-100% B; 1,8-2,4 min 100% B; 2,41-3,6 min 0% B

Áramlási sebesség: 1,100 cm^3 / min

Kolonna tér hőmérséklete: 45,0 °C

Automata mintaváltó: Nexera SIL-30ACMP Multiplate Autosampler

Injektált térfogat: 6 μl

Detektálás: Diódasoros UV / VIS abszorbancia alapján 200-500 nm (UV_{max})

Vezérlő, kiértékelő szoftver: LabSolutions (SHIMADZU)

Minőségi kiértékelés: Retenciós idő és UV / VIS spektrum alapján

Mennyiségi kiértékelés: Integrált abszorbancia alapján

4.4 PAMPA permeabilitás vizsgálatok kivitelezése

A vizsgált hatóanyagokból minden esetben 10 mM koncentrációjú dimetil-szulfidos törzsoldatot készítettünk egy-egy 1 cm³-es üvegfiolába. A szilárd anyag feloldását ultrahangos fürdővel segítettük, oldódást követően hűtőben 4 °C-on tároltuk a további műveletek elvégzéséig. A permeabilitás vizsgálatok napján a hűtőből kivett fiolák tartalmát ultrahangos fürdőben felolvasztottuk. A 96 cellás polipropilén plate-be 295-295 µl 7,4-es pH-jú puffer oldat részleteket pipettáztunk, amit 5-5 µl 10 mM-os DMSO törzsoldat hozzáadása követett. Mivel egy-egy plate egyszerre 96 vizsgálat elvégzését tesz lehetővé, ezért a három párhuzamos mérés megoldása érdekében egy mérőtálcára összesen 32 vegyület oldatát pipettáztunk. A hígulást figyelembe véve a kiindulási oldatok koncentrációja 167 µM-nak adódott. Az oldatokat egy órán keresztül homogenizáltuk szobahőmérsékleten plate rázó segítségével, majd vákuumban szűrtük. Az adott szövetre (szív, máj, tüdő, vese, agy) jellemző lipid összetételnek megfelelő oldatokat készítettünk. A lipidek mennyiségében az 5. táblázatban megadott információk voltak irányadóak. A bemért lipidekhez jeges-vizes fürdőbe helyezve hozzáadtunk 150 µl n-dodekánt és 450 µl n-hexánt, végül ultrahang segítségével feloldottuk azokat. A lipid oldatokból 5-5 µl-es részleteket adagoltunk a donor lemez szűrőmembránjaira és megvártuk, amíg az oldószer nagy része elpárolog, ekkor minden szűrőmembrán azonos árnyalatú lett. Az akceptor (fogadó) oldali teflon mérőlemezbe 300-300 µl 7,4-es pH-jú puffer oldatot pipettáztunk és belehelyeztük a lipideket tartalmazó donor lemezt. A donor (adó) oldalon lévő lyukakba pipettáztuk a már előkészített hatóanyag oldatok 150 µl-es részleteit. A megmaradt 150 µl-es részleteket kromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá a kiindulási hatóanyag-koncentráció megállapítása érdekében. A donor lemez tetejét benedvesített szűrőpapírral takartuk le, amelyre műanyag fedelet helyeztünk, továbbá az egész rendszert parafilmmel tekertük körbe a párolgási veszteség megakadályozása érdekében. Az összeállított egységet 4 órán keresztül állandó 36 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a donor lemezt kiemeltük az akceptor lemezből és egy-egy polipropilén tálcába 100-100 µl mintát vettünk mindkét lemez összes mérőhelyéről. Az egyes lyukakban kialakult hatóanyagok mennyiségét folyadékkromatográfiás módszerrel, diódasoros detektálással analizáltuk. A HPLC készülék 200-500 nm-es tartományban veszi fel az adott időpillanathoz tartozó teljes spektrumot. A kiértékelést konzekvensen azon a hullámhosszon végeztük, ahol a kérdéses vegyület az előkísérletek alatt nagyobb válaszjelet adott. A permeabilitás és membránvisszatartás meghatározásához a (18) és (19) összefüggéseket használtuk fel.

5. Eredmények és értékelésük

A gyógyszerkutatási folyamatban résztvevő vegyületek nagy száma és egyéb, a bevezetőben említett ok miatt szükséges a fejlesztésben résztvevő molekulákat többféle szempont szerint szűrni, célszerűen már a kutatás korai fázisában. A gyógyszer-molekulák célszövethez történő eljutása soktényezős komplex folyamat. Ebben kulcsszerephez jut a farmakon felszívódása az adagolás helyéről és eloszlása a szervezetben. A gyógyszer-vegyületek szövetekben történő eloszlása, azonban nem egyenletes. A szakirodalomban már beszámoltak a vér-agy gáton keresztül történő eloszlás [20], továbbá a bőrfelszínről [21] és a tápcsatornából [15] való felszívódás mesterséges membránokat alkalmazó *in vitro* körülmények közötti modellezéséről. A szakirodalmi adatokra támaszkodva indokoltnak találtuk, még *in vitro* permeabilitás vizsgálatok szempontjából le nem írt lipid rendszerek tanulmányozását. Ez alapján többféle, az egyes szövetekre (szív, máj, tüdő, vese, agy) jellemző lipid összetételt 2. táblázat vetettünk alá vizsgálatoknak. Azonban nemcsak önmagukban a különböző lipidek összetételeket, hanem azok oldószerül szolgáló szénhidrogének összetételének hatását is vizsgáltuk különböző hatóanyagok permeabilitási sajátságára. A szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy a lipidek oldatba vitelére sokféle oldószer és oldószerkeletet kipróbáltak. Ezek közé tartozik az 1,7-oktadién, illetve 1,6-hexadién, 1,8-nonadién, 1,9-dekadién az n-dodekán és a különböző arányú n-hexán / n-dodekán elegyek. [15,20] Bigogno és mtsai. [15] által első ízben felvetett n-hexán / n-dodekán 1:1 V/V arányú elegy kutatócsoportunkban is kipróbálásra került BBB modellben. Ugyanakkor probléma merült fel az eredmények reprodukálhatóságával kapcsolatban. A két oldószer relatív mennyiségét 25 V/V% n-dodekánra és 75 V/V% n-hexánra változtatva jól reprodukálható eredményekhez jutottak. A vizsgálati rendszerben az n-hexán szerepe, hogy egyrészt javítja a lipidek oldhatósági viszonyát, másrészt a szűrőmembránra cseppentés után elpárolog, így egy viszonylag tömény n-dodekános lipid határréteg marad vissza. Kísérletet tettek arra, hogy az n-dodekánt teljes mértékben n-hexánra cserélik, azonban ilyenkor az egyes vegyületekre vonatkozó permeabilitások irreálisan nagy értéket vesznek fel, így a vegyületek permeabilitása között lecsökkent a különbség, a modell elvesztette a szelektálási sajátságát. Ez alapján célszerűnek láttuk kipróbálni az utóbb említett biner elegy alkalmazását a szövet specifikus lipidek feloldására.

Vizsgálatainkba összesen 64 db (Melléklet 6. táblázat), már forgalomba került gyógyszerhatóanyagot vontunk be. A vegyületek kiválasztási szempontjai között szerepelt, hogy azok jellemző fizikai-kémiai paraméterei minél szélesebb tartományt fedjenek le.

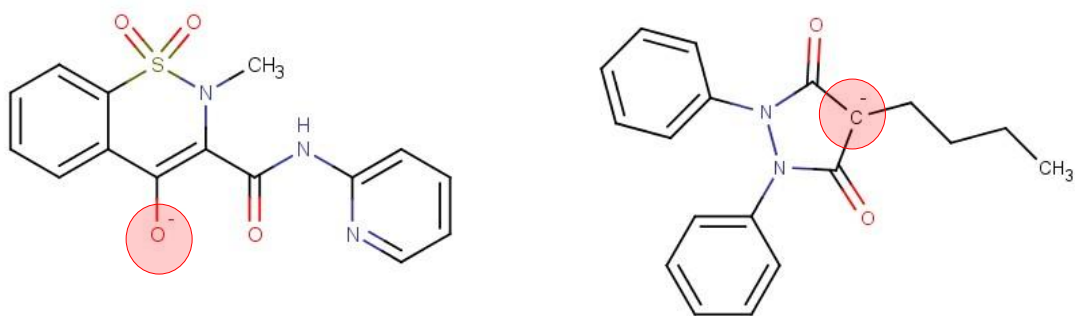
A farmakonok móltömegei 151-823 g / mol között, valódi megoszlási hányadosuk ($\text{clog}P$) - 0,39-5,39 között, $\text{pH} = 7,4$ -re vonatkozó látszólagos megoszlási hányadosuk ($\text{clog}D_{7,4}$) - 1,52-4,15 között, poláris felszínük nagysága (polar surface area, PSA) 6,5-220,2 Å² között változott. A feltüntetett adatok minden esetben számított értéket jelölnek, amelyre indokolt esetben a "c" (calculated) betű hívja fel a figyelmet. A számításokat a ChemAxon Kft. Marvin programcsomagjának segítségével végeztük. Sav-bázis tulajdonságukról elmondható, hogy a tanulmányozott vegyületek 70%-a bázikus, 11%-a savas karakterű, továbbá 15%-uk 7,4-es pH -n nem ionizálható, a fennmaradó 3% amfoter.

5.1 Szövetspecifikus lipid rendszerek összehasonlítása

A vizsgált szöveteket reprezentáló lipid rendszereket rangsoroltuk aszerint, hogy a vizsgált vegyületek adott elemét külön-külön tekintve hogyan változott a permeabilitás az egyes szövetspecifikus membránokban. Legkisebb sorszámot kapta az a lipid membránrendszer, amelyen keresztül legnagyobb permeabilitás volt mérhető és az kapta a legnagyobb sorszámot, amelyiken a legkisebbnek adódott a permeabilitás vegyületenként. Az így nyert sorozatok számtani átlagának kiszámítása után a következő sorrendet állapítottuk meg a szöveti lipideken keresztül megvalósuló permeabilitásokra vonatkozóan: **Agy < Tüdő < Vese < Szív < Máj**. A felállított sorrend a két szélsőértéket figyelembe véve összhangban volt a várt eredményekkel. Hiszen a vizsgált rendszerek közül egyedül a vér-agy gát rendelkezik olyan egyedi struktúrával, amely igen nagy szelektivitást mutat a vegyületekkel szemben. A BBB ezen kiemelt funkciója védi meg a központi idegrendszert számos exogén, de endogén vegyülettel szemben is. A gyógyszerek egy részénél elvárt a vér-agy gáton keresztül való penetráció (barbiturátok, major analgetikumok stb.), viszont sok esetben a mellékhatások forrása éppen abból adódik, hogy olyan vegyületek [31] is bejuthatnak, amelyek nemkívánatosak. Az osztályozás, rangsorolás szempontjából a vizsgált hatóanyagokon **átlagosan a legnagyobb permeabilitási értékeket adó modell a máj specifikus lipidrendszer** volt, megelőzve az összes vizsgált szövetspecifikus rendszert. Az *in vitro* PAMPA rendszerünk által szolgáltatott eredmény összhangban van azzal a ténnyel, hogy elsősorban a májszövet feladata a szervezetbe kerülő exogén molekulák felvétele, enzimatis biotranszformációja. Minden *per os* adagolt készítmény hatóanyag molekuláinak első útja a portális vénán (*vena portae hepatis*) keresztül a májba vezet. A metabolikus folyamatok végbementeléhez, azonban elengedhetetlen a molekulák bejutása a májszövetbe.

5.2 Lipidek és oldószer-rendszerük hatása a permeabilitásra és a membránretencióra

Munkánk következő szakaszában arra kerestük a választ, hogy milyen hatást gyakorol(nak) az oldószer és a lipidek a vegyületek permeabilitására és membránretenciójára. Az egyes vegyületekre kapott adatok áttekintése után megállapítottuk, hogy a lipidmentes, tisztán oldószert (n-dodekán és elhanyagolhatóan kis mennyiségű n-hexánt) tartalmazó kontroll vizsgálat esetében is számottevő permeabilitás (P_e) és membránretenció (MR) mérhető. A mért permeabilitási értékeket konvenció alapján három csoportba osztottuk. Alacsony permeabilitásúnak tekintettük adott körülmények között a $10 \cdot 10^{-6}$ cm/s-nál kisebb, közepesnek a $10\text{--}20 \cdot 10^{-6}$ cm/s közötti és nagy permeabilitásúnak a $20 \cdot 10^{-6}$ cm / s feletti értékkel jellemezhető vegyületeket. Első közelítésben a terápiás terület és a sav-bázis tulajdonság oldaláról tekintve a vegyületeket elmondható, hogy a vizsgálatunkba bevont valamennyi nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyület (NSAID) alacsony permeabilitással rendelkezett a lipidet nem tartalmazó rendszerben. Ennek oka elsődlegesen az lehet, hogy szöveti pH-n minden vizsgált NSAID ionizált állapotba került. A szulindak, naproxen, indometacin, diflunizál és a diklofenák szabad karboxil csoportot tartalmazó vegyületek, pK_a értékeik 2,69 és 4,19 között változnak. A piroxikám 4,76-os pK_a értékéért a molekula enol típusú hidroxil csoportja felelős. A fenilbutazon egy pirazolidin 3,5-dion származék, ebből kifolyólag a 4-es C-atomon lévő H-atom szomszédságában kettő oxocsoport található (10.)

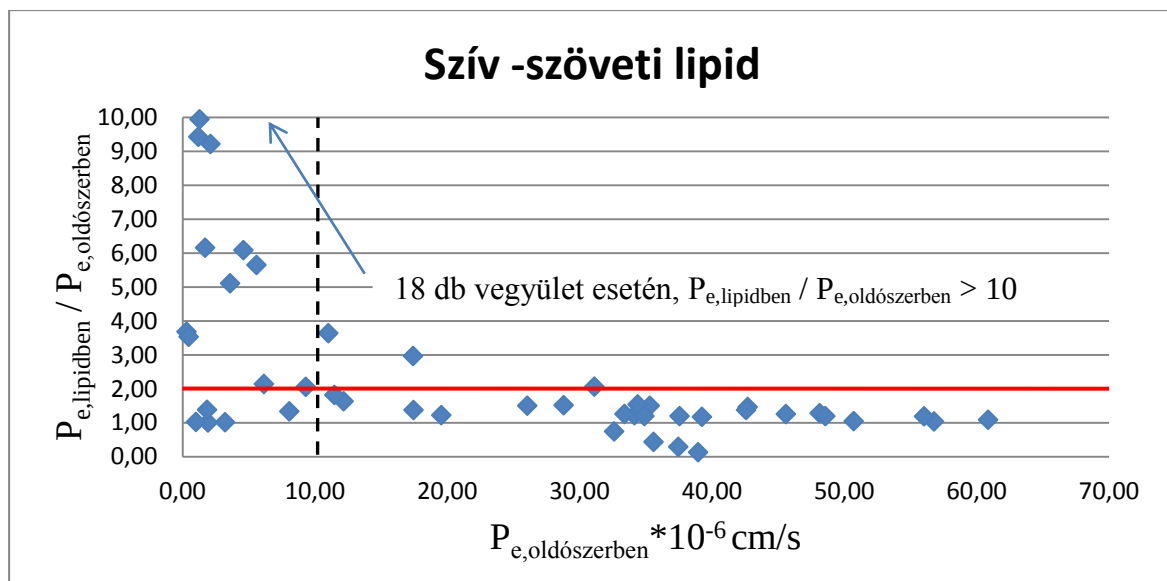


10. ábra Piroxikám (bal) és fenilbutazon (jobb) szöveti pH-n legnagyobb mennyiségben jelenlévő molekuláris formái. Piros karikák a pH = 7,4-es értéken deprotonálódott atomokat / atomcsoportokat jelöli.

Az oxocsoportok elektronszívó hatása következtében a molekula C-H savas vegyületként viselkedik ($pK_a=5,13$). Összességében az említett vegyületek savas karaktere összemérhető az alifás karbonsavakéval. Szöveti pH-n a NSAID-ok apoláris rétegen keresztül történő membrántranszportja gátolt. Ezen felül megfigyelhető, hogy a tiszta oldószer jelenlétében

kapott alacsony permeabilitás értékekhez képest a fenilbutazon és a szulindak kivételével minden esetben jelentősen nagyobb permeabilitás értékek voltak mérhetőek a máj szöveti lipid rendszeren keresztül. A diklofenak 50X-szer, a fenilbutazon 2,5X-szer, az indometacin 40X-szer, a naproxen 76X-szor, a piroxikám 17X-szer és a szulindák 7X-szer gyorsabban penetrál a máj szöveti lipid membránon, mint a tiszta oldószert tartalmazón. A fenilbutazon pH=7,4-es értéken értelmezett látszólagos megoszlási hányadosa ($\text{clog}D_{7,4}=2,26$) több mint 10X-szer nagyobb a diklofenakénál ($\text{clog}D_{7,4}=1,11$), amely magyarázhatja a kisebb mértékű P_e növekedés okát. A fenilbutazon viszonylag nagy $\text{clog}D_{7,4}$ értéke alapján az is érthetővé válik, hogy miért nagyobb egy nagyságrenddel a tiszta oldószert tartalmazó membránban mért P_e -a a többi NSAID-hoz viszonyítva.

Annak érdekében, hogy az oldószert hatást elkülönítsük a lipidek specifikus effektusától, vegyületenként vizsgáltuk az egyes szöveti lipideket és a kizárólag oldószert tartalmazó membrán esetében mért permeabilitás, illetve membránretenció közti különbségeket. Elöljáróban megállapítható, hogy a nagy P_e és MR értékek esetében nem specifikus a szöveti lipidek hatása, ugyanis ekkor kis különbséget tapasztaltunk a lipid melletti és lipid-mentes membránokkal mért adatok között. A kis és közepes P_e és MR adatok esetében kaptuk a legnagyobb különbségeket, ami a lipidek számottevő hatására enged következtetni. Folytatva vizsgálódásainkat kíváncsiak voltunk, hogy melyek azok a vegyületek, amik egy-egy szöveti lipid-rendszerben specifikus permeabilitást vagy membránretenciót mutatnak. Ennek megállapítására egyrészt ábráztuk szövetenként a lipidet tartalmazó és lipid nélküli kontroll esetben mért értékek hányadosát a lipidet nem tartalmazó mérési eredmények függvényében. Másrészt kijelöltük azt a határt, amely alapján egy vegyületet az adott szöveti lipid rendszerre specifikusnak tekintünk. A 1. diagramon a szív szövetének megfelelő lipid összetételű membránnal kapott eredmények láthatók a permeabilitásra vonatkozóan. A diagramokon nem ábráztuk (viszont számításba vettük) a tíz feletti hányadossal rendelkező adatokat, mert nagymértékben rontanák a megjelenítés felbontását.



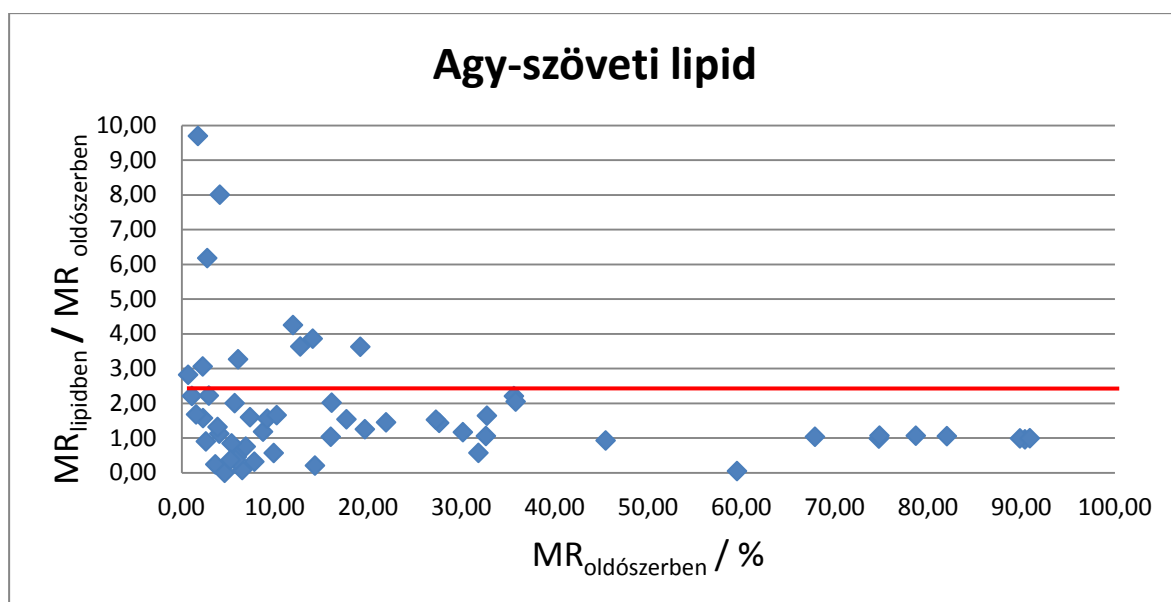
1. diagram Szív szöveti lipid és lipid mentes membránon keresztül mért permeabilitások hányadosa a lipid nélkül kapott permeabilitás értékek függvényében. A piros egyenes jelöli a tiszta oldószeret tartalmazó membránhoz képest megmutatkozó specificitást

A határokat minden szöveti lipid esetében azonos helyre húztuk meg. Abban az esetben tekintettük specifikusnak a lipidek hatását, amikor a lipidet tartalmazó rendszerben mért permeabilitás, illetve membránretenció legalább kétszer akkora volt, mint a tiszta oldószerben mért érték. A diagramon jól látható, hogy a tiszta oldószeres membránon mért jellemzően 10^{-5} cm/s-os értékeknél kisebb permeabilitásokhoz tartozó adatpont tartomány vertikális irányban kiszélesedik. Az abszcisszán a nagy permeabilitások felé haladva egyre nagyobb mértékben a hatóanyag molekula és az oldószer molekulák között kialakuló kölcsönhatások lesznek meghatározók. A 3. táblázatban tüntettük fel szöveti lipidenként azokat a vegyületeket, amelyek a tisztán oldószeres membránhoz képest legalább kétszer nagyobb permeabilitással rendelkeztek. A vastagon szedett vegyületek minden szöveti lipidben kiemelkedő permeabilitással rendelkeztek a lipidet nem tartalmazó membránokhoz képest. Ezekről elmondható, hogy móltömegük széles tartományban változik (198-823 g/mol). A szöveti környezetre jellemző, azaz pH 7,4-en értelmezett $\text{clog}D$ értékük nem haladja meg a hármat, viszont negatív számértéket is felvehet ($\text{clog}D = -0,96$, primakvin). Poláris felszínük közepes jellemzően $60 \text{ \AA}^2$ -nél nagyobb értéket vesz fel, kivételt képez a szertralin ($12,03 \text{ \AA}^2$ értékkel). A $\text{clog}P$ értékek az elemzésbe bevont vegyületek 85%-ánál ($n=15$) az 1,28-2,99-es tartományban mozogtak, vagyis a *per os* felszívódás szempontjából ideális lipofilitású hatóanyagok kerültek ide. Átlag értékük 2,31-nak adódott a 15 vegyület figyelembevételével.

3. táblázat A tisztán oldószert tartalmazó membránon keresztül mért permeabilitás értékeknél legalább kétszer nagyobb permeabilitást mutató vegyületek, szöveti lipidenként részletezve. A vastagon szedett vegyületek minden vizsgált lipid rendszerben kiemelkedő permeabilitással rendelkeztek.

$P_{e,\text{lipidben}} / P_{e,\text{oldószerben}}$				
Szív	Máj	Tüdő	Vese	Agy
amlodipin	amlodipin	amlodipin	amlodipin	amlodipin
atropin	atropin	karbamazepin	atropin	atropin
benzokain	benzokain	dexametazon	karbamazepin	karbamazepin
karbamazepin	karbamazepin	diklofenák	dexametazon	dexametazon
dexametazon	dexametazon	dizopiramid	diflunizál	diflunizál
diflunizál	diflunizál	domperidon	diklofenák	dizopiramid
diklofenák	diklofenák	fenitoin	dizopiramid	domperidon
dizopiramid	dizopiramid	hidrokortizon	domperidon	fenitoin
domperidon	domperidon	indometacin	fenitoin	hidrokortizon
fenilbutazon	fenilbutazon	indoramin	fenobarbitál	indometacin
fenitoin	fenitoin	kinin	hidrokortizon	indoramin
fenobarbitál	fenobarbitál	lomefloxacin	indometacin	kinin
gemfibrozil	gemfibrozil	metoprolol	indoramin	metoprolol
hidrokortizon	hidrokortizon	naproxen	kinin	naproxen
indometacin	indometacin	naringenin	lomefloxacin	naringenin
indoramin	indoramin	oxazepam	metoprolol	oxazepam
kinin	kinin	primakvin	naproxen	primakvin
lomefloxacin	lidokain	propranolol	naringenin	propranolol
metoprolol	lomefloxacin	rifampicin	oxazepam	rifampicin
naproxen	metoprolol	szilibinin	primakvin	szilibinin
naringenin	nadolol	szertralin	propranolol	szertralin
oxazepam	naproxen	takrin	rifampicin	takrin
piroxikám	naringenin	zileuton	szilibinin	zileuton
primakvin	oxazepam		szertralin	
propranolol	piroxikám		takrin	
rifampicin	primakvin		zileuton	
szilibinin	prokain			
szertralin	propranolol			
szulindák	rifampicin			
takrin	szilibinin			
tioridazin	szertralin			
zileuton	szulindák			
	takrin			
	tioridazin			
	zileuton			

A fenti megfontolások alapján adtuk meg a 4. táblázatot és szerkesztettük meg a membránretencióra értelmezett diagramokat is. Az ábrák közül itt csak az agyszövetre jellemző lipid összetétel esetében nyert adatokat (2. diagram) mutatom be.



2. diagram Agy szövetre specifikus lipid esetében számított lipidet tartalmazó, illetve tiszta oldószer rendszerben mért membránretenció értékek hányadosa a tiszta oldószerben mért membránretenció értékek függvényében.

4. táblázat A tiszta oldószer tartalmazó membránban mért MR értékeknél legalább kétszer nagyobb membránretenciót mutató vegyületek, szöveti lipidenként részletezve. A vastagon szedett vegyületek minden vizsgált lipid rendszerben kiemelkedő membránretenciót mutattak.

MR _{lipidben} / MR _{oldószerben}				
Szív	Máj	Tüdő	Vese	Agy
amlodipin	amlodipin	amlodipin	amlodipin	amlodipin
astemizol	astemizol	astemizol	astemizol	astemizol
desipramin	desipramin	carbamazepin	desipramin	carbamazepin
dexametazon	dexametazon	desipramin	dexametazon	desipramin
domperidon	dibukain	dexametazon	domperidon	dexametazon
enalapril	diltiazem	dibukain	fenobarbitál	dibukain
fluoxetin	domperidon	diltiazem	fluoxetin	diltiazem
haloperidol	enalapril	domperidon	gemfibrozil	domperidon
hidrokortizon	fluoxetin	fluoxetin	haloperidol	enalapril
kinin	haloperidol	haloperidol	indoramin	fenobarbitál
lomefloxacin	hidrokortizon	indoramin	kinin	fluoxetin
maprotiline	indoramin	kinin	maprotiline	haloperidol
nadolol	kinin	maprotiline	metoprolol	kinin
paracetamol	maprotiline	metoprolol	piroxicam	maprotiline
prokain	naringenin	nadolol	primaquine	nadolol
propranolol	oxazepam	naringenin	prokain	naringenin
quinacrine	paracetamol	perfenazin	propranolol	perfenazin
rifampicin	perfenazin	piroxicam	rifampicin	piroxicam
silibinin	primaquine	prokain	silibinin	prokain
takrin	prokain	propranolol	takrin	propranolol
tiloron	propranolol	rifampicin	zileuton	rifampicin
	quinacrine	tiloron		takrin
	rifampicin			tiloron
	takrin			
	tiloron			
	zimelidin			

Az öt vizsgált szöveti lipidben egyaránt kiemelkedően nagy membránretenciót mutató vegyületek fizikai-kémiai paraméterei széles tartományt fednek le. Molekulatömegük (236-459 g/mol) értékek között egyenletesen oszlik el. Szöveti pH-n értelmezett $\text{clog}D_{\text{pH}7,4}$ értékeik az amlodipin kivételével ($\text{clog}D_{\text{pH}7,4}=-0,37$) pozitív tartományban egyenletes eloszlásban helyezkednek el, ez igaz $\text{clog}P$ értékeikre is. A PSA adataikról elmondható, hogy ezek a vegyületek jórészt a közepes és nagy poláris felületű anyagokból kerülnek ki. A tiszta oldószer-rendszerhez képest legalább kétszer nagyobb permeabilitás és membránretenciós értékekkel rendelkező vegyületeket bemutató táblázatokban a vastagon szedett hatóanyagok minőségét összehasonlítva megállapítható, hogy az amlodipin kivételével egyetlen vegyület sem szerepel mindkét helyen. Egy-egy vegyületet tekintve nem fedezhető fel egyértelmű korreláció a permeabilitás és membránretenciós értékek között, ez mutatja a két paraméter ortogonálisitását.

5.3 Összefüggések a membránretenció és a fizikai-kémiai paraméterek között

A tüdő szöveti lipid esetében kapott membránretenciós eredményeket nagyság szerint sorba rendezve észrevehető, hogy az 50%-os MR elérésig folytonosan változnak az értékek, azonban ezt követően nagy ugrás tapasztalható. A 70% feletti membránretencióval jellemezhető progeszteron az első tagja a nagy MR-val rendelkező tíz vegyületet tartalmazó csoportnak. Megvizsgáltuk, hogy található-e összefüggés az ide tartozó vegyületek fizikai-kémiai paraméterei között. A fizikai-kémiai adatokat áttekintve az volt valószínűsíthető, hogy a tüdő szöveti lipidben nagy MR-t mutató vegyületek közös jellemzői közé tartozik a $30 \text{ \AA}^2$ alatti poláris felszín, és a $\text{clog}D > 2,40$, $\text{clog}P > 3,65$, továbbá móltömegük $264\text{-}408 \text{ g/mol}$ tartományba esik. Ezen felül elmondható a vegyületekről, hogy viszonylag erős bázisok ($\text{cp}K_a > 6,9$). Az elméletet úgy kívántuk bizonyítani, hogy a fent megállapított határok figyelembevételével a teljes vizsgált vegyülethalmazt szűrtük egyenként ezekre a feltételekre. A továbbiakban azokat a vegyületek fizikai-kémiai sajátosságait elemeztük, amik ezen feltételek által definiált szűrőkön átjutottak. Az így kiválogatott anyagokat klaszterekbe soroltuk be olyan módon, hogy a felsorolt követelmények közül mennyi teljesül rájuk, tehát a vegyületcsoportok száma éppen azonosnak adódott a követelmények számával. A legszigorúbb szűréseken átment vegyületeket, voltaképpen azokat, amelyek mind az öt feltételt teljesítik, összevetettük az eredeti 70%-nál nagyobb tüdő szöveti lipidre vonatkozó membránretenciót mutató vegyületekkel. Ezen kívül a szív, máj, vese, agy szöveti lipidrendszerére kapott membránretenciós értékek esetében is a tüdő szöveti lipiddel

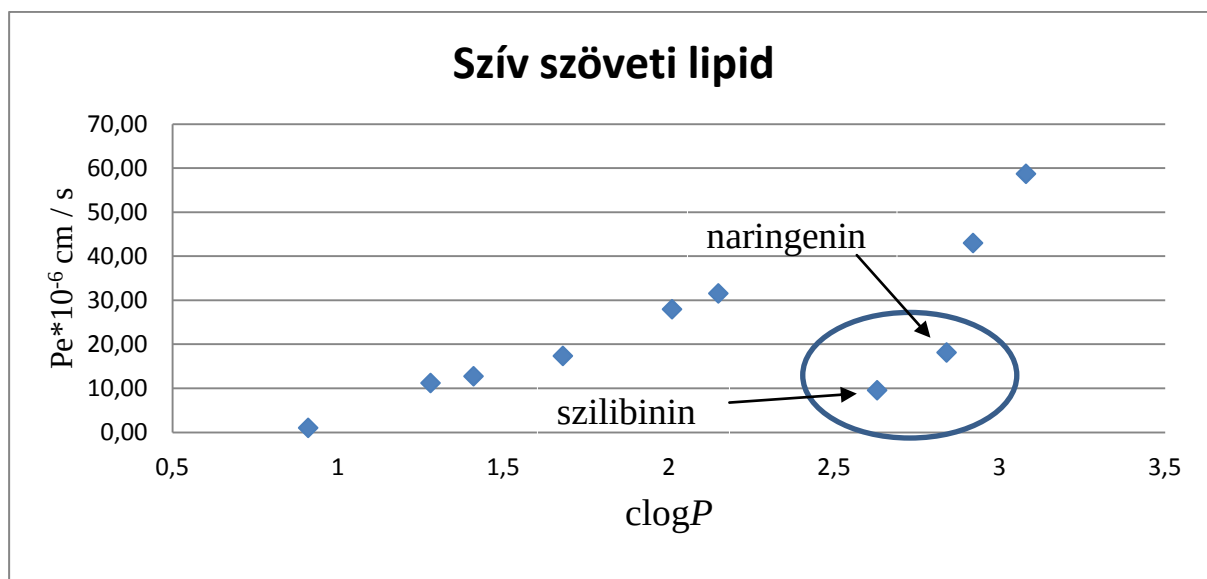
meghatározott legalább 70%-os visszatartás jelölte ki a nagy MR-jú vegyületek körét. Az ilyen tulajdonsággal rendelkező anyagokat szövetenként az 5. táblázatban találhatjuk. Vastagon szedtük azon hatóanyagok neveit, amelyek teljesítik az összes megadott fizikai-kémiai feltételt, sőt a perfenazin (vese lipidben MR = 67%) kivételével minden egyes szöveti lipidben MR értékeik legalább elérik a 70%-ot. Kiemelendő az asztemizol, amelyet ugyan nem jelez a modellünk, mint várható nagy membránretenciójú vegyület, ennek ellenére mindegyik lipidrendszerben MR-értéke elérte 70%-ot. A fizikai-kémiai jellemzőit összehasonlítva a fent megállapított feltételekkel, elmondható, hogy a poláris felszíne ($42 \text{ \AA}^2$) és a moláris tömege (459 g / mol), meghaladja a feltételekben rögzítetteket. A progeszteront ugyancsak nem jelzi a fizikai-kémiai paramétereken alapuló modellünk, miközben minden szöveti lipidben eléri legalább a 70%-ot az MR értéke. Ebből arra lehet következtetni, hogy a nagy membránretenciója nem szorosan a fizikai-kémiai paramétereitől függ, vélhetően molekulaszervezeti okai vannak.

5. táblázat A legalább 70%-os membránretenciót elérő vegyületek szövetenként részletezve.

Öt feltétel igaz	MR $\geq$ 70%				
	Tüdő	Agy	Vese	Szív	Máj
imipramin	<i>asztemizol</i>	<i>asztemizol</i>	<i>asztemizol</i>	<i>asztemizol</i>	<i>asztemizol</i>
klomipramin	<i>haloperidol</i>	domperidon	<i>haloperidol</i>	klomipramin	<i>haloperidol</i>
klórpromazin	klomipramin	<i>haloperidol</i>	klomipramin	klórpromazin	klomipramin
mianszerin	klórpromazin	klomipramin	klórpromazin	kvinakrin	klórpromazin
szertralin	mianszerin	klórpromazin	mianszerin	mianszerin	mianszerin
tioridazin	perfenazin	mianszerin	szertralin	perfenazin	perfenazin
trimipramin	progeszteron	perfenazin	tioridazin	szertralin	progeszteron
perfenazin	szertralin	progeszteron	trimipramin	tioridazin	szertralin
	tioridazin	szertralin	progeszteron,	trifluoperazin	tioridazin
	trimipramin	tioridazin		trimipramin	trifluoperazin
		trimipramin		progeszteron	trimipramin

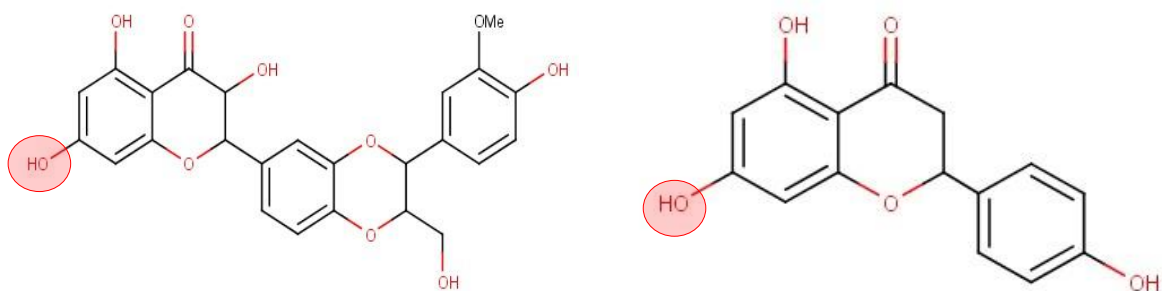
5.4 P_e és $\text{clog}P$ kapcsolata a vegyületek sav-bázis tulajdonságának szemszögéből

Az általunk vizsgált vegyületek 70%-a bázikus, 11%-a savas, 3%-a amfoter a fennmaradó hányad (16%) a fiziológiás pH 7,4-en nem ionizálható. Megvizsgáltuk sav-bázis jellemzők alapján alkotott vegyületcsoportok szerint, hogy fennáll-e bármilyen kapcsolat a mért P_e és a számított $\text{clog}P$ értékek között. A 3. diagramon a pH = 7,4-es értéken nem ionizálható hatóanyagok szív szöveti lipidben mért permeabilitás értékei láthatók a $\text{clog}P$ függvényében.



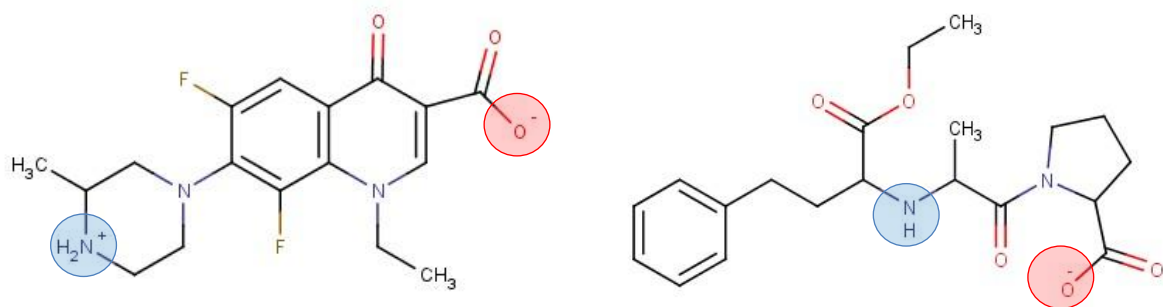
3. diagram P_e a $\text{clog}P$ függvényében, szöveti pH-n nem ionizálható vegyületekre a szív szöveti lipid esetében

A szív szöveti lipid esetében kapott P_e – $\text{clog}P$ összefüggés (3. diagram) rámutat, hogy a növekvő lipofilitással együtt trendszerűen növekszik a lipid membránon keresztül megvalósuló anyagtranszport sebessége (P_e) is. Ez az állítás minden lipidet tartalmazó membránrendszerre egyaránt igaz volt. A 3. diagramon bekarikázott két anyag láthatóan elkülönül a többi vegyülettől. A szilibinin (11. ábra) a *Silybum marianum* vagy máriatövis növény magjában található flavonoidok egyike.[6] Számított legkisebb savi $\text{cp}K_a$ értéke 7,81, azaz a molekulák jelentős része (mintegy 70%-a) neutrális formában van jelen szöveti pH-n, azonban ugyanezen körülmények között az egyszeresen deprotonált részecskék mennyisége meghaladja a 23%-ot. A naringenin (11. ábra) egy citrus flavonoid legerősebb savas csoportjára vonatkozó $\text{cp}K_a$ értéke 7,91, 74%-ban neutrális és több mint 23%-ban az egyszeresen negatív töltésű forma jelenik meg a szöveti pH körülményei között. A szilibinin és naringenin $\text{cp}K_a$ értékei csekély mértékben haladják meg a szöveti pH-t, így a gyenge savakra jellemző tulajdonságaik is dominálhatnak a penetrációs folyamat során.



11. ábra Szilibinin (bal) és naringenin (jobb), a legerősebb savi csoportokat piros karikák jelölik.

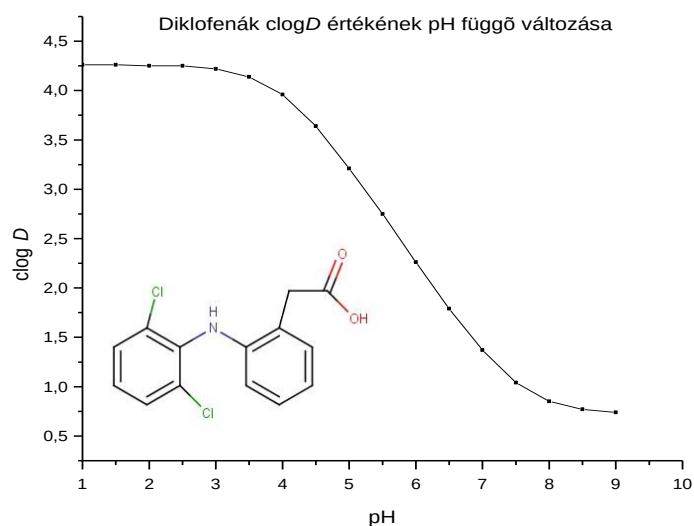
A tiszta oldószert tartalmazó membrán esetében a mérési eredmények azt mutatták, hogy a különböző $\text{clog}P$ értékektől függetlenül az alacsony permeabilitású ($P_e < 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm / s}$) kategóriába sorolhatók a szöveti pH-n neutrális vegyületek. A diloxanid permeabilitása viszont váratlanul nagy értéknek adódott, melynek okát a fizikai-kémiai paraméterek nem magyarázzák. A bázisok és savak esetén, ilyen vagy ehhez hasonló törvényszerűségek nem állapíthatók meg. A vizsgált két amfoter vegyület közül a lomefloxacin ikerionos, tehát makroszkópiusan neutrális molekuláris formában (94%), míg az enalapril egyszerűen negatív (99%) töltésű részecskeként van jelen a szöveti pH7,4-en. Az enalapril tiszta oldószert határrétegen keresztüli penetrációja egy nagyságrenddel nagyobb, mint a lomefloxaciné. Az ugyanezen körülmények között mérhető MR értékeik között éppen fordított viszony van. Az enalapril membránretenciója elhanyagolhatóan kismértékű a lomefloxacinéhoz képest. Igaz ugyan, hogy a töltött enalapril molekulák bejutása a lipid membránba nem kedvezményezett, ami az MR adatokon is visszatükröződik, a lomefloxacinál egy nagyságrenddel nagyobb $\text{clog}P$ értéke segíti ezt a folyamatot. Ugyanakkor a donor és akceptor oldalon fennálló koncentráció és térfogati különbség miatt a már határrétegbe került részecskék a fogadó oldal felé távoznak. A lomefloxacin szöveti pH-n való nagyarányú semleges formában való jelenléte magyarázza az enalaprilhoz képest szignifikánsan nagyobb membránretenciót.



12. ábra Lomefloxacin (bal) és enalapril (jobb) szövetin pH-n legnagyobb mennyiségben jelenlévő molekulaformái. A piros és kék karikák jelölik a savi, illetve bázikus protondiszociálós csoportokat

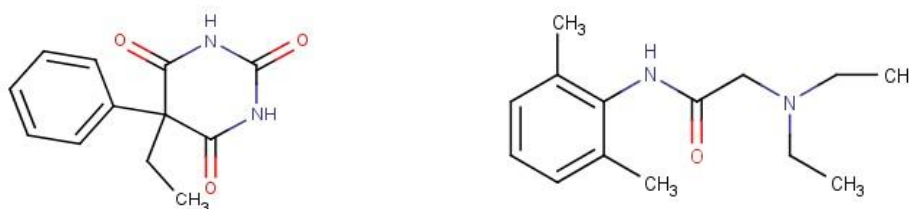
5.5 Fizikai-kémiai jellemzés *in vivo* szempontjai a diklofenak, fenobarbitál és lidokain példáján keresztül

A diklofenak a nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) csoportjába tartozó arilecetsav származék, ami az aceklofenak aktív metabolitja. [6] Hatását a ciklooxygenáz (COX) izoenzimek (COX-1, COX-2) gátlásán keresztül fejt ki, melyek a prosztanoidok bioszintézisében jutnak szerephez. A COX-1 enzim normál körülmények között is jelen van a sejtekben és főleg a gyomor / bélnyálkahártya védelméért felelős. A COX-2 izoenzim a gyulladásos folyamatokat is szabályozó citokinek által indukálható. [32] A COX-2 fokozott jelenléte gyulladás kialakulásához vezet, többek között a prosztaglandin E₂ (PGE₂) szintézise révén. [33] A diklofenak gyenge savas karaktere miatt lipofilitása a pH csökkenésével növekszik, melyet a *clogD*-pH görbe lefutása is alátámaszt. (13. ábra) Ez teszi lehetővé, hogy az egészséges szöveteknél alacsonyabb pH-jú gyulladt szövetekben csekély mértékben felhalmozódjon. [34] Szöveti pH 7,4-en a diklofenak molekulák közel 100%-ban ionizált formában vannak jelen, így a relatív nagy negatív töltésű vér-agy gáton való átjutása gátolt a vegyületnek, ami megfelel az általunk mért minimális $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s –os permeabilitás alapján várt eredménynek. A legnagyobb permeabilitást ($32 \cdot 10^{-6}$ cm/s) a máj szöveti lipidben kaptuk, amely összhangban van azzal, hogy a legkevésbé negatív karakterű lipid rendszer a májban található.



13. ábra Diklofenák látszólagos megoszlási hányadosának pH függése

A fenobarbitál(5-etil-5-fenil-barbitursav) központi idegrendszeri (CNS) hatású vegyület. Hipnotikus (altató), antikonvulzáns (görcs-gátló) és hosszú hatástartamú nyugtató hatással egyaránt rendelkezik. [35] A barbiturátok a γ -aminovajsav (GABA) endogén vegyületről elnevezett GABA_A receptorokon fejtik ki hatásukat. Növelik a klorid csatornák nyitott állapotának időtartamát, ezáltal fokozzák a GABA hatását, ami gátló effektus kialakulásával jár együtt. A barbitursav 5-ös C-atomján található szubsztituensek (alkil,aril) egyfelől szükségesek a szedato-hipnotikus hatás kiváltásához, másrésztől segítségükkel a vér-agy gáton keresztül történő penetrációs készség is hangolható. [6] A szövet / plazma megoszlási hányados (Kp) információt szolgáltat a hatóanyagok szövetekben és vérplazmában található relatív mennyiségéről. A Kp meghatározási módszerek kísérletes vagy manapság egyre népszerűbb számításos elveken alapulnak és a passzív diffúzióval végbemenő transzport-mechanizmust tekintik kiindulópontnak. [36] A fenobarbitálhoz rendelkezésre álló adatokat összevetettük a mért permeabilitás értékekkel. A szövetenként ismert Kp értékek nagyság szerint a következő sorrendben követik egymást: Máj>Szív>Tüdő>Vese>Agy, amely sorrend megfelel az általunk mért permeabilitás értékek sorrendjének. A PAMPA módszer kizárólag passzív diffúzió modellezésére alkalmas, továbbá a Kp adatok megállapítása is ezen a transzport mechanizmuson alapul. Ezek alapján feltételezhető, hogy a fenobarbitál szerkezetbeli eloszlásában a passzív diffúzió kizárólagos szerephez jut.



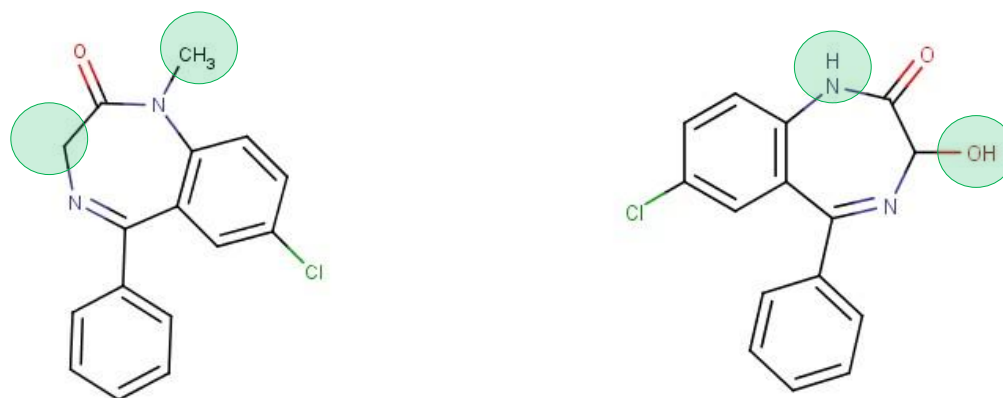
14. ábra Fenobarbitál (bal), lidokain (jobb)

A lidokain a savamid-típusú helyi érzéstelenítők jellemző képviselője. Hatását a nátriumcsatornák ionáramainak gátlásán keresztül fejt ki. A gátolt ionmozgás kezdetben az ingerületvezetés lassulásához és az akciós potenciál amplitúdójának csökkenéséhez vezet, végül az idegrost nem lesz képes akciós potenciál létrehozására. Molekulaszerkezete négy részre tagolódik, úgymint lipofil aromás csoport, savamid csoport, összekötőlánc és hidrofíl amin csoport. Patkányokon végzett *in vivo* kísérletek igazolták [37], hogy a *per os* adagolt lidokain rendkívül gyorsan szívódik fel és oszlik meg a szövetekben. 30 perc után a kezdeti lidokain mennyiség 17%-a volt jelen a gasztrointesztinális traktusban. Ez összhangban van az

általunk mért nagy (szív-, tüdő-, vese-, agy szöveti lipid $62 - 69 \cdot 10^{-6}$ cm/s, máj szöveti lipid $111 \cdot 10^{-6}$ cm/s) permeabilitás értékekkel. A gyors szöveti eloszlás még inkább hangsúlyos volt az intravénás adagolás esetében, amikor a beadást követően a kezdeti mennyiség mindössze 2%-a volt mérhető 5 perc elteltével. Az *in vitro* és *in vivo* adatok összehasonlíthatóságát ennek ellenére nagymértékben rontja a vegyület fokozott metabolizmusa. Ugyanis a gyakran alkalmazott radiojelzett vegyületek aktivitás mérésén alapuló módszerekkel sajnálatos módon nem különböztethetők meg az anyavegyület és a biotranszformáción átesett vegyület molekulái. A metabolizmus mellett a kiürülés sebességét, módját sem lehetséges figyelembe venni a PAMPA módszerrel. Noha a felszívódás és eloszlás *in vitro* körülmények közötti előrejelzésére alkalmas lehet a mesterséges membránokon alapuló modellrendszer a teljes farmakokinetikai profil leírását nem teszi lehetővé.

5.6 Fizikai-kémiai paraméterek molekulaszervezeti összefüggései

A diazepam és az oxazepam a benzodiazepinek családjába tartozó anxiolitikumok. A diazepam ezen kívül görcsoldó tulajdonsággal is rendelkezik. Hatásukat a barbiturátokhoz hasonlóan fejtik ki, de külön kötőhelyen a GABA_A receptorokon. Fokozzák a γ -aminovajsav hatását, jelenlétükben nő a klorid-ion csatorna nyitási frekvenciája. [6] A diazepam esetében kapott mérési eredményeink a permeabilitások és membránretenciók tekintetében szisztematikusan nagyobbak bizonyultak, mint az oxazepamnál mérték. A két molekula szerkezetét (15. ábra) összehasonlítva megállapítható, hogy egy metil és egy hidroxil csoportban térnek el egymástól.

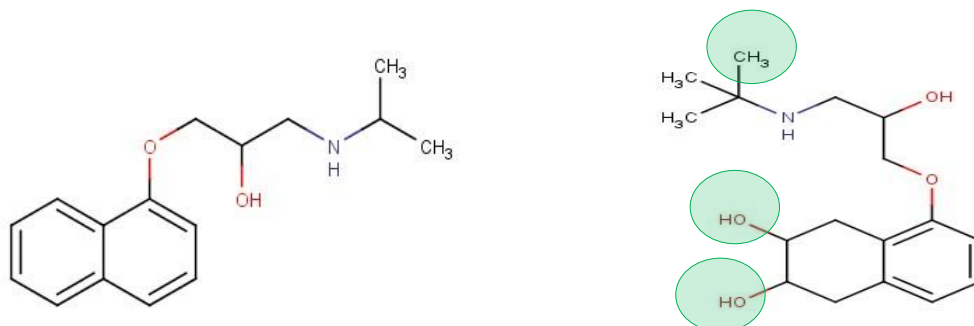


15. ábra Diazepam (bal) és oxazepam (jobb) molekulaszervezeti összehasonlítása. Zöld karikák jelölik a molekulák közti eltéréseket

Fizikai-kémiai paramétereiket összehasonlítva a legszembetűnőbb különbség a $\log P$ és a PSA adatokban látható. A trendek megállapítására és az áttekintő következtetések levonására alkalmas becsült fizikai-kémiai paraméterek mellett, egyedi esetek vizsgálatakor célszerű a kísérleti és prediktált értékeket is összevetni, ha ehhez rendelkezésre állnak adatok. A diazepam kísérletileg meghatározott $\log P$ értéke **2,82** (DrugBank, SANGSTER 1994) és számított $\text{clog}P$ értékei 2,63 (DrugBank, ALOGPS), illetve 3,08 (Marvin, ChemAxon Kft.). Az oxazepam $\log P$ értéke **2,24** (DrugBank, HANSCH,C et al. 1995, $\text{clog}P$ 2,01 (DrugBank, ALOGPS) és 2,92 (Marvin, ChemAxon Kft.). Elmondható, hogy összességében a kísérletileg meghatározott adatokat jobban közelíti az ALOGPS módszer. Az összehasonlításhoz a kísérletileg meghatározott értékeket használtam fel. A diazepam PSA értéke $32,67 \text{ \AA}^2$ az oxazepamé ennek közel kétszerese, $61,69 \text{ \AA}^2$. A metil csoport H-atomra és az 1,4-diazepin gyűrűben a H-atom hidroxil csoport csere, jelentős változásokat okoz a fizikai-kémiai paraméterekben. A tiszta oldószert tartalmazó rendszerben mért permeabilitás érték diazepam esetében $46 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, illetve az oxazepamot tekintve 10^{-6} cm/s -nak adódott. A több mint 45X-ös penetrációs sebesség különbség összhangban van a két vegyületeltérő lipofilitás értékeivel. A diazepam esetében hozzáférhető *in vivo* adat [38] a vegyület kvalitatív emberi szervezeten belüli eloszlási mintázata. A korábban diazepam kezeléssel átesett betegek szöveteiben *post mortem* megállapították a diazepam mennyiségét. Az eredmények azt mutatták, hogy nagyobb mennyiségben volt jelen a diazepam a szív, máj és vese szövetekben és kisebb mennyiségben a tüdő és az agy szövetekben. A diazepamra kapott permeabilitási eredmények nagyság szerinti sorrendje a következőképpen alakult szív>máj>vese>tüdő>agy. Ez megfelel az *in vivo* esetben meghatározott értékek relatív helyzetének.

A propranolol és nadolol két nem-szelektív β -receptor blokkoló. Hatásukat kompetitív antagonizmus révén fejtik ki, az endogén ligand kötőhelyét foglalják el a receptorokon. Fő indikációs területük a magas vérnyomás kezelése. [6] A propranolol és nadolol szerkezete a 16. ábrán látható. Szerkezeti képletük alapján megállapítható, hogy a nadolol egyik naftalin gyűrűje telített és *orto* helyzetben két hidroxil csoport kapcsolódik hozzá. A naftalin gyűrű telítettsége ugyan növeli a hidroxil csoportok pK_a -ját, a telítetlen származékhoz képest azonban ez szöveti pH 7,4-en nem releváns ($\text{cp}K_a$ nadolol = 14,22 és 15,23 a gyűrűn található hidroxil csoportokra vonatkoztatva). A propranolol amino csoportja izopropil csoporttal szubsztituált, míg a nadolol N-atomja *terc*-butil csoporttal. A nadolol $\text{clog}D_{7,4}$ értéke -1,44, míg a propranolol ugyanezen adata 0,36. Ezt összehasonlítva az oldhatósági adatokkal, ami nadolol esetében 8330 mg/dm^3 25 °C-on (DrugBank, MCFARLAND,JW et al. 2001) és

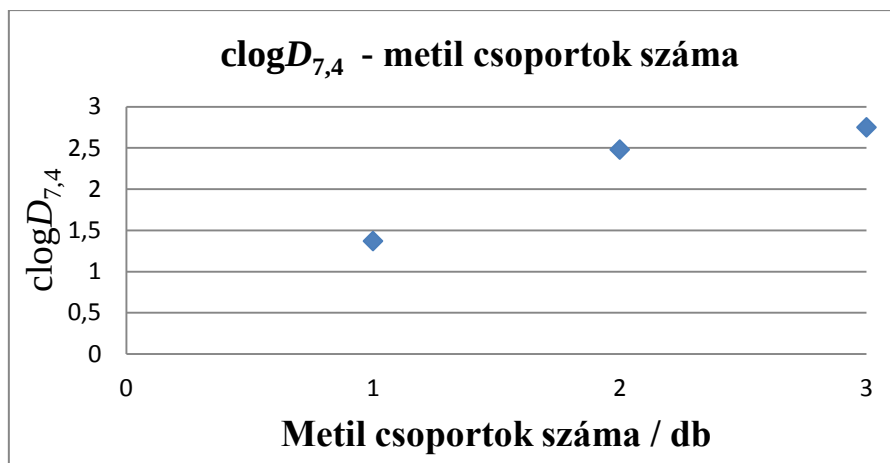
propranolol esetében $61,7 \text{ mg/dm}^3$ (DrugBank, MCFARLAND, JW et al. 2001) látható, hogy jelentős lipofilitási és oldhatósági különbség van a két molekula között.



16. ábra Propranolol (bal) és nadolol (jobb) molekulaszervezeti összehasonlítása. Zöld karikák jelölik a molekulák közti főbb eltéréseket.

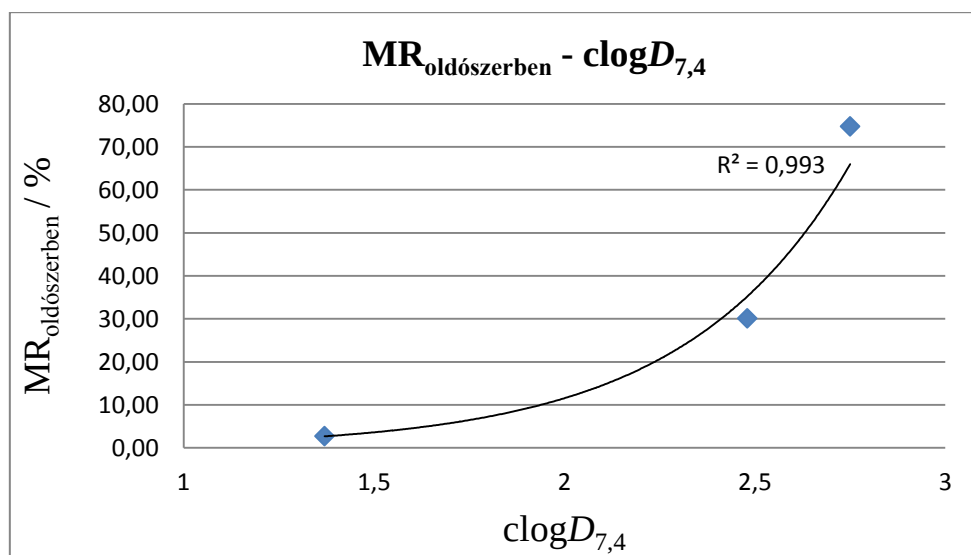
A nadolol poláris felszíne, mintegy kétszerese a propranolol PSA értékének. A propranolol tiszta oldószerben mért permeabilitása hatszorosa a nadolol esetében mértnek. A propranolol ugyan gyorsabban penetrál a tiszta oldószert tartalmazó membránon keresztül, azonban a növekedés nem jelentős, amit a viszonylag kicsi $\text{clog}D_{7,4}$ értéke magyarázhat. Az agy szöveti lipiden keresztül mért permeabilitás értékeket összevetettük a szakirodalomban [39] fellelhető adatokkal. A szakirodalom szerint a propranolol átjut a vér-agy gáton, így bekerülhet a központi idegrendszerbe, míg a nadolol nem. Az általunk mért permeabilitás értékek (agy szövetre specifikus lipid-rendszerben) szerint a nadolol a kis permeabilitású ($2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$), míg a propranolol ($23 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$) a nagy permeabilitású kategóriába sorolható, amely megegyezik a szakirodalom alapján vártakkal.

Az imipramin, dezipramin, trimipramin és klomipramin a triciklusos első generációs antidepresszánsok közé tartozó pszichofarmakonok. Hatásukat a monoamin-transzporterek gátlásán keresztül fejtik ki, így a szinapszisokban megnő a szerotonin és noradrenalin szintje. [6] Szerkezeti képletük a 17. ábrán látható. A dezipramin az imipramin amino csoporton demetilezett aktív metabolitja. A trimipramin abban különbözik az imipramintól, hogy alifás oldalláncához metil csoport kapcsolódik. A klomipraminban az egyik aromás gyűrűhöz klóratom kapcsolódik. Legnagyobb lipofilitással ($\text{clog}D_{7,4} = 4,88$) a klomipramin rendelkezik, mely egyértelműen a halogénatom jelenlétének tudható be, ezzel összefüggésben a klomipramin oldhatósága is egyben a legrosszabb (DrugBank). A dezipramin kiemelkedő (a négy vizsgált vegyület közül) oldhatósága $58,6 \text{ mg/dm}^3$ (DrugBank, YALKOWSKY, et al. 1992) együtt jár viszonylag kis, szöveti pH7,4-es közeghez tartozó $\text{clog}D$ értékével (1,37). Látható (4. diagram.), hogy az ebbe a szerkezeti körbe tartozó molekulák különböző részein a növekvő metil-csoportok számával lassuló ütemben, trend-szerűen növekszik $\text{clog}D$ értékük.



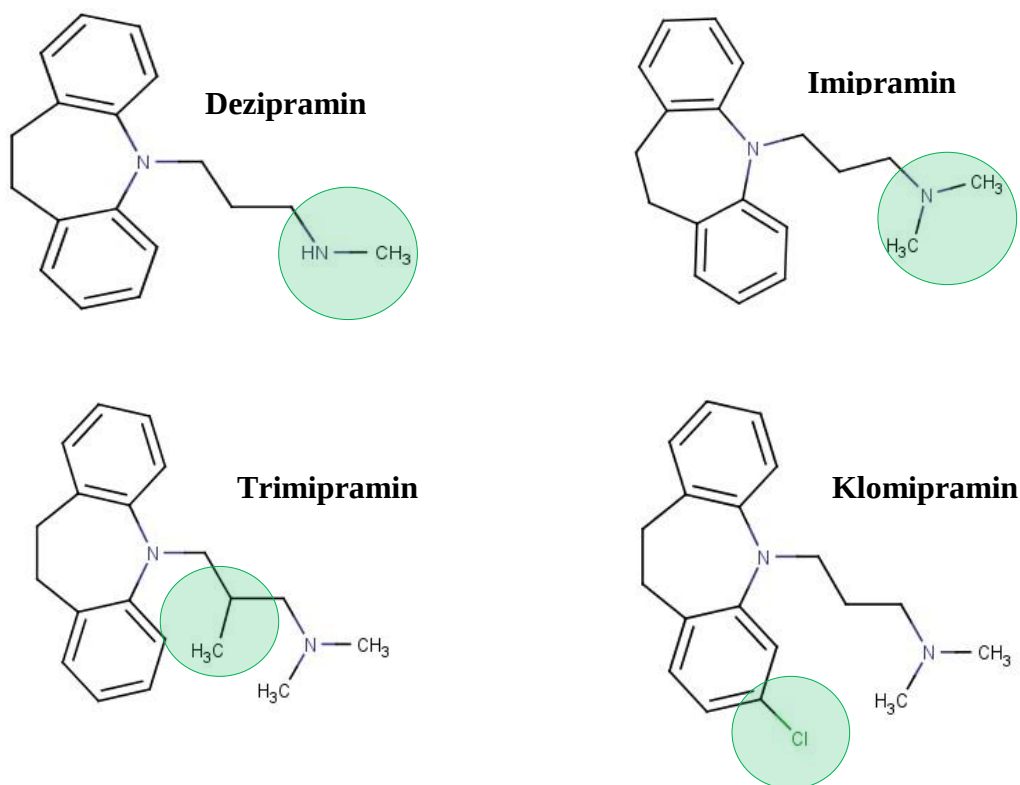
4. diagram A szöveti pH-n értelmezett $\log D$ értékek a metil csoportok számának függvényében, a dezipramin, imipramin és trimipramin esetében.

A dezipramin, imipramin és trimipramin $\log D_{7,4}$ értékeit összevetve a mért membránretenciós adatokkal, a $\log D_{7,4}$ értékek növekedésével meredeken növekszik a membránvisszatartás a tiszta oldószert tartalmazó membránban. A növekedés üteme exponenciális görbe-illesztéssel jól közelíthető (5. diagram) ($R^2 = 0,993$), ami az alkil csoportok és az oldószer molekulák között kialakuló diszperziós kölcsönhatások erősödésével magyarázható.



5. diagram Oldószer membránban mért membránretenció a $\log D_{7,4}$ függvényében a dezipramin, imipramin és trimipramin esetében.

A fenti eredmények tükrében a metilcsoportok számának közvetlenül a membránretencióra gyakorolt hatása, a halogén szubsztituenst nem tartalmazó (dezipramin, imipramin, trimipramin) vegyületek esetében lineárisan ($R^2 = 0,981$, $n = 3$) nő a metil csoportok számának emelkedésével. Ezen túlmenően érdemes említést tenni a dezipramin esetében az alifás láncon elhelyezkedő amino csoport egyik metil szubsztituensének hiányáról. A sztérikus effektusoknak köszönhetően a N-atom poláris felszín emeléséhez való hozzájárulása az imipramin (PSA=15,27) esetében kifejezettebb, mint a többi itt vizsgált (PSA=6,48) molekulánál.



17. ábra Dezipramin, imipramin, trimipramin és klomipramin molekula szerkezeti összehasonlítása. A zöld karikák az egymástól való eltérések centrumát jelölik.

6. Összefoglalás

A gyógyszerhatóanyagok komplex folyamatok révén jutnak el a hatás kifejtés helyére. A transzport sikerességét a biológiai membránok és a hatóanyag tulajdonságai jelentősen befolyásolják. Munkánk során új szövet specifikus *in vitro* modellrendszer segítségével kívántuk vizsgálni a farmakonok fizikai-kémiai tulajdonságain és a szöveti lipid rendszereken keresztül megvalósuló penetrációs készség között fennálló összefüggéseket. Megállapítottuk, hogy a máj szövetre specifikus lipid-rendszeren keresztül a hatóanyagok penetrációja a legnagyobb, míg az agy szöveti lipid-rendszeren keresztül a legkisebb, ez összhangban van a máj és a vér-agy gát exogén molekulákkal szemben mutatott viselkedésével. Eredményeink rámutattak, hogy a membránalkotó lipidek permeabilitásra (P_e) és membránretencióra (MR) gyakorolt hatása a kis és közepes permeabilitású hatóanyagok esetén a legnagyobb. A nagy (70%) feletti membránretenciót mutató vegyületek szisztematikus vizsgálata alapján definiáltuk a fizikai-kémiai paraméterek azon tartományait, amelyek felelősek a kiemelkedő membránvisszatartásért. Eredményeink alapján a $\log P$ permeabilitásra gyakorolt hatása kizárólag a szöveti pH-n nem-ionizálódó és az amfoter vegyületek esetén számottevő. Vizsgáltuk az azonos szerkezeti körökbe tartozó benzodiazepinek és béta blokkolók kettő-kettő, illetve az első generációs triciklusos antidepresszánsok négy képviselőjén keresztül a fizikai-kémiai jellemzők és a molekula szerkezeti hasonlóságok/eltérések között fennálló összefüggéseket. A molekula szerkezeti és a fizikai-kémiai sajátságok elemzésének eredményei igazolták a farmakokinetikai megközelítés által vezérelt molekuláris szintű hatóanyag tervezés központi szerepét a korai fázisú gyógyszerkutatásban.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Balogh György Tibornak**, aki lehetőséget biztosított a Richter Gedeon Nyrt-ben működő Szintézistámogató Laboratórium kutatómunkájába való bekapcsolódásra. Köszönöm, hogy értékes szakmai tanácsain és iránymutatásain keresztül első kézből gyűjthettem tapasztalatokat a gyógyszerkutatás területéről. Hálával tartozom **Müller Juditnak**, akinek révén betekintést nyerhettem az *in vitro* vizsgálatok kivitelezésébe és köszönöm a dolgozat elkészítésében nyújtott önzetlen segítségét. Köszönettel tartozom **Dr. Hell Zoltánnak** a belső konzulensi feladatok ellátásáért.

8. Melléklet

6. táblázat Vizsgált hatóanyagok terápiás területete és előrejelzett fizikai-kémiai paramétereit Mw-móltömeg, Ca csat. blokk.-kalcium-csatorna blokkoló, Na csat. blokk.-nátrium-csatorna blokkoló, SSRI-selective serotonine reuptake inhibitor – szelektív szerotonin visszavétel gátló, ACE gátló – angiotenzin-konvertáz enzim gátló, fekete betűvel jelölt hatóanyagok - bázis, piros betűvel jelölt hatóanyagok – sav, zöld betűvel jelölt hatóanyag – szöveti pH-n nem ionizálható, lila betűvel jelölt hatóanyag - amfoter

	Név	Terápiás terület	Mw	clogD _{7,4}	clogP	cpK _a sav	cpK _a bázis	PSA
1.	amlodipin	Ca csat. blokk.	408,9	-0,37	1,64		9,45	99,9
2.	asztemizol	antihisztamin	458,6	3,97	5,39		8,75	42,3
3.	atropin	paraszimpatolitikum	289,4	-0,41	1,57		9,39	49,8
4.	benzokain	Na csat. blokk.	165,2	1,5	1,5		2,78	52,3
5.	bupivakain	Na csat. blokk.	288,4	3,82	4,52	13,62	8	32,3
6.	bupropion	antidepresszáns	239,7	2,39	3,27		8,22	29,1
7.	buspiron	anxiolitikum	385,5	1,35	1,78		7,62	69,6
8.	karbamazepin	antiepileptikum	238,3	2,96	2,96	15,96	-3,51	46,3
9.	klórpromazin	neuroleptikum	318,9	2,74	4,54		9,2	6,5
10.	dezipramin	antidepresszáns	266,4	1,37	3,9		10,02	15,3
11.	diazepam	anxiolitikum	284,7	3,08	3,08		2,92	32,7
12.	dibukain	Na csat. blokk.	343,5	2,05	3,7		9,04	54,5
13.	diltiazem	Ca csat. blokk.	414,5	1,89	2,73	12,86	8,18	59,1
14.	dizopiramid	antiaritmiás	339,5	0,57	3,47		10,42	59,2
15.	domperidon	antiemetikum	425,9	2,75	2,9	12,52	7,03	67,9
16.	fluoxetin	SSRI	309,3	1,83	4,17		9,8	21,3
17.	haloperidol	neuroleptikum	375,9	2,93	3,66	13,96	8,05	40,5
18.	imipramin	antidepresszáns	280,4	2,48	4,28		9,2	6,5
19.	indoramin	alfa receptor blokk.	347,5	1,58	3,19		9	48,1
20.	kinin	protozon ellenes	324,4	0,86	2,51	13,89	9,05	45,6
21.	klomipramin	antidepresszáns	314,9	3,09	4,88		9,2	6,5
22.	lidokain	Na csat. blokk.	234,3	2,33	2,84	13,78	7,75	32,3
23.	maprotiline	antidepresszáns	277,4	1,48	4,37		10,54	12,0
24.	metapirilén	antihisztamin	261,4	1,73	3,11		8,76	19,4
25.	metaprotene-rol	béta blokk.	211,3	-0,94	0,21	8,84	9,7	72,7
26.	metoprolol	béta blokk.	267,4	-0,47	1,76		9,67	50,7
27.	mianszerin	alfa2 receptor gátló	264,4	3,71	3,83		6,92	6,5
28.	nadolol	béta blokk.	309,4	-1,44	0,87	13,59	9,76	82,0
29.	papaverin	Ca csat. blokk.	339,4	3,06	3,08		6,03	49,8
30.	perfenazin	neuroleptikum	404,0	2,82	3,69		8,21	30,0
31.	piroxikam	NSAID	331,4	-1,52	0,6	4,76	3,79	99,6
32.	primakvin	malária ellenes	259,4	-0,96	1,64		10,2	60,2
33.	prokain	Na csat. Blokk.	236,3	0,31	1,88		8,96	55,6
34.	propranolol	béta blokk.	259,3	0,36	2,58		9,67	41,5
35.	kvinakrin	protozon ellenes	400,0	1,39	5,15		10,33	37,4
36.	rifampicin	TBC ellenes	822,9	2,76	2,77	6,9	7,53	220
37.	szertralin	SSRI	306,2	2,76	5,15		9,85	12,0
38.	takrin	demenciát lassítja	198,3	1,25	2,63		8,95	38,9

39	tiloron	interferon serkentő	410,6	1,84	4,26		8,89	42,0
40	tioridazin	neuroleptikum	372,6	2,63	4,47		9,25	6,5
41	trifluoperazin	neuroleptikum	407,5	3,63	4,66		8,39	9,7
42	trimipramin	antidepresszáns	294,4	2,75	4,76		9,42	6,5
43	verapamil	Ca csat. blokk.	454,6	2,79	5,04		9,68	64,0
44	zimelidin	SSRI	317,2	2,27	3,51		8,62	16,1
45	diflunizal	analgetikum	250,2	0,41	3,91	2,69		57,5
46	diklofenak	NSAID	295,1	1,1	4,26	4		52,2
50	fenilbutazon	NSAID	308,4	2,26	4,14	5,13		40,6
47.	gemfibrozil	hiperlipidémia ellenes	250,3	1,51	4,39	4,42		46,5
48	indometacin	NSAID	357,8	0,27	3,53	3,8		68,5
51	naproxen	NSAID	230,3	-0,05	2,99	4,19		46,5
49	szulindak	NSAID	356,4	-0,18	2,93	4,09		54,4
52	dexametazon	szteroid gyull. Csök.	392,5	1,68	1,68	12,42	-3,33	94,8
53	diloxanid	protozon ellenes	328,2	3,08	3,08	13,09	-4,66	59,8
54	fenitoin	antiepileptikum	252,3	2,14	2,15	9,47	-9,05	58,2
55	fenobarbitál	szedatohipnotikum	232,2	1,33	1,41	8,14		75,3
56	hidrokortizon	gyulladáscsökkentő	362,5	1,28	1,28	12,58	-2,85	94,8
57	progeszteron	hormon	314,5	4,15	4,15	18,92	-4,82	34,1
58	naringenin	flavonoid	272,3	2,72	2,84	7,91	-3,86	87,0
59	oxazepam	anxiolitikum	286,7	2,92	2,92	10,61	-1,47	61,7
60	paracetamol	analgetikum	151,2	0,9	0,91	9,46	-4,36	49,3
61	szilibinin	flavonoid	482,4	2,49	2,63	7,81	-2,99	155
62	zileuton	leukotrién inhibitor	236,3	1,99	2,01	8,84	-5,49	66,6
63	enalapril	ACE gátló	376,5	-1,06	0,59	3,67	5,2	95,9
64	lomefloxacin	gíráz gátló	351,4	-0,39	-0,39	5,64	8,7	72,9

7. táblázat Szív-, máj-,tüdő-,vese-,agy-szöveti lipid-oldószer-rendszerben mért permeabilitás értékek. $Pe \cdot 10^{-6}$ cm/s, $SD \leq 1,00$

							Oldószer
	Név	Szív Pe	Máj Pe	Tüdő Pe	Vese Pe	Agy Pe	Pe
1.	amlodipin	28	37	15	22	13	5
2.	asztemizol	24		20	23	13	33
3.	atropin	10	18	2	5	6	2
4.	benzokain	64	75	37	50	34	31
5.	bupivakain	62	61	55	53	50	48
6.	bupropion	63	69	44	46	39	43
7.	buspiron	58	60	53	48	44	49
8.	karbamazepin	32	40	17	16	11	2
9.	klórpromazin	11	21	20	25	10	37
10.	dezipramin	44	46	37	37	36	29
11.	diazepam	57	55	46	52	46	46
12.	dibukain	59	65	62	57	60	57
13.	diltiazem	53	50	43	47	47	35
14.	dizopiramid	19	17	5	10	6	2
15.	domperidon	36	36	21	18	4	1
16.	fluoxetin	53	55	45	43	41	51
17.	haloperidol		55	47	31	44	
18.	imipramin	46	47	42	46	44	39
19.	indoramin	34	38	8	23	15	0
20.	kinin	41	44	15	24	26	2
21.	kломipramin	5	29	36	17	11	39
22.	lidokain	67	111	66	69	62	56
23.	maprotiline	42	45	36	39	35	34
24.	metapirilén	66	68	57	54	53	61
25.	metaprotenerol	2	2	2	2	2	2
26.	metoprolol	23	28	2	10	8	1
27.	mianszerin	39	27	36	30	23	26
28.	nadolol	3	8	2	2	2	2
29.	papaverin	20	24	20	20	18	12
30.	perfenazin	45	34	14	37	38	38
31.	piroxikam	11	16	1	1	1	1
32.	primakvin	19	22	5	6	6	1
33.	prokain	11	20	3	11	5	8
34.	propranolol	40	45	24	30	23	11
35.	kvinakrin	21	21	11	11	11	11
36.	rifampicin	17	15	8	7	5	0
37.	szertralin	18	15	21	19	13	4
38.	takrin	18	25	1	3	7	0
39.	tiloron	16	35	40	39	11	36
40.	tioridazin	13	20	11	12	7	6
41.	trifluoperazin	24	30			18	20
42.	trimipramin	24	27	19	24	12	17

43.	verapamil	42	48	39	42	31	33
44.	zimelidin	42	45	38	37	39	35
45.	diflunizal	12	17	0	2	1	0
46.	diklofenak	24	32	4	13	1	1
50.	fenilbutazon	19	23	8	9	10	9
47.	gemfibrozil	52	59	26	1	17	17
48.	indometacin	17	25	3	7	3	1
51.	naproxen	2	3	0	0	0	0
49.	szulindak	11	19	1	1	1	0
52.	dexametazon	17	28	8	10	8	1
53.	diloxanid	59	65	50	44	43	43
54.	fenitoin	32	45	17	16	13	6
55.	fenobarbitál	13	20	1	6	1	1
56.	hidrokortizon	11	20	4	4	3	1
57.	progeszteron	53	66	22		28	15
58.	naringenin	18	26	13	11	9	1
59.	oxazepam	43	46	29	28	26	1
60.	paracetamol	1	2	1	1	1	1
61.	szilibinin	10	14	3	4	2	0
62.	zileuton	28	42	20	27	18	0
63.	enalapril	3	3	3	3	3	3
64.	lomefloxacin	1	2	2	4	0	0

8. táblázat Szív-,máj-,tüdő-,vese-,agy-szöveti lipid-oldószer-rendszerben mért membránretenció (MR%) értékek.
SD≤0,10

Név	Szív MR	Máj MR	Tüdő MR	Vese MR	Agy MR	Oldószer MR
1. amlodipin	56	63	37	49	54	14
2. asztemizol	84	100	82	90	79	36
3. atropin	7	2	6	4	5	4
4. benzokain	51	45	47	48	42	45
5. bupivakain	15	16	19	19	17	16
6. bupropion	32	35	39	38	40	28
7. buspiron	18	26	25	31	27	18
8. karbamazepin	0	0	2	0	2	1
9. klórpromazin	95	95	90	92	87	90
10. dezipramin	16	29	15	16	17	3
11. diazepam	20	27	35	26	25	20
12. dibukain	30	40	32	31	32	16
13. diltiazem	11	15	12	11	11	6
14. dizopiramid	0	5	17	18	6	10
15. domperidon	44	62	40	57	73	5
16. fluoxetin	55	69	39	57	51	12
17. haloperidol	41	70	75	78	69	19
18. imipramin	39	45	38	37	35	30
19. indoramin	6	17	15	26	1	6
20. kinin	28	37	22	35	33	4
21. klomipramin	89	88	83	86	84	79
22. lidokain	0	5	5	7	3	6
23. maprotiline	54	60	31	45	46	13
24. metapirilén	25	33	26	34	32	22
25. metaprotenerol	7	7	1	0	0	5
26. metoprolol	0	0	16	15	4	2
27. mianszerin	76	81	77	78	74	75
28. nadolol	1	0	2	0	5	0
29. papaverin	33	40	34	35	35	33
30. perfenazin	71	85	79	67	73	36
31. piroxikam	1	0	4	3	2	1
32. primakvin	16	24	16	23	14	9
33. prokain	33	33	24	36	10	0
34. propranolol	5	12	5	2	1	0
35. kvinakrin	71	69	48	61	54	33
36. rifampicin	13	29	27	29	20	6
37. szertralin	89	91	78	86	87	82
38. takrin	15	17	0	42	17	2
39. tiloron	31	5	1	0	38	0
40. tioridazin	95	95	91	94	89	90
41. trifluoperazin	93	94			91	91
42. trimipramin	86	86	84	83	80	75

43.	verapamil	35	46	36	43	42	27
44.	zimelidin	20	25	16	17	17	10
45.	diflunizal	3	6	3	6	4	6
46.	diklofenak	2	4	3	7	10	9
50.	fenilbutazon	1	1	5	2	3	8
47.	gemfibrozil	8	5	0	31	5	7
48.	indometacin	4	0	5	4	5	4
51.	naproxen	0	0	2	2	3	2
49.	szulindak	9	1	4	5	3	14
52.	dexametazon	2	4	12	6	8	0
53.	diloxanid	22	24	31	26	18	32
54.	fenitoin	0	9	2	4	3	60
55.	fenobarbitál	0	0	4	9	7	2
56.	hidrokortizon	11	15	10	9	5	5
57.	progeszteron	67	74	73		70	68
58.	naringenin	3	6	8	3	6	3
59.	oxazepam	10	20	12	0	12	7
60.	paracetamol	5	11	0	0	2	3
61.	szilibinin	15	0	6	12	2	6
62.	zileuton	5	10	5	11	2	5
63.	enalapril	0	1	0	0	1	0
64.	lomefloxacin	8	5	0	0	1	4

9. Irodalomjegyzék

- [1] Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay, Kiyohiko Sugano et al., Int. J. Pharm, 2001, 228(1-2):181-188
- [2] Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization, Edward H. Kerns and Li Di, Elsevier, 2008, 48-55
- [3] Absorption and drug development, Solubility, permeability, and charge state, Alex Avdeef, pION, Inc., 2003, 42-66,
- [4] Módszerek fejlesztése vízben rosszul oldódó vegyületek fizikai-kémiai paramétereinek (pK_a , $\log P$) meghatározására a gyógyszerkutatás korai fázisában, Doktori (Ph.D.) értekezés, Völgyi Gergely, SE, Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Budapest, 2007
- [5] A gyógyszerkutatás kémiája, Keserű György Miklós szerk., Akadémiai Kiadó, Budapest, 2011, 332-360
- [6] Gyógyszerészi kémia, Fülöp Ferenc, Noszál Béla, Szász György, Takácsné Novák Krisztina, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010, 131-636
- [7] Advances in pharmacology, vol 4, Silvio Garattini & Parkhurst A. Shore, Academic Press Inc., New York, 1966
- [8] Gyógyszerészi kémia II. Gyakorlati praktikum, Kuzma Mónika, Lóránd Tamás, Rozmer Zsuzsanna, Perjési Pál, PTE, Pécs, 2014
- [9] A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai, Dévay Attila, Antal István, Medicina, Budapest, 2009
- [10] Chasing equilibrium: Measuring the intrinsic solubility of weak acids and bases, Stuart M et al., Anal. Chem., 2005, 77 (4), pp 983–990
- [11] Onkofarmakológia, Jeney András, Kralovánszky Judit, Medicina, Budapest, 2005
- [12] Evaluation of in vitro brain penetration: Optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison, Simon Carrara et al., Int. J. Pharm, 2007, 10;345(1-2):125-33
- [13] Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, Manfred Kansy et al., J. Med. Chem, 1998, 41, 1007-1010
- [14] High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkene/water $\log P$ with artificial membranes, Faller B. et al., J. Med. Chem., 2001, 44, 923-930
- [15] High throughput prediction of oral absorption: Improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay, Kiyohiko Sugano et al., J. Biom. Scr., 2001, 6(3):189-96
- [16] A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential, Chengyue Zhu, Eur. J. Med. Chem, 2002, 37(5):399-407.
- [17] pH-gradient PAMPA-based *in vitro* model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery, György T. Balogh et al., Pharm. Sci., 2013, 49(1):81-89
- [18] Chemistry of the steroids, Charles W. Shoppee, Butterworths Scientific Publications, London, 1958
- [19] Élettani alapismeretek, Cseri Julianna, DE, 2011, 2. fejezet
- [20] High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier, Li Di et al., Eur. J. Med. Chem, 2003, 38(3):223-32.
- [21] Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration, Sinko B. et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2012, 45(5):698-707

- [22] A gyógyszerek szervezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei, Kalász Huba, Lengyel József, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006
- [23] Humán gyógyszerfejlesztés, Molekulatervezéstől a terápiáig, Dinya Elek szerk., Medicina, Budapest, 2006
- [24] Quantitative whole-body autoradiography, LC-MS/MS and MALDI for drug-distribution studies in biological samples: the ultimate matrix trilogy, Andrew B. McEwen et al., *Bioanalysis*, 2014, 6(3):377-91
- [25] Modern fizikai laboratórium, Egyetemi tananyag, Koltai János, ELTE, 2013, 92-108
- [26] Tumor trapping of 5-fluoruracil: *In vivo* ^{19}F NMR spectroscopic pharmacokinetics in tumor-bearing humans and rabbits, Walter Wolf et al., *Proc. Nat. Acad. Sci*, 1991, 87(1): 492–496.
- [27] Szerves kémia, Furka Árpád, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 1998, 47-53
- [28] Fizikai kémia II., Szerkesztet, P.W. Atkins, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 1998, 536-564
- [29] Tumor, normal tissue, and plasma pharmacokinetic studies of fluoruracil biomodulation with N-phosphonacetyl-L-aspartate, folinic acid and interferon alfa, Robert J. A. Harte et al., *American Society of Clin. Oncol.*, 1999, vol. 17 no. 5 1580
- [30] A kénmustár bőrfelszínről történő penetrációjának vizsgálata *in vivo* mikrodialízis segítségével, Doktori (Ph.D.) értekezés, Karvaly Gellért Balázs, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, Budapest, 2008
- [31] Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin, Parerally J M. et al., *Pharm. Res.*, 2006, 23(5):873-81
- [32] Pharmacology, Rang and Dale's, sixth edition, Elsevier, 2007, 16. Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs
- [33] Multifaceted roles of PGE_2 in inflammation and cancer, Review, Masako Nakanishi et al., *Semin. Immunopathol.*, 2012, 35(2):123-37
- [34] Preferential uptake of non steroid anti-inflammatory drug diclofenac into inflamed tissues after a single oral dose in rats, A Schweitzer et al., *BMC Pharm.*, 2009, 10.1186/1471-2210-9-5
- [35] Psychotropic drugs and related compounds, second edition, Earl Usdin, U.S. Government Printing Office, 1972
- [36] Development of a decision tree to classify the most accurate tissue-specific tissue to plasma partition coefficient algorithm for a given compound, Yejin Esther Yun et al., *J. Pharmacokin. Pharmacodyn.*, 2014, 10.1007/s10928-013-9342-0
- [37] The tissue distribution, metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dogs and man Keenaghan, J.B., Boyes, R.N., *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1972, 180(2), 454-463.
- [38] Antiepileptic drugs, fifth edition, René H. Levy, Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 179-215
- [39] The headaches, 3rd edition, Jes Olesen, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 519-530