

Zárójelentés a „Metabolikus transzformációk kromatográfiás vizsgálata” című, az OTKA által T049492 szám alatt támogatott kutatásban 2005-2008 között végzett munkáról.

A kutatás munkaterv szerint „Vizsgálni fogjuk a gyógyszeres kezelés során a szervezetben keletkező formaldehidnek és átalakulási termékeinek sorsát, valamint az átalakulást ellensúlyozó reakciókat”. Munkatervünket teljes (100%-os) mértékben követtük és teljesítettük. A tématerületet, ragaszkodva a munkatervben megfogalmazottakhoz, tovább folytattuk.

Módszert dolgoztunk ki az L-deprenil egy- és kétdimenziós rétegekromatográfiás vizsgálatának megfelelő végrehajtására, kizárva az esetleges front- és felt-deformációkból eredő megbízhatatlan eredményekből levont téves következtetéseket [1,2]. Rétegekromatográfiás és kétdimenziós (elúciós-kiszorításos) rétegekromatográfiás vizsgálatainkkal egyértelműen bizonyítottuk, hogy a deprenil N-metil csoportjának metabolikus oxidálása a vegyület radioaktivitásának elvesztéséhez vezet, azaz sem a dezmetil-deprenil, sem az amfetamin már nem rendelkeztek radiaktivitással, míg a metamfetamin radioaktív maradt. Ugyanakkor, a vizelet komponenseinek dimedonnal (tipikus oxo, azaz ebben az esetben formaldehid reagens) való reagáltatása után keletkező formaldimedon radioaktivitást mutatott. Ez a radioaktivitás egyértelműen a radiojelzett L-deprenilből származhatott. A kétdimenziós elválasztás specifitását növelte, hogy a második dimenzióban kiszorításos módon történő kifejllesztést alkalmaztunk [2].

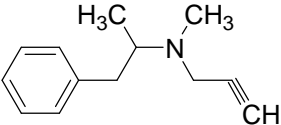
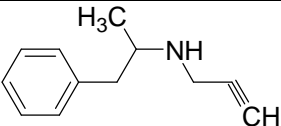
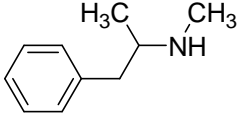
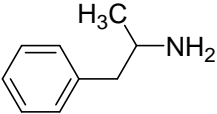
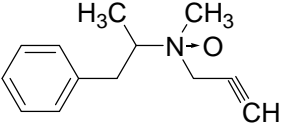
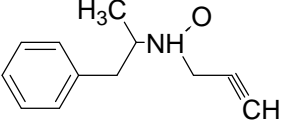
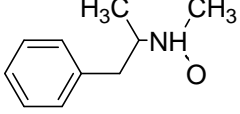
A planáris kromatográfiásan elért eredmények megerősítése és ellenőrzése mellett alapvető szükség volt annak megállapítására, hogy a vizelettel ürülő „szabad” formaldehid mellett a szervezet mely endogén anyagával lép reakcióba a formaldehid, és mely további végtermék keletkezik? Mi a sorsa ennek a terméknek, mely a formaldehid és az endogén anyag reakciójával keletkezett. A radiojelzett L-deprenillel Wistar patkányokon végzett kezelések eredménye alapján megállapítottuk, hogy a radiojelzett, azaz ^{14}C -metil csoport a lizin ε -amino-csoportjával lép reakcióba, és N^ε -monometil-lizin keletkezik [3-5].

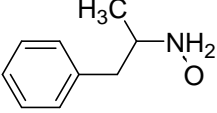
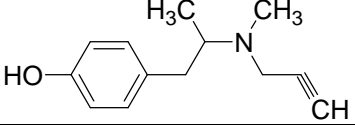
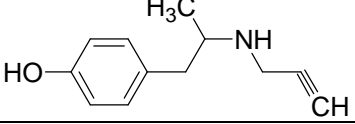
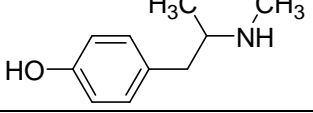
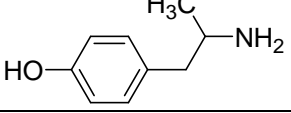
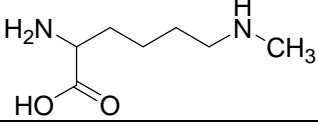
Az N^ε -monometil-lizin N-demetilálódás-formaldehid-N-metileződés során való keletkezése, és a jelenség rétegekromatográfiás és HPLC-MS segítségével történő bizonyítása részemre nyilvánvaló volt, hiszen a bázikus N-metilezett aminosavakkal (például: Kalász, H. et al., Identification of N-methylated basic amino acids from human adult teeth. *J. Dental Research*, 57, 128-132 (1978)) illetve a formaldehid biológiai közegben való keletkezésével (Kalász, H. et al.: Formaldehyde generation by N-demethylation. *Acta Biol. Hung.*, 49, 229-344 (1998)) és sorsával (Kalász, H.: Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation and formaldehyde production. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 3, 175-193 (2003)) több évtizede foglalkozom. Azonosítottuk HPLC-MS módszerrel a ^{14}C - N^ε -monometil-lizint (a vizsgálatokat az akkor fénykorát élő Gyógynövénykutató Intézetben [3,4], melynek akkor elnök-igazgatója az igen kiváló Nyiredy akadémikus volt, a vizsgálatokat a széleskörű HPLC-MS szakmai ismeretekkel rendelkező Szűcs Zoltán végezte), hazai kongresszusokon felvetették a megismételt vizsgálatok szükségességét. Javasolták, hogy egy másik vizsgálóhelyen ismételjük meg az analíziseket.

Az EGIS Gyógyszer- és Tápszergyár Farmakokinetikai és Metabolizmus laboratóriumában Dr. Klebovich Imre professzor és Dr. Balogh-Nemes Katalin megismételték az analíziseket, és mind HPLC-MS mind pedig HPLC-MS-MS módszerekkel bizonyították, hogy a radiojelzett „nem deprenil metabolit” termék valóban ^{14}C -N^ε-monometil-lizin [5].

Az L-deprenil szerkezeten belüli sorsának vizsgálata során megállapítottuk, hogy diabetes gyorsítja az L- deprenil és metabolitjainak a patkány szervezetből a vizelettel történő kiürülését, a metabolitok arányát azonban nem változtatja meg [6]. A radiojelzett metabolitok és az anyavegyület aránya a következő volt: methamfetamin:p-hidroximetamfetamin:deprenil:formaldehid = 20:3:1:1. A formaldehidnek csupán töredéke lépett be a lizint metilező reakcióba, és adott ^{14}C -N^ε-monometil-lizint. Közleményünkben [6] indokoltuk, miért keletkezik N^ε-monometil-lizin az N-transzmetileződéssel. A választ a deprenilből keletkező metabolikus termékek lipofilitása adja meg. A deprenil illetve metabolitjainak lipofilitása (logP értékben kifejezve) meglehetősen magas, ez magyarázza például a vér-agy gáton való jó penetrálhatóságát. A szervezetből való kiürülés a hidrophil vegyületek számára preferált, azaz a kiválasztódás/kiürülés szempontjából meglehetősen előnyös a deprenil→formaldehid→N^ε-monometil-lizin átalakulás (1. Táblázat, jelentős részben a közleményből idézve [6]).

1. Táblázat. A deprenil és metabolitjai Pallas program segítségével számított logP értékei.

No.	Vegyület	Szerkezet	Radioaktivitás	logP
1	Deprenil		+	2.94
2	Nordeprenil		-	2.37
3	Methamfetamin		+	2.03
4	Amfetamin		-	1.57
5	Deprenil-N-oxid		+	2.21
6	Nordeprenil-N-oxid		-	2.29
7	Methametamin-N-oxid		+	2.02

8	Amfetamin-N-oxid		-	1.83
9	p-Hidroxi-deprenil		+	1.93
10	p-Hidroxi-nordeprenil		-	1.21
11	p-Hidroxi-metamfetamin		+	0.85
12	p-Hidroxi-amfetamine		-	-0,01
13	Formaldehid	$\text{H}_2\text{C}=\text{O}$	+	0.07
14	N-monometilizin		+	-1.25

Fontos volt annak megállapítása, hogy a deprenil illetve más, N-metil csoporttal rendelkező gyógyszer-vegyület szervezetbe kerülése esetén keletkező formaldehid képes-e a szervezet aminosavai, peptidjei vagy fehérjei esetén keresztkötéseket létesíteni, hasonlóan, ahogy azt Yu és munkatársai „megjósolták”. Yu és munkatársai ugyanis fehérjék lizin-alkotórészei között keresztkötések keletkezését mutatták ki a patkányok szervezetébe bevitt, jelentős mennyiségű metilamin hatására. (Yu, P.H., Involvement of cerebrovascular semicarbazide-sensitive amine oxidase in the pathogenesis of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Med Hypotheses*, **57**, 175 (2001), Yu, P.H. et al., Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1647**, 193 (2003).). Sem deprenillel kezelt patkányok esetén, sem patológiásan rugalmatlan erek esetén (még nyomokban sem) tudtunk kimutatni az érfalban N^ε-monometil-lizint – pedig a keresztkötések létrejöttéhez valószínűleg az N^ε-monometil-lizin keletkezése az első lépés [7].

A dezmetileződés-formaldehid-metileződés folyamat analógiája a dezetilazódés-acetaldehid-etileződés. Több vérnyomáscsökkentő gyógyszer adagolása u.n. prodrug formájában történik, a szervezetben az O-etil csoport leszakadása révén válnak aktív gyógyszerré, miközben acetaldehid keletkezik. Moexipril metabolizmusát vizsgáltuk HPLC-MS módszerrel. A dezetilazódést követtük, N^ε-monoetil-lizint azonban soha sem sikerült kimutatnunk [8,9].

N-szubsztituált alkil csoportok előfordulnak N-N' összekötő hídként is. Ilyen vegyületek a bisz-piridinium-aldoximok, melyek az organofoszfát mérgezések kezelésénél használatosak (Petioianu, G.A. and Kalász, H.: Comparison of the ability of pyridinium aldoximes to reactivate human RBC cholinesterase inhibited by ethyl-

and methyl-paraoxon. *Current Organic Chemistry*, **11**, 1624 (2007), Kalász, H. és Tekes, K.: Terrorist attacks or poisoning by organophosphate pesticides – Is there any defence?, *BenSci, The Newsletter by Bentham Science Publisher*, **1**, in press (2009)). Fontos tényező lehet az alkil láncot alkotó rész N-dezalkilálódása az egyik, vagy mindkét piridinium gyűrű N-atomjáról. Farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálataink kezdetben a n-propil- és n-butil- láncokat tartalmazó K-27 és K-48 vizsgálatára koncentráltak [10-13]. Megállapítottuk, hogy nagyon hasonló in vivo kinetika mellett a K-27 nem metabolizálódik [13], míg a K-48 alkil láncán oxidatív metabolizmus játszódik le [12]. Hasonlóan, a n-propil N-N' híd alkil láncához, az oxidatív metabolizmus iránti rezisztenciát mutatott a C-C kettős kötéssel rendelkező butén hidat tartalmazó K-203 is. A vegyületek lipofilitása [16,17] nem tükröződött metabolizmus iránti fogékonyság/rezisztencia tekintetében, amint az már a dezetilézéssel aktíválódó –pril vegyületeknél (moexipril, stb.) sem volt megfigyelhető [18].

Áttekintettük a piridinium-aldoximok kromatográfiás lehetőségeit [19], és az agyban történő esetleges formaldehid keletkezés és metilcsoport átvitel első lépéseként vizsgáltuk vegyületek vér-agy gáton (BBB) és vér-liquor gáton való áthaladásának tényezőit [20-21].

Dr. Lengyel József kollegámmal (aki az OTKA 49492 kutatási támogatás egyik résztvevője) szerkesztettünk egy könyvet, mely a gyógyszerek szerkezetbeni sorsának tényezőit, valamint a gyógyszerek és metabolitjaik analízisének módszereit tartalmazza. [22].

A technikai fejlődés tette lehetővé, hogy a kromatogramokat elektronikusan megőrizzük és értékeljük. A Borwin Software és Interface ára azonban évről-évre növekedett, a beszerzés idején meghaladta a keret előirányzatait. A beruházás esetében a keret túllépésére került sor.

A kutatási támogatással kapcsolatban megjelent publikációk. Az irodalmi hivatkozás utáni zárójel (+) jelzi, hogy a kutatási támogatás számát feltüntették.

- [1] Kalász, H.: Spot and mobile-phase-front anomalies in planar (thin-layer) chromatography.
Chromatographia, 62, S57-S62 (2005). (+)
- [2] Kalász, H., Hunyadi, A. and Báthori, M.: Novel results of two-dimensional thin-layer chromatography.
J. Liquid Chromatogr. & Rel. Techn., 28, 2489-2497 (2005). (+)
- [3] Kalász, H., Benkő, A., Szűcs, Z., Szilágyi, Á., Szarvas, T. and Lengyel, J.: HPLC and HPLC-MS analysis of urinary N^ε-monomethyl-lysine.
J. Chromatogr. Sci., 43, 165-168 (2005). (+)
- [4] Kalász, H., Szűcs, Z., Tihanyi, M., Szilágyi, Á. And Lengyel, J.: Detection of N^ε-monomethyllysine using high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography—mass spectrometry.
J. Chromatogr.A., 1079, 208-212 (2005). (+)
- [5] Kalász, H., Klebovich, I., Balogh-Nemes, K., Szilágyi, Á., Tihanyi, M., Szarvas, T., and Lengyel J.: Detection of N-monomethyl-lysine generated by metabolic transmethylation.
Anal. Bioanal. Chemistry, 382, 760-764 (2005). (+)
- [6] Adeghate, E., Sotonyi, Jr., P., Kalász, H.: Chronic experimental diabetes accelerates urinary elimination of deprenyl and its metabolites.
The Open Medicinal Chemistry Journal, 1, 24-28 (2007). (+)
- [7] Kalász, et al., Drugs and biological methylation. Közlés folyamatban. (+)
- [8] Kóti, J., Háda, V., Petroianu, G., Hasan, M.Y., Tekes, K., Szűcs, Z. and Kalász, H.: Monitoring the metabolism of moexipril to moexiprilat using high-performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry
J. Chromatogr. Sci., 44, 214-218 (2006). (+)
- [9] Kalász, H., Petroianu, G., Tekes, K., Klebovich, I., Ludányi, K. and Gulyás, Z.: Metabolism of moexipril to moexiprilat: Determination of *in vitro* metabolism using HPLC-ES-MS
Medicinal Chemistry, 3, 101-106 (2007). (+)
- [10] Kalász, H., Hasan, M.Y., Sheen, R., Kuca, K., Petroianu, G., Ludányi, K., Gergely, A., Tekes, K.: HPLC analysis of K-48 concentration in plasma
Anal. Bioanal. Chemistry, 385, 1062-1067 (2006). (+)
- [11] Tekes, K., Hasan, M.Y., Sheen, R., Kuca, K., Petroianu, G., Ludányi, K., Kalász, H.: HPLC determination of the serum concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator.
J. Chromatogr.A., 1122, 84-87 (2006). (+)

- [12] Gyenge, M., Kalász, H., Petroianu, G.A., Laufer, R., Kuca, K. and Tekes, K.: Measurement of K-27, an oxime-type cholinesterase reactivator by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection from different biological samples.
J. Chromatogr.A., 1161, 146-151 (2007). (+)
- [13] Benkő, B., Kalász, H., Ludányi, K., Petroianu, G.A., Kuca, K., Darvas, F., Tekes, K.: In vitro and in vivo metabolisms of K-48.
Anal. Bioanal. Chemistry, 389, 1243-1247 (2007). (+)
- [14] Benkő, B., Laufer, R. and Ohmacht, R.: HPLC analysis of microsomal metabolism of K.48. *Acta Chromatogr.*, 19, 61 (2007). (+)
- [15] Kalász, H., Laufer, R., Szegi, P., Kuca, K., Musilek, K. and Tekes, K.: HPLC study of the pharmacokinetics of K-203.
Acta Chromatogr., 20, 575 (2008). (+)
- [16] Csermely, T., Petroianu, G., Kuca, K., Fűrész, J., Darvas, F., Gulyás, Z., Laufer, R. and Kalász, H.: TLC of quaternary pyridinium aldoximes, antidotes of organophosphorous esterase inhibitors.
JPC-Journal of Planar Chromatography, 20, 30-42 (2007). (+)
- [17] Laufer, R., Báthori, M., Csermely, T., Petroianu, G., Kuca, K., Tóth, N. and Kalász, H.: TLC determination of hydrophilicity parameter of some pyridinium aldoximes.
J. Liquid Chromatogr., 30, 2337-2344 (2007). (+)
- [18] Csermely, T., Kalász, H., Deák, K., Darvas, F., Hasan, M.Y. and Petroianu, G.: Lipophilicity determination of some ACE inhibitors by TLC.
J. Liquid Chromatogr. & Rel. Techn., 31, 2019-2034 (2008). (+)
- [18] Csermely, T., Kalász, H., Petroianu, G., Kuca, K., Darvas, F., Ludányi, K., Mudhafar, A.A. and Tekes, K.: Analysis of Pyridinium Aldoximes - A Chromatographic Approach.
Current Medicinal Chemistry, 15, 2401-2418 (2008). (+)
- [19] Lorke, D.E., Kalász, H., Petroianu, G. and Tekes, K.: Entry of oximes into the brain. A review.
Current Medicinal Chemistry, 15, 743-753 (2008).
- [20] Kalász, H., Fűrész, J. and Tekes, K.: The fate of pyridinium aldoximes in the body.
Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 14, in press (2009). (+)
- [21] Kalász H. és Lengyel J. (szerkesztők): A gyógyszerek szerkezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei.
Semmelweis Kiadó, Budapest, pp. 1 - 353, 2006.