

## A DROGMETABOLIZMUS VIZSGÁLATA

A gyakorlaton in vitro körülmények között a mikroszóma N-demetiláz aktivitást fogjuk vizsgálni.

### A mérés elve

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

### Mikroszóma preparálása:

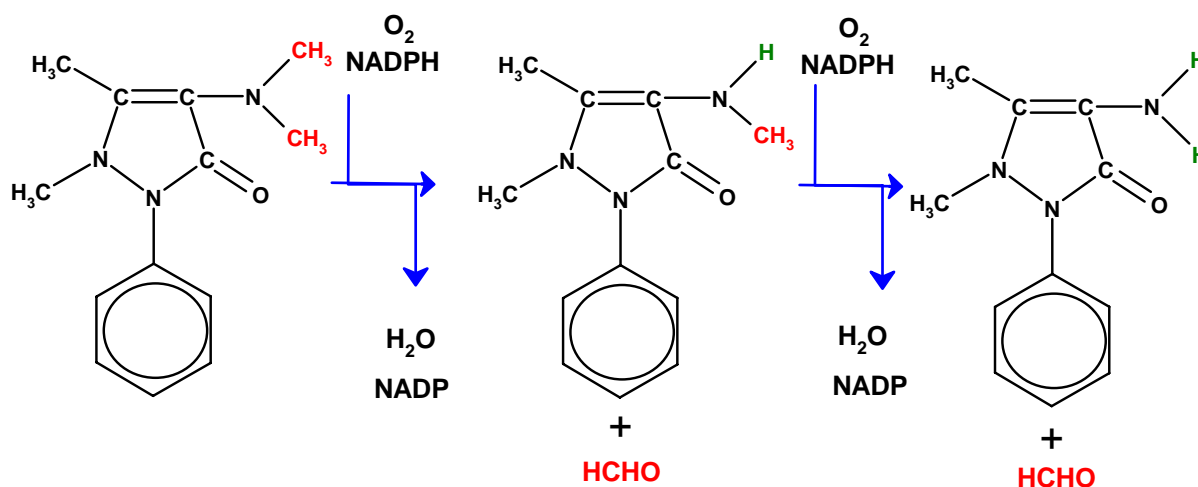
A mikroszómát májból állítjuk elő differenciálcentrifugálással. Ez azt jelenti, hogy a pufferben homogenizált májat először 13000 g-vel centrifugáljuk, kiülepítve a sejtmag és mitokondrium frakciót. A felülúszóban (ún. posztmitokondriális frakció) maradt mikroszóma frakciót 105 000 g-vel (ultracentrifugában) centrifugálva ülepítjük.

A kísérlethez a mikroszómát fenobarbitállal kezelt (indukált) és nem kezelt (kontroll) hím patkányok májából preparáljuk. A máj drogm metabolizáló rendszerét 3-4 napon keresztül, 0,2 %-os fenobarbitál oldat itatásával indukáljuk.

A mikroszóma preparálása nem célja a gyakorlatnak. A gyakorlat kezdetén a preparátum rendelkezésre áll úgy, hogy fehérje tartalma mind az indukált, mind a kontroll esetben 30 mg/ml.

### Szubsztrát:

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



## NADPH generálás:

A reakcióhoz szükséges NADPH koenzimet in situ állítjuk elő a májsejt citoplazmájában amúgy is magas aktivitásban jelenlevő glukóz-6-P-dehidrogenáz (G-6-P-DH) segítségével, mely az alábbi reakciót katalizálja (I. pentóz-foszfát-ciklus).

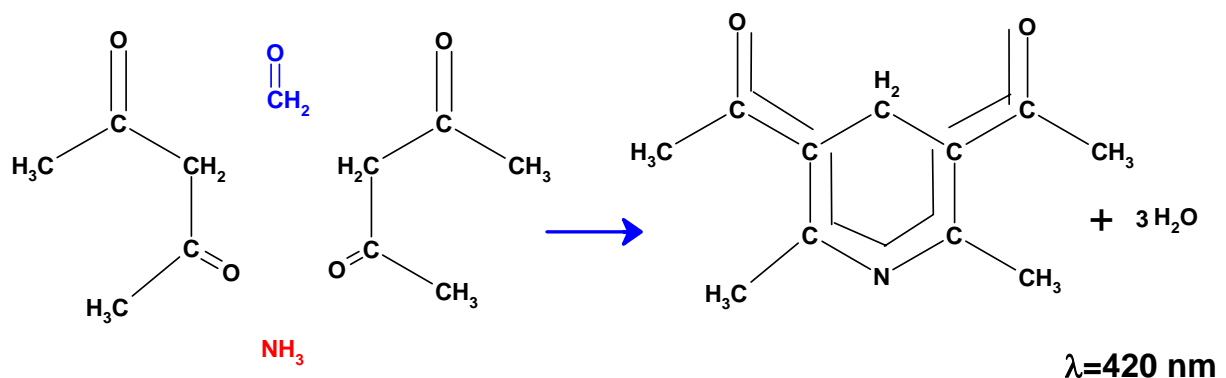


Ezért nem centrifugáljuk ki a mikroszómát a G-6-P-DH -t tartalmazó citoplazma frakcióból, hanem a kettőt együtt használjuk és a NADPH-t generáló rendszernek csak a másik két komponensét a NADP-t és a glukóz-6-P-ot adjuk az inkubációs elegyhez.

## Formaldehid meghatározás elve

A keletkezett termékek közül a formaldehid könnyen mérhető az ún. Nash-reakcióban.

Itt két acetilaceton, egy ammónia és egy formaldehid egy kiterjedt konjugált kettőskötésrendszerrel tartalmazó molekulává (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin) egyesül (1.ábra). A keletkezett vegyület abszorbanciáját 412 nm-en mérjük.



1. ábra

## Szükséges oldatok:

- 1.) 30 mg/ml-es posztmitokondriális felülúzó (pmf);
- 2.) 0,3 M K-foszfát puffer pH 7,5;
- 3.) 1 mM NADP;
- 4.) 0,1 M G-6-P-Na;
- 5.) 0,1 M amidazofen;
- 6.) 1,0 M MgCl<sub>2</sub>;
- 7.) 50% TCA;
- 8.) 1,5 M ecetsav;
- 9.) 2 M ammóniumacetát;

- 10.) acetilacetone;
- 11.) 1,32 mM formaldehid;

## A gyakorlat kivitelezése

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

1./ 2-szer tömény reakciókeverék: (2x mix) :

50 mM K-foszfát puffer pH 7,5, 1mM NADP, 10 mM G-6-P-Na, 20 mM MgCl<sub>2</sub>

2./ Nash-reagens: 995 ml ammóniumacetát; 3 ml ecetsav; 2ml acetilacetone.

Két, 6 db Eppendorf-centrifugacsőből álló sorozatot megszámozunk úgy, hogy a két sorozatot egymástól eltérő jelzéssel (indukált és kontroll) is ellátjuk. Mindegyik csőbe 0,1 ml 50%-os TCA-t teszünk.

Ezután mérjük össze 2 Erlenmeyer-lombikba az inkubációs elegyeket:

K-foszfát puffer 2,65 ml

2-szer tömény reakciókeverék 3,50 ml

pmf kontroll ill. indukált 0,50 ml

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

## Inkubáció

A tényleges inkubációt ezután indítjuk 0,35 ml 0,1 M-os amidazofen hozzáadásával. Az inkubációt a kontroll és indukált pmf-t tartalmazó lombikban párhuzamosan végezzük. Az a legcélszerűbb, ha a másodiknak választott lombikban egy perccel később indítjuk a tényleges inkubációt, mint az elsőben (azaz 1 perccel később adjuk hozzá az amidazofent), mert így a két lombikkal történő párhuzamos munka ellenére is kényelmesen tartani tudjuk a mintavételezési időpontokat.

Az inkubáció során a lombikokat időnként megrázzuk (vagy a vízfürdőben rázatjuk), hogy ezzel biztosítsuk a bennük folyó monooxigenáz reakciók O<sub>2</sub> igényét.

A lombikokból a következő időpontokban, a 0.; 2,5.; 5.; 10.; 15. és 20. percben 1 ml-es mintákat veszünk.

## Leállítás

A levett mintákat a már elkészített 0,1 ml-nyi 50%-os TCA-hoz pipetázzuk, ami a fehérjék kicsapásával azonnal leállítja a reakciót. Ügyeljünk arra, hogy a levett mintákat az Eppendorf-csőveket lezárva azonnal rázzuk össze a TCA-val.

## A formaldehid koncentrációjának meghatározása

### 1. Kalibrációs sorozat készítése

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

0; 20; 40; 60; 80 és 100 **Hiba! A hivatkozási forrás nem található.** Ezután ezeket K-foszfát pufferrel 1,00 ml-re kiegészítjük.

### 2. A minták formaldehid koncentrációjának meghatározása

A lezárt Eppendorf-centrifugacsőben levő, TCA-val kicsapott mintákat Eppendorf-centrifugában lecentrifugáljuk (10 000 rpm, 2-3 perc), majd a felülúszókat (1-1 ml) megjelölt kémcsövekbe pipetázzuk.

Végül mind a kísérleti mintákhoz, mind a kalibrációs sorozatot tartalmazó csövekhez 2-2 ml Nash-reagenst mérünk, majd 60 °C-os vízfürdőbe tesszük őket. 15 perc inkubálás után a keletkezett sárga szín fényelnyelését 412 nm-en mérjük.

A kísérleti mintáknál a nulla perceseket, míg a formaldehid kalibrációs sorozatnál a formaldehidet nem tartalmazó csövet használjuk vakként. (Az oldatok sárga színe több órán át stabil.)

## Kiértékelés

A kalibrációs sorozat abszorbanciáinak segítségével kalibrációs görbét készítünk, majd ennek felhasználásával meghatározzuk a levett minták formaldehid koncentrációját (nmol/mg fehérje).

A kapott értékeket az idő függvényében ábrázoljuk. Az indukció hatására a mikroszóma amidazofent demetiláló aktivitása jelentősen növekedett.