DOI:10.14753/SE.2014.1960

Piridínium aldoximok szervezetbeni sorsának elemzése RP-HPLC módszerrel

Doktori értekezés

Szegi Péter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, C.Sc.
Hivatalos bírálók:	Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár, D.Sc. Dr. Marton Sylvia, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Kecskeméti Valéria, Professor Emerita, C.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Gaszner Péter, egyetemi tanár, D.Sc. Dr. Perjési Pál, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2012

DOI:10.14753/SE.2014.1960

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **5**

ÁBRÁK JEGYZÉKE **6**

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE **8**

1. BEVEZETÉS **10**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **12**

3. CÉLKITŰZÉSEK **32**

4. ANYAGOK és MÓDSZEREK **33**

4.1. *In silico* vizsgálatok: TPSA és logP értékek meghatározása **33**

4.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok **33**

4.2.1. Kromatográfiás rendszer 33

4.2.2. A HPLC módszer validálása 34

4.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity): *35*

4.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat *35*

4.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision) meghatározása *35*

4.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity): *36*

4.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection, LOD) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation, LOQ) *36*

4.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery) *36*

4.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness) *37*

4.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok *37*

4.3. Állatmodellek **37**

4.3.1. Patkánymodell 37

4.3.2. Kutyamodell 38

4.4. Mintaelőkészítés **40**

5. EREDMÉNYEK **41**

5.1. *In silico* vizsgálatok; TPSA és logP értékek meghatározása **41**

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok ... 41

5.2.1. A piridínium aldoximok elválasztásának optimalizálása ... 41

5.2.1.1. Módszerfejlesztés ... 41
5.2.1.2. A módszer érzékenységének optimalizálása ... 50

5.2.2. Az optimalizált RP-HPLC módszer validálása ... 52

5.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity): ... 52
5.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat ... 53
5.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision): ... 54
5.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity): ... 59
5.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation) ... 62
5.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery) ... 63
5.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness) ... 64
5.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok ... 66

5.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása ... 72

5.3.1. Patkánymodell ... 72

5.3.2. Beagle kutyamodell ... 75

6. MEGBESZÉLÉS ... 78

6.1. *In silico* vizsgálatok: a logP és TPSA értékek meghatározása ... 78

6.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok ... 78

6.2.1. A piridínium aldoximok elválasztásának optimalizálása ... 78

6.2.1.1. Módszerfejlesztés ... 78
6.2.1.2. A módszer érzékenységének optimalizálása ... 80

6.2.2. Az optimalizált RP-HPLC módszer validálása ... 80

6.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity): ... 80
6.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat ... 81
6.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision) ... 81
6.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity): ... 82
6.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection, LOD) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation, LOQ) ... 82
6.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery) ... 83
6.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness) ... 83
6.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok ... 84

6.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása ... 85

6.3.1. Patkánymodell ... 85

6.3.2. Beagle kutyamodell ... 86

DOI:10.14753/SE.2014.1960

7. KÖVETKEZTETÉSEK 87

7.1. *In silico* vizsgálatok: a TPSA és log P értékek 87

7.2. RP-HPLC vizsgálatok 87

7.2.1. Optimalizálás 87

7.2.2. Érzékenység 88

7.2.3. Validálás 88

7.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása különböző állatmodellek esetén 89

8. ÖSSZEFOGLALÁS 91

9. SUMMARY 92

10. IRODALOMJEGYZÉK 93

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 103

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 105

DOI:10.14753/SE.2014.1960

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh – acetilkolin

AChE – acetilkolin-észteráz

AcN – acetonitril

BBB – vér-agy gát (Blood Brain Barrier)

BPA – biszpiridínium aldoxim

CSF – cerebrospinal fluid, liquor

DAD – diódasoros detektor

EMA – European Medicines Agency

EC – amperometriás/elektrokémiai

FDA – Food and Drug Administration

i.m. – intramuszkuláris

i.v. – intravénás

k’ – retenciós vagy kapacitási faktor

KIR – központi idegrendszer

LOD – kimutatási határ, limit of detection

logP – a molekula megoszlási hányadosának logaritmusa

LOQ – meghatározási határ, limit of quantitation

PA – piridínium-aldoxim

PCA – perklórsav

PRX – pralidoxim

RP-HPLC – fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

RSD (%) – százalékos relatív standard szórás

R% – visszanyerési tényező százalékos alakja

OBX – obidoxim

OP – organofoszfát

OSA – oktánszulfonsav nátrium sója (1-oktánszulfonsav)

QC – Quality Control samples

TCA – triklór-ecetsav

TPSA – teljes poláris felszín területe (Total Polar Surface Area)

UV – ultraibolya-látható fény (UV-VIS) detektálás

DOI:10.14753/SE.2014.1960

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: Az organofoszfátok kémiai szerkezetének általános képlete.
2. ábra: Az AChE OP-k által történő gátlásának és PA-kal való reaktiválásának mechanizmusa.
3. ábra: Az oximok általános kémiai szerkezete.
4. ábra: PRX és OBX k' értékei az OSA változó mennyiségének a függvényében.
5. ábra: K27 és K48 k' értékei az OSA koncentráció függvényében.
6. ábra: K74, K75 és K203 k' értékei az OSA koncentráció függvényében.
7. ábra: K1000 k' értékei az OSA koncentráció függvényében.
8. ábra: Standard K203 oldat (felső) és kontroll patkány agy (alsó) kromatogramja 1g/l OSA-t alkalmazva.
9. ábra: Kontroll patkány szérum (felső), és az 1 μg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány szérum (alsó) kromatogramja.
10. ábra: Kontroll patkány CSF (felső), és az 1 μg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány CSF (alsó) kromatogramja.
11. ábra: Kontroll patkány agy (felső), és az 1 μg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány agy (alsó) kromatogramja.
12. ábra: Kontroll patkány szem (felső), és az 1 μg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány szem (alsó) kromatogramja.
13. ábra: A K203 DAD detektorral felvett teljes spektruma.
14. ábra: K203 voltamogramja (injektált mennyiség 1,1 nmol).
15. ábra: K203 DAD-al felvett UV kromatogramja λ_{max}=276 nm-nél.
16. ábra: A K203 csúcstisztasági vizsgálata.
17. ábra: K203 standard kalibrációs görbéje UV detektálás esetén.
18. ábra: K203 standard kalibrációs görbéje EC detektálás során.
19. ábra: K203 bomlása erősen savas (0.8 M PCA) közegben.
20. ábra: K203 bomlása neutrális (pH=7) közegben.
21. ábra: K203 standard oldat savas bomlása során UV detektorral regisztrált kromatogramok .
22. ábra: K203 standard oldat savas bomlásakor elektrokémiai detektorral regisztrált kromatogramok.

23. ábra: A patkány szérum K203 szintjének változása a teljes kezelési idő alatt (n=5).
24. ábra: K203 szintjének változása az idő függvényében patkány szem esetében (n=5).
25. ábra: A patkány liquor K203 szintjének változása az idő függvényében (n=5).
26. ábra: A patkány agyminták K203 szintjének változása az idő függvényében (n=5).
27. ábra: Beagle kutya szérum K203 koncentrációja az idő függvényében 250 µmol/kg i.m. dózis alkalmazását követően.
28. ábra: Beagle kutya szérum K203 koncentrációja 15 µmol/kg i.m. dózis alkalmazása után az idő függvényében.
29. ábra: Beagle kutya CSF K203 koncentrációjának időfüggése 15 µmol/kg i.m. dózis alkalmazása után.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat: Az OP-k felosztása kémiai szerkezetük alapján.
2. táblázat: A Magyarországon forgalomban lévő szerves foszforsav észter tartalmú növényvédő szerek.
3. táblázat: Az OP mérgezés jellemző tünetei.
4. táblázat: A legígéretesebb piridínium aldoximok kémiai szerkezete.
5. táblázat: A K-vegyületek Pallas programmal számolt TPSA és logP értékei.
6. táblázat: Az OSA koncentráció és a k' értékek összefüggése.
7. táblázat: A K203 retenciós idejének mérése UV detektálás esetén.
8. táblázat: A K203 retenciós idejének mérése elektrokémiai (EC) detektálás esetén.
9. táblázat: K203 standard intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
10. táblázat: K203-mal spike-olt patkány szérum intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
11. táblázat: K203-mal spike-olt patkány agy intraday precizitás és torzítatlanság értékei (EC detektálás).
12. táblázat: K203-mal spike-olt beagle kutya szérum intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
13. táblázat: K203 standard interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
14. táblázat: K203-mal spike-olt patkány szérum interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
15. táblázat: K203-mal spike-olt patkány agy interday precizitás és torzítatlanság értékei (EC detektálás).
16. táblázat: K203-mal spike-olt beagle kutya szérum interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).
17. táblázat: A K203 kvantitatív meghatározásának ismételhetőségi vizsgálata (UV detektálás).
18. táblázat: A kalibrációs görbék egyenletei és a hozzá tartozó korrelációs együtthatók.
19. táblázat: Patkány szérumból mért K203 visszanyerési tényezőjének értékei (UV detektálás).

20. táblázat: Beagle kutya szérumból mért K203 visszanyerési tényezőjének értékei (UV detektálás).

21. táblázat: A kromatográfiás rendszer robusztusságának vizsgálata az AcN mennyiségének változtatásával.

22. táblázat: A mozgó fázis pH-jának hatása a kromatográfiás rendszer robusztusságára.

23. táblázat: Piridínium aldoximok bomlása erősen savas (0.8M) közegben szobahőmérsékleten (t=25 °C).

24. táblázat: Piridínium aldoximok bomlása erősen savas (0.8M) közegben t = 4 °C-on.

25. táblázat: A K203 koncentrációjának [μg/g ± SD nedves szövet] alakulása különböző dózisú kezelések hatására az egyes agyrészletekben.

26. táblázat: Patkány agy/szérum koncentrációk aránya az idő függvényében.

27. táblázat: Patkány CSF/szérum koncentrációk aránya az idő függvényében.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a szerves foszfát – organofoszfát – (OP-k) típusú vegyületek rendkívüli mérgező voltuk miatt valós veszélyt jelentenek. A WHO adatai szerint évente több millió esetben történik mérgezés az OP-k csoportjába tartozó permetező (pl. pirifosz) szerek helytelen alkalmazásával, de ezen vegyületek közé sorolhatók a rendkívül toxikus, idegmérgeknek számító, a terroristák által is alkalmazott rettegett harci gázok (pl. sarin, tabun, VX) is. Az OP-k közös tulajdonsága, hogy az expozíció után irreverzibilisen gátolják szervezetünk egyik kulcsfontosságú enzimét az acetilkolin-észterázt (AChE), melynek aktív centrumában található szerin hidroxil csoportjához kapcsolódnak, gátolva ezáltal az enzim működését. Az AChE enzim feladata a neurotranszmitterként felszabaduló acetilkolin (ACh) hidrolízise, így hatásának megszüntetése a neuromuszkuláris junkcióban, a vegetatív ganglionokban, a paraszimpatikus posztszinaptikus végkészülékben ill. a központi idegrendszer (KIR) acetilkolinerg neuronjaiban. Az AChE gátlása jellegzetes tünetegyüttest, OP-mérgezést okoz, mely során jelentős ACh felszaporodás figyelhető meg mind a perifériás mind a KIR-ben.

Jelenleg a klinikai gyakorlatban a szerves foszfát (organofoszfát és organofoszfonát) mérgezéseknél ellenszerként a piridínium aldoximok (PA) – pralidoxim (PRX), obidoxim (OBX) – használatosak, mint az AChE egyedüli reaktivátorai, a szokásos terápia (atropin, diazepam) mellett. Ugyanakkor mind a PRX mind pedig az OBX terápiás hatékonysága messze elmarad a várttól, ezért új típusú AChE reaktivátorok szintézise, ezek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának vizsgálata világszerte nagy erőkkel folyik.

Cseh kutatócsoport (Kuča és mtsai) a PRX és az OBX szerkezetéből kiindulva számos új ígéretes piridínium ill. biszpiridínium aldoxim (BPA) szerkezetű AChE-reaktivátort szintetizált. Az új aldoxim típusú vegyületek közös jellemzője, hogy két piridínium gyűrűt és egy vagy két oxim csoportot tartalmaznak. Számos biszpiridínium biszaldoxim és biszpiridínium monoaldoxim közül az előzetes in vitro és in vivo vizsgálatok alapján a K203 [(E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(hydroxyimino-methylpyridinium)-but-2-ene dibromide] jelű vegyület mutatkozik az egyik legígéretesebbnek. Ezek az új típusú BPA-k a piridínium gyűrűkben található két pozitív töltésű kvaterner nitrogén atom miatt szöveti pH-n nagyon hidrofilek, ezért a

DOI:10.14753/SE.2014.1960

biológiai közegből való meghatározásukhoz és farmakokinetikai vizsgálatukhoz nélkülözhetetlen volt egy validált és optimalizált bioanalitikai módszer kidolgozása.

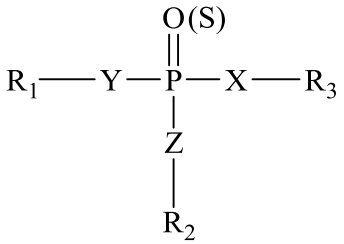
DOI:10.14753/SE.2014.1960

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az organofoszfátok (OP-k)

Az OP-k a foszforsavnak, a foszfonsavnak (foszforossav) és a foszfinsavnak (hipofoszforossav) alkoholokkal alkotott észter-, amid- és thiol- származékai. Ezeknek a szerves foszfátvegyületeknek közös kémiai jellemzője, hogy a bennük található központi foszfor atom +5-ös oxidációs számmal szerepel. Általános szerkezeti képletük alapján **(1. ábra)** a következőket mondhatjuk el róluk:

- öt vegyértékű központi foszfor atommal rendelkeznek
- a foszfor (P) atomhoz kettős kötéssel kapcsolódó gyök rendszerint oxigén (O) – [P═O, foszforil kötés] – vagy kén (S) – [P═S, tiofoszforil kötés]
- a P atomot a funkciós csoportokkal összekotő X, Y és Z általában O, de lehet nitrogén (N), S vagy CH_2 csoport is
- az R_1 és R_2 csoportok többnyire etil, metil, alkil, alkoxi, alkilthio vagy alkilaminocsoportok
- az R_3 az ún. távozó csoport, amely általában egy labilis acilcsoportot (halogenid, ciano, fenol vagy tiocsoportot) foglal magába



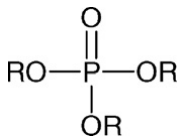
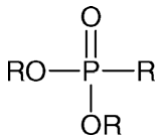
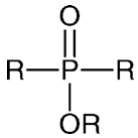
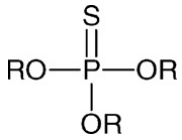
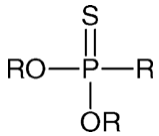
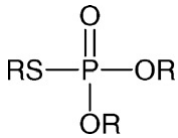
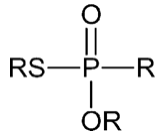
1. ábra: Az organofoszfátok kémiai szerkezetének általános képlete (Richardson 2010).

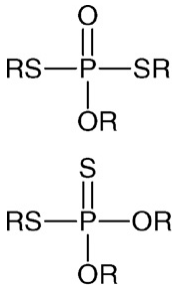
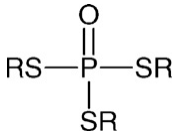
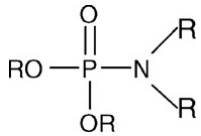
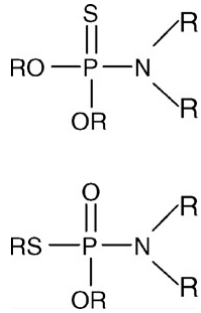
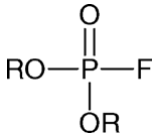
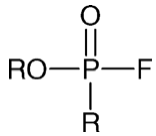
Több ezerre tehető azon OP-k száma, amelyek az 1. ábrán látható általános kémiai szerkezettel rendelkeznek. Az OP-k csoportjába tartozó vegyületeket az R_1 és R_2 funkciós csoportok, az X – Z összekötő atomok valamint a karakterisztikus kötés típusa alapján további alcsoportokba oszthatók (De Bleecker 2008) **(1. táblázat)**. Toxicitásuk tekintetében nagyon széles spektrumot képviselnek, egészen az extrém toxicitású

DOI:10.14753/SE.2014.1960

idegmérgektől (harci gázok) kezdve a közepesen ill. kevésbé mérgező rovarirtó szerekig bezárólag.

1. táblázat: Az OP-k felosztása kémiai szerkezetük alapján (Marrs 1993).

Típus (Organo-)	Kémiai szerkezet	Példa vegyületek
Foszfátok		Klórfenvinfosz Diklórvosz Monokrotofosz Tri-o-krezil foszát
Foszfonátok		Triklórfon
Foszfinátok		Glufozinát
Tiofoszfátok		Bromofosz Diazinon Fention Paration Pirimifosz-methil
Tiofoszfonátok		EPN Leptofosz
Foszforotiolátok		Demeton-S-metil Ecotiopát
Foszfonotiolátok (S-substituted)		VX

Foszforoditiolátok (ditiofoszfátok)		Azinfosz-etil Azinfosz-metil Dimetoát Diszulfoton Malation Metidation
Foszforotritiolátok (tritiofoszfátok)		DEF (tribufosz)
Foszforamidátok		Fenamifosz
Foszforamidotiolátok (amidotiofoszfátok)		Metamidofosz Izofenfosz
Fluorofoszfátok		Diizopropil-fluorofoszfát (DFP)
Fluorofoszfonátok		Cikloszarin Szarin Szoman

Történelmi áttekintés

Az első ilyen jellegű vegyületek szintézise a 19. század első felére tehető (Wiliamson előtti éra), amikor a vegyészek az éterszintézist az alkoholok és savak közvetlen reagáltatásával oldották meg. Ilyen módon Voegeli 1848-ban megalkotta az első foszforsav észtert, a trietil foszfátot (TEP), amely azonban csak milimoláris koncentrációban mutatott AChE aktivitást (Petroianu 2009, Petroianu 2010a). 1851-ben Wiliamson kifejlesztett egy új és hatékonyabb módszert az éterek előállítására, etil jodid és nátrium sók alkalmazásával. Ez az új módszer megnyitotta az utat a még hatékonyabb AChE gátló OP-k szintézise felé. Az első ilyen módon szintetizált

vegyület a tetraetil-pirofoszfát (TEPP) szintézise Moschnine és de Clermont nevéhez fűződik. Ez a vegyület már jóval kisebb, nanomoláris koncentrációban is gátolta az AChE-t (Petroianu 2008, Petroianu 2009). 1873-ban Hoffmann-nak először sikerült direkt P – C kémiai kötést tartalmazó OP vegyületet – metilfoszforil-diklorid – szintetizálnia.

A 20. század első felében Lange és von Krueger a dialkilfoszfofluoridok előállításával számos rovar- és gombaölő tulajdonsággal rendelkező OP típusú vegyületet hoztak létre (Antonijevic et al. 2007, Petroianu 2010b). A század húszas, harmincas éveiben az ammóniaszintézis forradalmasításával a német vegyiparnak sikerült megfelelő mértékben kiszolgálnia a mezőgazdaság egyre növekvő nitrogénműtrágya iránti vágyát. A megnövekvő termésátlagok természetes velejárójaként a mezőgazdaság számára egyre nagyobb gondot okoztak az elszaporodó gyomnövények és a rovarkártevők, így intenzív kutatás kezdődött az ellenük való védekezés terén. 1934-1944 között Schrader és munkacsoportja több mint 2000 OP típusú vegyületet szintetizált (pl. paraoxon, parathion), amelyek mindamellett, hogy hatásos gyomirtó és rovarölő szereknek bizonyultak a szabadföldi kísérletekben, még az emberre is közvetlen veszélyt jelentettek. Ennek felismerése gyanánt 1935-től kezdve a náci kormány égisze alatt erőteljes kutatás, fejlesztés és gyártás kezdődött az OP típusú vegyületek hadiipari célokra történő felhasználását illetően, amelynek eredményeképp Schrader 1936-ban megalkotta az első igen nagy toxicitású foszforvegyületet, a tabunt (GA), amelyet aztán gyors egymásutánban követett a szarin (GB) (1938) és a szomán (GD) (1944) előállítása. Az amerikai nomenklatúra ezeket a vegyületeket G-ágensnek nevezi. A II. világháborút követően a németek kutatási eredményeire támaszkodva a kísérletek elsősorban az idegmérgek hatásmechanizmusának felderítésére irányultak, amely során a megfelelő védelem kidolgozása mellett további új, pusztító hatóanyagokat is kifejlesztetek. 1957-re Tammelin és kutatócsoportja fluor-foszfát vegyületekből előállította az idegmérgek következő generációjába (V-ágensek) tartozó VX-et. Ugyanebben a hidegháborús időszakban az orosz tudósoknak is sikerült kifejleszteniük számos V-ágenst, köztük az orosz VX-et (VR), amelynek egyik strukturális analógja a kínai VX (CVX). A V-vegyületek mintegy 10-szer, de akár 100-szor is erősebb mérgek, mint a G-ágensek, kevésbé illékonyak és jóval stabilabbak. Az 1980-as évek végén, a 90-es évek elejére orosz vegyészeknek sikerült létrehozniuk az idegmérgek újabb, jóval

mérgezőbb képviselőit, a Novichok-5 és Novichok-7 vegyületeket. Ezek ún. bináris idegmérgek, mivel letális hatásukat csak kettő, egyébként az élő szervezetre hatástalan vegyület keveredése után fejtik ki, toxicitásukat tekintve 10-szer, 100-szor mérgezőbbek az elődeiknél (Hollósy 2003, Antonijevic et al. 2007).

Az OP-k felhasználási területe

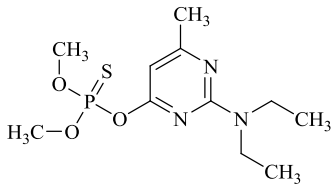
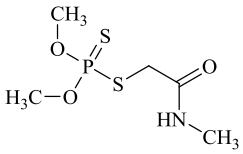
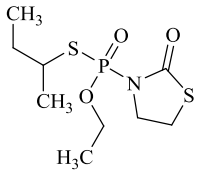
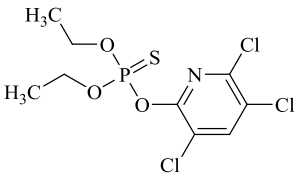
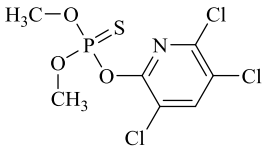
Az OP-kat széleskörűen alkalmazzák növényvédőszerként a mezőgazdaságban, többek közt mint rovarirtó-, gyomirtó szereket, atkaölő-, gombaölő- ill. féregölő vegyületeket (Karczmar 1998), de a műanyagiparban is felhasználást nyernek lágyítószerként és lubrikánsok segédanyagaiként (Gupta 2006). Az agráriparban nagy előnynek számít, hogy ellentétben a szintén gyomirtó szerként használt szerves klórtartalmú DDT-vel, amely az elő szervezetekben akkumulálódik, ezek a vegyületek a rendkívül instabil kémiai szerkezetükből adódóan igen gyorsan elbomlanak, toxikus metabolitjaik nincsenek, így a permetezés után a mezőgazdasági termékek élelmezési felhasználhatóságának várakozási ideje napokban mérhető. Permetszerként az emberre kevésbé veszélyes származékokat alkalmazzák, viszont a vízi szervezetekre, madarakra és a méhekre rendkívül mérgezőek. Általános jellemzőjük, hogy rendkívül lipidoldékonyak, az ép bőrre jutva már egy-két cseppből, a széllel szemben permetezve pedig már néhány belélegzésből akkora mennyiség jut a szervezetbe, mely a mérgezés tüneteit perceken belül kiváltja (Tekes et al. 2010). A WHO adatai szerint évente a világon 3 millió dokumentált permetezőszer-mérgezés történik és mintegy 200-350 000 közöttire tehető az ebből fakadó halálos áldozatok száma. Ezek az elrettentő adatok elsősorban a tudatlanságból, a biztonságos használatra vonatkozó rendszabályok be nem tartásából adódnak (Gunnell et al. 2007, Eddleston et al. 2008). Ugyanakkor meglepően sok beszámolót olvashatunk a szakirodalomban az OP-k öngyilkossági célú alkalmazásáról (Bertolote et al. 2006). Az **2. táblázatban** a hazánkban jelenleg is forgalomban lévő készítményeket foglaltam össze. A legtoxikusabb OP-k azonban harci gázként ismertek (tabun, szarin, cikloszarin, szoman, VX).

A háborút követően ezek a hatalmas készletek a különböző terroristacsoportok és diktátorok elsődleges célpontjává vált, akik a nemzetközi tiltások ellenére számos esetben alkalmazták ezeket a vegyületeket hadászati célokra és a civil lakosság ellen is.

Az Irak-Iráni háború során az iraki hadsereg először 1983-84-ben Majnoon szigetén tabunt, majd 4-5 évvel később 1987-88-ban Halabjah massacre térségében szarint vetett be az iráni hadsereg ill. a civil lakosság ellen a számos halálos áldozatot követelő támadásai során (Balali-Mood et al. 1998). Közismertek az 1990-es években, Japánban elkövetett terroristatámadások is, amelyek a felkészületlenség, a mérgezettek nem megfelelő ellátásának következtében sok civil halálát okozták. Az első támadás 1994. június 27.-én Matsumoto városában történt (Okudera 2002), míg a következő évben 1995. március 20.-án a tokiói metró hálózatában vetettek be szarint (Suzuki et al. 1995). Harminc év elteltével már hozzáférhetővé váltak azok az adatok is, melyek szerint Japánban több amerikai katona azért szenvedett súlyos mérgezést, mert a korábban OP-t tartalmazó hordókat szakszerűtlenül tisztították (Tekes et al. 2010).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

2. táblázat: A Magyarországon forgalomban lévő szerves foszforsav észter tartalmú növényvédő szerek.

Növényvédőszer megnevezése	Hatóanyag megnevezése	Kémiai szerkezet	Hatóanyag tartalom
Acteelic 50 EC	pirimifosz-metil		500 g/l
Bi 58 EC Danadin Progress Dimetoát Jubileum Rogor L-40 EC	Dimetoát		400 g/l
Nemathorin 10 G	Fosztiazat		10%
Cyren EC Dursban 480 EC Pychlorex 480 EC Pyrinex 48 EC	Klórpirifosz		480 g/l
Nurelle-D 50/500 EC			500 g/l
Pyrifosz 25 EC			250 g/l
Pyrinex 25 CS			205 g/l
Megatox 40 EC Reldan 40 EC	klórpirifosz-metil		400 g/l

DOI:10.14753/SE.2014.1960

Az OP-k hatásmódja, toxicitásuk alapja

Az OP típusú vegyületek közös tulajdonsága, hogy a szervezetbe kerülve irreverzibilisen gátolják a szerin-észterázok (szerin-hidroxilázok) csoportjába tartozó kolinészterázokat, közülük is elsősorban az AChE-t, amely elsődleges feladata a szervezet egyik legfontosabb ingerületátvivő anyagának, az ACh-nak az enzimatikus hidrolízis útján történő inaktiválása. A gerinces szervezetekben a kolinészterázoknak két alapvető típusát különböztetjük meg: a már előbb említett „valódi”acetil-kolinészterázt (AChE, EC 3.1.1.7) ill. a butiril-kolinészterázt (BuChE, EC 3.1.1.8), melyek szöveti eloszlása, szubsztrátspecifitása és funkciója is jelentős különbözőséget mutat. Szöveti eloszlásukat tekintve általánosan elmondható, hogy míg az AChE elsősorban a neuronális szövetekre (CSF, kolinerg végkészülék, agyszövet) jellemző, addig a BuChE a nem neuronális szövetekben (máj, gyomor-béltraktus, szív, vese és tüdő) mutat nagyobb aktivitást. Míg a vörösvértestek membránjában kötött formában AChE-t, addig a vérplazmában szolubilis formában a BuChE-t találunk. Szubsztrát-specifitásukat tekintve is különböznek: míg az AChE fő szubsztrátja az ACh, amit minden más kolin-észternél gyorsabban hidrolizál, addig a BuChE a plazmában megtalálható sokféle észtert hidrolizálja. A két kolineszteráz típus abban is különbözik, hogy míg az AChE aktivitása magas ACh koncentráció jelenlétére gátlódik, addig a BuChE esetén ez a szubsztrát-gátlás nem figyelhető meg (Chatonnet et al. 1989, Patocka et al. 2004, Stepankova et al. 2008, Tekes et al. 2010). Röntgenkrisztollográfiás és NMR vizsgálatok alapján az enzimek aktív centrumában a szubsztrátkötés szempontjából 2 kitüntetett hely található:

a) anionos vagy acil-kötő zseb: a szubtrátok (pl. OP-k) acil csoportához kötődve mintegy pozícionálják, megfelelő helyzetbe állítják őket a későbbi szerin (Ser) oldallánc által indított nukleofil támadáshoz. AChE esetén ezt a zsebet fenil-alanin és triptofán aminosavak alkotják, amelyek aromás oldalláncai mélyen benyúlnak az aktív centrum belsejébe. Ugyanakkor BuChE esetén jóval kisebb aminosavak (pl. valin, leucin) alkotják ezt a zsebet, ezáltal ez az enzim jóval nagyobb méretű szubsztrátok megkötésére is alkalmas (Stepankova et al. 2008). Ordentlich és mtsai (1998) szerint az

aktív centrumon belül további, az anionos kötőhelyhez hasonló oldallánc-csoportosulás található. Ilyen pl. az ún. oxianion zseb glicin és alanin oldalláncai, amelyek a Michaelis komplex képződése során polarizálják az OP vegyület P═O kötésében lévő foszforatomot, amely így már fogékonyabbá válik a Ser oldallánc nukleofil támadására.

b) észterkötési hely v. katalitikus centrum: itt található az ún. katalitikus triád, amit a Szerin (Ser_{203})-Hisztidin (His_{447})-Glutamát (Glu_{334}) aminosavak alkotnak. Itt megy végbe a szubtrátok enzimatikus hasítása a Ser oldallánc nukleofil támadását követően. A nukleofil támadás során a Ser_{203} oldalláncáról egy protontranszfer történik a His_{447} imidazol-gyűrűjének egyik nitrogénatomjára, aminek következtében a gyűrű másik nitrogénatomjáról szintén egy proton átadás megy végbe a Glu_{334} karboxil csoportjára (Rosenfeld et al. 2006).

Az OP-k azáltal, hogy az AChE aktív centrumában található Ser oldallánchoz kapcsolódnak, mintegy tartósan, gyakorlatilag irreverzibilisen foszforilálják azt, meggátolva ezáltal az enzim elsődleges szubsztrátjának, az ACh-nak kolinná és ecetsavvá történő hidrolízisét. Az OP-knak az AChE-el történő interakciója többlépcsős folyamat során megy végbe (Kardos et al. 2000, Patocka et al. 2004, Rosenfeld et al. 2006, Wilson 2010), amelyet sematikusan a **2. ábrán** foglaltam össze:

1) első lépésben az enzim Ser oldallánca által indukált nukleofil támadás következtében kialakul egy átmeneti, ún. Michaelis komplex az AChE és OP molekula között.
2) a következő lépésben az OP-ról távozó csoport (R_3) kilépésével egy meglehetősen stabil kovalens kötés keletkezik az OP foszforatomja és az enzim Ser oldalláncának oxigén atomja között, aminek eredményeképp az enzim foszforilálódik.

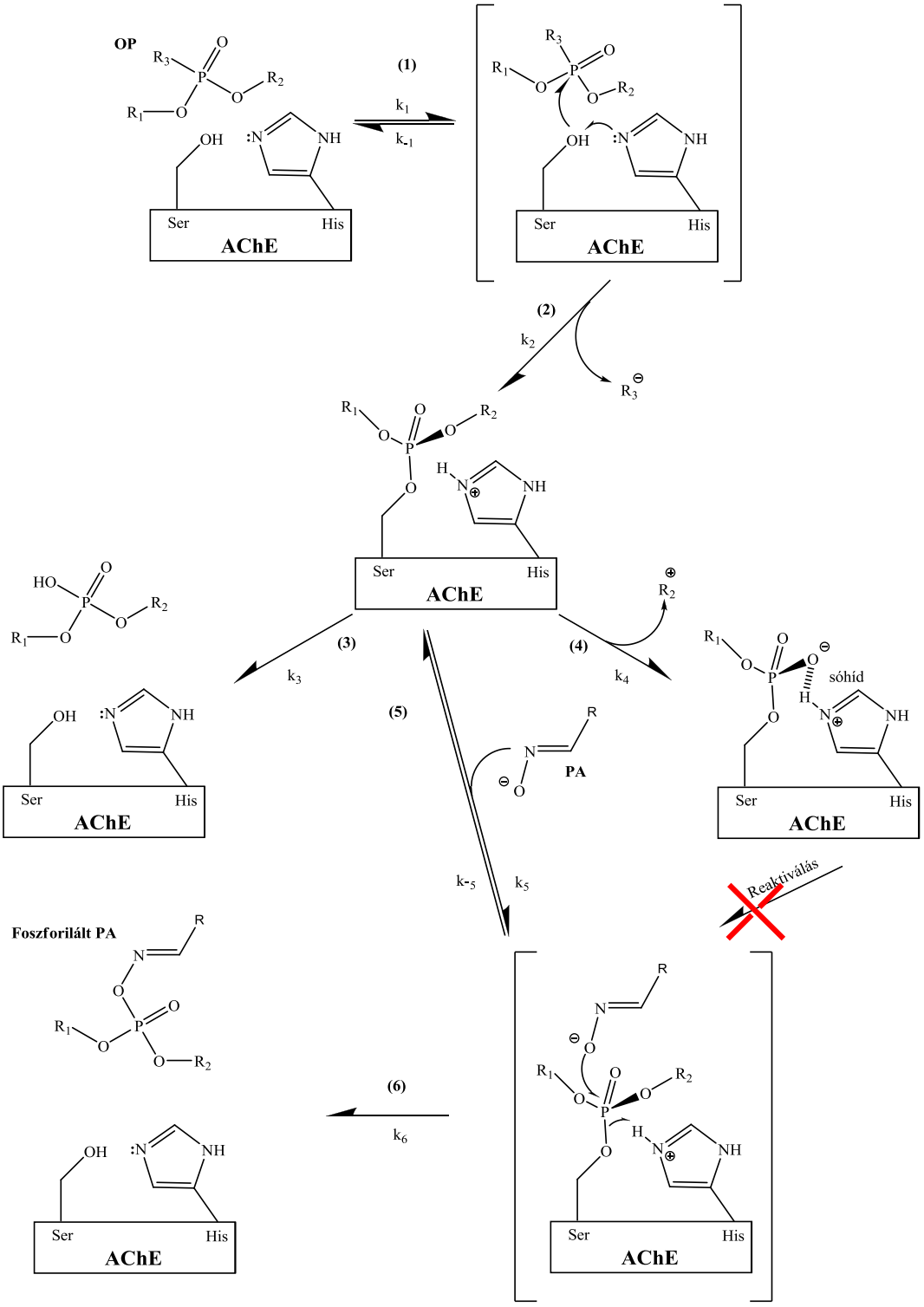
Az így foszforilált, és ezáltal katalitikusan inaktívvá váló enzim ezek után további folyamatokon mehet keresztül.

3) regeneráció spontán reaktiváció útján, amely kémiai reakció függ az enzim típusától, a hőmérséklettől, a pH-tól és nem utolsó sorban a foszforilációt kiváltó OP típusától is. Az foszforsav spontán hidrolízise

ugyanakkor nagyon lassú folyamat, gyakran napokat, sőt heteket vehet igénybe. Ezért az OP-kal történő expozíció során az enzim gyakorlatilag irreverzibilisen gátlódik és az enzim spontán reaktiváció útján történő regenerálódása elhanyagolható. Az enzimmolekulák aktivitásukat gyakorlatilag nem nyerik vissza, az aktív kolinészteráz eredeti szintje csak új enzimmolekulák szintézisével állhat helyre. Az enzim regenerálódásának egyik lehetséges módja az oximokkal történő reaktiváció. Ezek a vegyületek erősen nukleofil tulajdonságuknál fogva képesek az enzimet defoszforilálni.

4) Az „öregedés – aging” folyamata: a defoszforilált enzim a foszforsav-maradék típusának függvényében bizonyos idő elteltével kémiai átalakuláson megy keresztül, amely során a vegyületről ledisszociál egy alkil vagy alkoxi csoport (dealkilezés), és így egy egyszeresen szubsztituált, töltéssel rendelkező foszforsav-maradék keletkezik az enzimen belül (Masson et al. 2010). A reakciót követően az enzim reaktiválására már nincs lehetőség, ezért ez az időintervallum fontos szerepet játszik az OP-mérgezés esetén történő sikeres terápiás kezelések során. Ehhez a kémiai átalakuláshoz szükséges idő az egyes OP vegyületekre jellemző érték, ami elsősorban a szubsztitúciós alkil csoportok típusának a függvénye, és nagyon változó értékeket mutat: szoman esetében 2-4 perc, szarinnál 5 óra, tabun mérgezésnél 46 óra, míg VX esetében 50 óra (Worek et al. 2004, Worek et al. 2007).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



2. ábra: Az AChE OP-k által történő gátlásának és PA-kal való reaktiválásának mechanizmusa (Worek et al. 2004, Mercey et al. 2012).
Gátlás:(1)-[AChE-OP] komplex kialakulása; (2)-AChE foszforilálása; (3)-AChE spontán regenerálódása; (4)-öregedés,"aging" folyamata;
Reaktiválás:(5) [AChE-OP-PA] átmeneti komplex kialakulása; (6)-AChE reaktiválása

DOI:10.14753/SE.2014.1960

Az OP mérgezés tünetei

Az AChE gátlásának következtében endogén ACh felhalmozódás tapasztalható a képződés helyén, tehát a paraszimpatikus posztszinaptikus végkészülékben, a vegetatív ganglionokban, a neuromuszkuláris junkcióban valamint a KIR acetilkolinerg neuronjaiban. A felhalmozódó ACh hatásai a nikotinszerű és muszkarinszerű receptorok fokozott izgatása révén alakítja ki a klinikai tüneteket (Patocka et al. 2005). Az OP mérgezés során fellépő jellegzetes tüneteket a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat: Az OP mérgezés jellemző tünetei (Jokanovic et al. 2009, Tekes et al. 2010, Barelli et al. 2011).

Szerv	Hatás helye	Tünet(ek)
Húgyhólyag	muszkarinszerű ACh receptor	vizelési gyakoriság fokozódás, incontinentia
Szív- és érrendszer	muszkarinszerű ACh receptor	bradycardia, vérnyomásesés
	nikotinszerű ACh receptor	tachycardia, tranziens hypertonia
Szem	muszkarinszerű ACh receptor	látászavar, fokozott könnyelválasztás, miosis majd mydriasis
Nyálmirigy	muszkarinszerű ACh receptor	extrém nyálfolyás
Verejtékmirigyek	muszkarinszerű ACh receptor	extrém verejtékezés
Gyomor- és bélrendszer	muszkarinszerű ACh receptor	erős hasi görcsök, hasmenés, incontinentia, hányás, hányinger
Légzőrendszer	muszkarinszerű ACh receptor	bronchusgörcs, fokozott nyáktermelés, extrém orrfolyás
Központi idegrendszer	muszkarinszerű és nikotinszerű ACh receptor	izgatottság, szorongásos roham, coma, görcsök, a keringési és légzőközpont gátoltsága, hallucinációk, letargiás állapot, aluszékonyság
Harántcsíkolt izom	nikotinszerű ACh receptor	izomgörcsök, izombénulás, az izomzat egészére kiterjedő gyengeség, izomrángások

A mérgezés tünetei paraszimpatikus izgalmon, a neuromuszkuláris junkció kezdeti izgalmán (izomrángások), majd bénulásán valamint a KIR-ben felszaporodó acetilkolin hatásán (szorongás, fejfájás, görcsök, coma) alapulnak. A halál oka általában a légzés és a keringés összeomlása, amely mindkét esetben a KIR-i hatások (a medulláris légző és keringési központok bénulása) és perifériás hatások (bronchusgörcs, légzőizmok bénulása, perctérfogat csökkenése, bradycardia) kombinációjának eredményeképpen következik be (Kovács et al. 2007, Barelli et al. 2011). Az OP típusú vegyületeknek a fennt említett kolinerg krízisen kívül egyéb neurotoxikus hatásai is ismertek. Az egyik ilyen ismert hatás az organofoszfátok indukálta késleltetett neuropátia, amely kezdeti tünetei (szenzoros zavarok, ataxia, gyengeség) a méreg bejutása után 10-20 nappal jelentkeznek, majd az idő előrehaladtával súlyos, kezdetben petyhüdt, majd később spasticussá váló bénulások fejlődnek ki. A folyamat kialakulásában a neurotoxikus-észteráz enzim gátlása játszik fő szerepet. A hosszan tartó, folyamatos OP expozíciónak kitett egyének esetében figyelték meg a kolinerg krízis nélkül is kialakuló ún. krónikus organofoszfátok indukálta neuropszichiátriai zavarokat, amely tünetek szintén késleltetve jelennek meg a mérgezett egyénen és hosszú időn keresztül fenn is maradnak. Ez a betegség, mint gyűjtőfogalom a következő tünetekkel jellemezhető: kognitív zavarok (memóriazavar, csökkent tanulási képesség, figyelem csökkenése, koncentráció zavarok), kedélyállapot megváltozása (szorongás, depresszió, emócionális labilitás), krónikus kimerültség valamint extrapiramidális tünetek (dystónia, tremor, merev arcizomzat) (Bajgar 2005, Jokanovic et al. 2010).

A mérgezés terápiája

Érthető, hogy a mérgezettek hatékony terápiájára alkalmas ellenszerek iránt fokozott igény mutatkozik mind a sürgősségi betegellátásban, mind pedig a mérgezés akut szakaszában. Az ideális antidótum olyan vegyület volna, amely:

a) a szervezet minden olyan vízterébe eljut, ahova a mérgező anyag is
b) a méreg-anyaggal stabilabb kötést kell kialakítania a szervezetben található többi anyaghoz képest

c) nem metabolizálódik és az antidótum-mérgező anyag komplexe könnyen kiürül a szervezetből
d) az alkalmazott antidótum saját farmakológiai (toxikológiai) hatással nem rendelkezik

Az OP mérgezettek terápiájában napjainkban az ún. AFLOP (atropin – folyadék – oxigén – pralidoxim) módszer az elfogadott és hivatalos eljárás (Johnson et al. 2000, Kalasz et al. 2009a, Petroianu et al. 2012). A kezelés farmakológiai szempontból két különálló részre osztható:

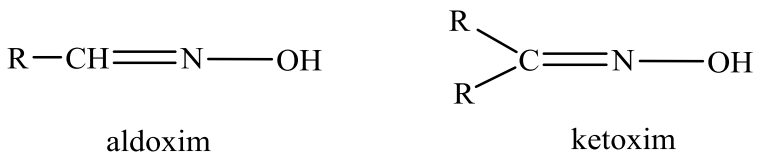
1) antikolinerg (atropin) szerek i.v. adagolása a felhalmozódó ACh hatásának ellensúlyozására. Az atropin i.v. adagolását (2-5 mg) azonnal meg kell kezdeni, majd lassan, a rövid hatástartama miatt 10 percenként ismételve folytatni kell egészen addig, amíg a verejtékezés és a profúz nyálfolyás meg nem szűnik, a bradycardia pedig tachycardiának ad helyet. Ugyanakkor az atropin a felhalmozódó ACh hatását csak a muszkarinszerű receptorokon gátolja.
2) enzimreaktivátorok alkalmazása a kolin-észteráz enzim és az OP-k kapcsolatának megszüntetésére. Jelenleg a klinikumban enzimreaktivátorként egyedüliként az oximok csoportjába tartozó, PA-kat alkalmazzák, mint pl. a PRX-mot az USA-ban, míg Európában főleg az OBX-mot, a methoximot , a HI-6 és a HLö-7 nevű vegyületeket (Kassa 2002). Az oximterápia ugyanakkor csak az OP-k öregedési folyamatának befejeztéig hatásos, mivel ezután már nem lehetséges az enzim reaktiválása a kötés stabilabbá válása miatt.

Az OP-k okozta mérgezések terápiás kezelése során ezen kívül a tüneti görcsök enyhítésére még diazepamot ill. vízben oldható prodrugját, avizafont, vagy lorazepamot adnak mint antikonvulzív szert (Rotenberg et al. 2003, Bajgar 2004, Petroianu et al. 2012).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

Oximok, Piridínium-aldoximok (PA-k)

Az oximok aldehidek és ketonok valamint hidroxil-amin kondenzációs reakciója útján keletkező vegyületek (megj.: oximok az első- és másodrendű nitrozo-alkánok tautomer átrendeződésével is keletkezhetnek) (Furka 1998) . Általános kémiai szerkezetük a **3. ábrán** látható.



3. ábra: Az oximok általános kémiai szerkezete.

Az OP mérgezések terápiájában alkalmazott PA-k kémiai szerkezetüket tekintve (nevükből kifolyólag) egy vagy több piridínium gyűrűt és az ehhez oldallánccként kapcsolódó egy vagy több oximcsoportot tartalmaznak. Léteznek ugyanakkor olyan oxim típusú enzimreaktivátorok is, amelyekben az oximcsoport egy imidazol ill. quinuklidin gyűrűhöz kapcsolódik (Primožič et al. 2004, Reiner et al. 2006).

A PA-mok enzimreaktiváló hatásukat annak köszönhetik, hogy az OP-kal gátolt enzim aktív centrumába belépve erőteljes nukleofil támadáson keresztül képesek leszorítani az enzim Ser oldalláncáról a foszforsavmaradékot; defoszforilálva ezáltal az enzimet **(2. ábra)**. A folyamat elején a PA molekula a piridínium-gyűrűben található, töltéssel rendelkező kvaterner nitrogén atomon keresztül az enzim aktív centrumában található acil-kötő helyéhez kapcsolódik, megfelelő pozícióba kerülve így a nukleofil támadás megindításához. A következő lépésben kialakul az [enzim – OP – PA] átmeneti komplex, majd a folyamat végén a foszforilált PA lehasad az enzimről, így szabaddá téve az enzim Ser oldalláncát, amely ezáltal visszanyeri katalitikus képességét .

Az OP mérgezések terápiás kezelésében jelenleg is használt PA a már klasszikusnak számító és a szakirodalomban arany standardként (Kuca et al. 2010) emlegetett piridínium-aldoxim, a PRX (Wilson et al. 1955) kémiai szerkezetét tekintve monopiridínium aldoxim, amely egyike a legrégebben használt vegyületeknek. Biszpiridínium-aldoxim szerkezetű vegyületek is ismertek, mint például a széles körben alkamazott OBX (Kuca et al. 2009, Thiermann et al. 2010), metoxim (Petroianu et al.

2006a, Kuca et al. 2009), trimedoxim (Poziomek et al. 1958) valamint az asoxim vagy HI-6 (Krummer et al. 2002, Lundy et al. 2006). Sajnos azonban ezek a PA-k nem hoztak áttörést a terápiában, mivel a növényvédőszerek és harci gázok széles repertoárját felvonultató OP-k elleni hatékonyságuk messze elmaradt a kívánatostól (Kuca et al. 2007b).

Az oximok terápiás és reaktiváló hatékonyságának növelése érdekében Kuča és munkacsoportja által elvégzett szerkezet–hatás vizsgálatok alapján a következő tényezők azok, amelyek jelentősen befolyásolják a PA típusú enzimreaktivátorok affinitását a gátolt AChE-re nézve (Kuca et al. 2006, Musilek et al. 2007b):

1) a kvaterner nitrogénatom jelenléte az enzimreaktivátor molekulában
2) a piridínium-gyűrűket összekötő lánc hossza és alakja
3) az oxim csoport jelenléte
4) az oxim csoport helyzete a piridínium-gyűrűn
5) az oxim csoport száma az enzimreaktivátor molekulán belül

Ennek fényében több száz, új PA típusú enzimreaktivátort szintetizáltak, amelyeket a szakirodalomban K-vegyületekként tartanak számon. Az újonnan szintetizált vegyületek lehetnek szimmetrikusak és aszimmetrikusak, kémiai szerkezetüket tekintve többségük a biszpiridínium monoaldoximok csoportjába tartozik, azaz a két piridínium-gyűrű egyikén egy aldoxim csoport található: K27 (Kuca et al. 2003c), K48 (Kuca et al. 2003a), K203 (Musilek et al. 2007d). Ugyanakkor vannak közöttük biszpiridínium biszaldoximok csoportjába tartozó – K74, K75 (Kuca et al. 2005a); valamint triszpiridínium triszaldoxim szerkezetű (K1000) vegyületek is. Farmakológiai tulajdonságaikat számos kutatócsoport széles körben vizsgálta mind *in vitro* (Kuca et al. 2003b, Kuca et al. 2004, Kuca et al. 2007a, Musilek et al. 2007d), mind pedig *in vivo* (Kassa et al. 2008b, Lorke et al. 2009, Kassa et al. 2009a, Karasova et al. 2011) körülmények között és amely vizsgálatok kimutatták, hogy ezek az újonnan szintetizált PA-k hatékonyabban képesek reaktiválni az OP-kal gátolt AChE enzimet. A kísérletek során a vizsgálandó vegyületeket nemcsak önmagukban alkalmazták, hanem más, a terápiás kezelés során alkalmazott anyagokkal, pl.atropinnal (Kassa et al. 2011b), illetve más enzimreaktivátor vegyületekkel együtt is (Kassa et al. 2011a, Bajgar et al. 2012). Az *in vitro* kísérletek magukba foglalták a PA-k affinitásvizsgálatát az OP-kal gátolt ill. az intakt AChE-re vonatkozóan, valamint a PA-k reaktiváló képességének a vizsgálatát.

In vivo kísérletsorozatok során meghatározták az egyes vegyületek LD_{50} értékét, terápiás indexüket, reaktivációs indexüket valamint neuroprotektív képességüket (Kuca et al. 2005b).

Az előzetes *in vitro* screening-vizsgálatok (toxikológiai, humán AChE vizsgálatok) alapján a legígéretesebb antidótumokat a **4. táblázatban** tüntettem fel. A molekulatömegek a halogenid ionok nélkül, a képletek alapján vannak feltüntetve. A szilárd sók bromid ellenionokat tartalmaznak.

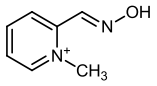
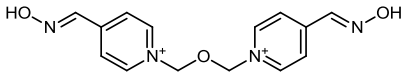
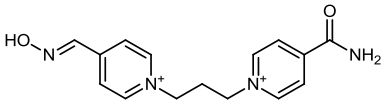
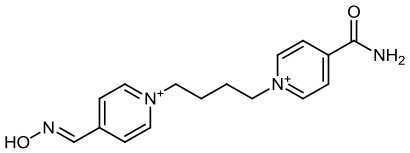
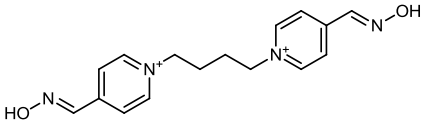
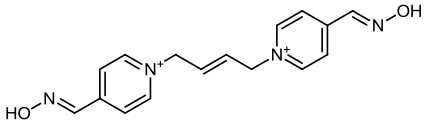
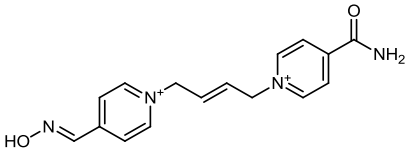
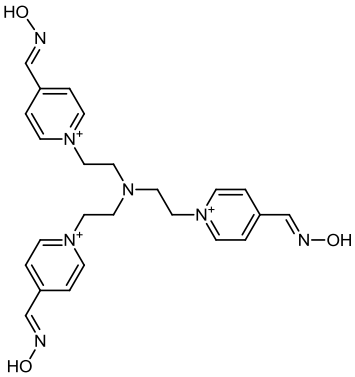
Az eddigi farmakológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a kis toxicitással rendelkező (Calic et al. 2006) aszimmetrikus, biszpiridínium aldoximok csoportjába tartozó K27 és K48 vegyületek paraoxon, metil-paraoxon, diizopropil-fluorfoszfát mérgezések esetén nagyon hatékonyak. Képesek *in vitro* kivédeni az OP-k okozta gátló hatást ezáltal védve és fenntartva az AChE biológiai aktivitását (Petroianu et al. 2006a, Lorke et al. 2008, Petroianu et al. 2012), valamint *in vivo* mérgezést követően növelték az állatok túlélési esélyeit az eddig a terápiában alkalmazott PA-mokhoz képest (Petroianu et al. 2006b, Lorke et al. 2008, Nurulain et al. 2009).

A szimmetrikus, biszpiridínium aldoximokat képviselő K74 és K75 vegyületek esetében az előzetes screening vizsgálatok azt mutatták, hogy tabunnal történő mérgezés esetén hatékonyabban reaktiválták az AChE-t mint a PRX, az OBX, az előbb említett K27 és K48 mind *in vitro* (Musilek et al. 2007a, Kuca et al. 2007a), mind pedig *in vivo* állatkísérletekben (Kassa et al. 2008a).

A hatékonyabb enzimreaktivátorok kutatása közepette Musilek és mts.-inak sikerült szintetizálniuk a jóval hidrofilebb K203 jelű [(*E*)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide] vegyületet. Kémiai szerkezetét tekintve aszimmetrikus biszpiridínium aldoxim, a két piridínium-gyűrűt egy 4 atomos *(E)*-but-2-ene lánc köti össze, aminek következtében tabun mérgezés esetén reaktiváló képessége jobb, toxicitása pedig kisebb lett a K74 és K75 jelű vegyületekhez képest (Musilek et al. 2007c, Musilek et al. 2007d). A K203 eddigi *in vitro* és *in vivo* screening vizsgálatai azt mutatják, hogy tabun mérgezés esetén a leghatékonyabb AChE reaktivátor (Kassa et al. 2008c, Kassa et al. 2009b, Kovarik et al. 2009) az eddig használt PA-k közül.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

4. táblázat: A legígéretesebb piridínium aldoximok kémiai szerkezete.

№	Név	Kémiai szerkezet	Összegképlet	Mw
1	PRX		$C_7H_9N_2O$	137,18
2	OBX		$C_{14}H_{16}N_4O_3$	288,34
3	K27		$C_{15}H_{18}N_4O_2$	286,37
4	K48		$C_{16}H_{20}N_4O_2$	300,4
5	K74		$C_{16}H_{20}N_4O_2$	300,4
6	K75		$C_{16}H_{18}N_4O_2$	298,38
7	K203		$C_{16}H_{18}N_4O_2$	298,38
8	K1000		$C_{24}H_{30}N_7O_3$	464,61

A PA-k farmakokinetikai paramétereinek meghatározását különböző biológiai mátrixokból az elmúlt évtizedekben igen széles körben kutatták a témával foglalkozó tudósok annak érdekében, hogy az így kapott adatokból még pontosabb képet kapjanak ezen vegyületek szervezetbeni sorsáról, enzimreaktiváló képességeikről különböző OP mérgezések esetén és amely adatokat sikeresen alkalmazva még hatékonyabb és biztonságosabb terápiás eljárásokat dolgozzanak ki. A szakirodalomban számtalan analitikai eljárást találhatunk ezzel kapcsolatban, azonban az egyik legelterjedtebb és legalkalmasabb eljárás az ilyen fajta mérések kivitelezéséhez a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárások, közülük is a fordított fázisú nagyhatékonyságú kromatográfiás eljárások (RP-HPLC). A PA-k a piridínium-gyűrűben található kvaterner nitrogén atom(ok)nak köszönhetően szöveti pH-n egy (monopiridínium vegyületek) vagy két (biszpiridínium vegyületek) pozitív töltéssel rendelkeznek. Ha az ilyen pozitív töltéssel rendelkező vegyületeket RP-HPLC segítségével szeretnénk elválasztani egymástól ill. a biológiai mátrix zavaró csúcsaitól, akkor mindenképpen ionpárképző alkalmazása szükséges (Horvath et al. 1977). A jelenlegi terápiás kezelésekkor alkalmazott PRX elválasztása, terápiás dózisának megállapítása során az egyik leggyakrabban használt ionpárképző az 1-oktánszulfonsav (Sakurada et al. 2003). Ugyancsak ezt az ionpárképzőt alkalmazták Cassel ill. Lundy és mtsai a HI-6 farmakokinetikai tulajdonságainak meghatározására vér és agyszövetből (Cassel et al. 1997, Lundy et al. 2005), valamint Paddle és Dowling az oximok (PRX, OBX, HI-6) bomlástermékeinek vizsgálata során (Paddle et al. 1993). Utley ugyanezeknek a vegyületeknek a kromatográfiás vizsgálatakor ionpárképzőként lauril-szulfátot alkalmazott (Utley 1987), míg az OBX humán plazmából történő meghatározása során Stenzel és mtsai, valamint Pohjola és Harpf esetében a mozgó fázis 1-heptánszulfonsavat tartalmazott (Pohjola et al. 1994, Stenzel et al. 2007). Az újonnan szintetizált PA-k (K-vegyületek) farmakokinetikai paramétereinek meghatározása a legtöbb kísérletsorozatban C8-as (Kalasz et al. 2006, Tekes et al. 2006, Petroianu et al. 2007) ill. C18-as (Benkő et al. 2007, Gyenge et al. 2007, Kalasz et al. 2008) álló fázisokon történt, míg az alkalmazott ionpárképző ebben az esetben is az 1-oktánszulfonsav volt.

A RP-HPLC módszerek mellett számos olyan mérési technológiával is találkozhatunk a K vegyületek vizsgálatát illetően a szakirodalomban, amelyek mellőzik az ionpárképzők

használatát, mint pl. az ioncserés kromatográfia (Singh et al. 2007), HPLC-MS (Kalasz et al. 2006, Tekes et al. 2006, Okuno et al. 2008) vagy a kapilláris elektroforézisre épülő technikák (Kalasz et al. 2009b).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunkon belül nemzetközi együttműködés keretében a következő feladatokat tűztem ki célul:

a) a legígéretesebb K-vegyületek költséghatékony, általánosan használható, megfelelő érzékenységű bioanalitikai mérési módszereinek kifejlesztése
b) ezen vegyületek logP és teljes poláris felszín területe (TPSA) értékeinek a meghatározása
c) a kifejlesztett fordított fázisú, nagyhatékonyságú kromatográfiás (RP-HPLC) módszer optimalizálása és validálása UV és elektrokémiai (EC) detektálás esetén
d) az optimalizált és validált kromatográfiás módszer alkalmazása a K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározására patkány és beagle kutya modellen
e) a K203 vér-agy gáton (BBB) történő penetrációjának vizsgálata kromatográfiás módszerekkel patkány és beagle kutya modelleken

4. ANYAGOK és MÓDSZEREK

4.1. *In silico* vizsgálatok: TPSA és logP értékek meghatározása

A vizsgált piridínium aldoximok kromatográfiás viselkedését és farmakokinetikai jellemzőit meghatározó fiziko-kémiai paramétereket, a logP és a TPSA értékeket a Pallas program segítségével (Pallas 3.8.1.1, CompuDrug International, Inc., Sedona, USA) végeztük.

4.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok

4.2.1. Kromatográfiás rendszer

Anyagok: A PRX, OBX, K27, K48, K74, K75, K203, K1000 K.Kuča (Cseh Nemzetvédelmi Egyetem, Hradec Králové, Cseh Köztársaság) ajándékaként kaptuk.

A vizsgálatainkhoz használt JASCO (Tokió, Japán) kromatográfiás rendszer PU-1580 pumpából, DG-2080-54 gázmentesítő készülékből, AS-2057 Plus automata injektorból, UV-1575 UV-Vis és MD-1510 diódasoros detektorokból állt. Az amperometriás/elektrokémiai módszerrel végzett detektálásokhoz INTRO (Antec; Leyden, Zoeterwoude, Hollandia) és DECADE (Antec; Leyden, Zoeterwoude, Hollandia) típusú detektorokat használtunk.

Az elválasztáshoz fordított fázisú Agilent Zorbax RX-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5-µm) oszlopot használtunk, amely elé minden esetben azonos töltetű előtétoszlopot csatlakoztattunk (12,5 mm × 4,6 mm) (Kromat Kft, Budapest) az álló fázis élettartamának növelése céljából. Az álló fázis termosztálási hőmérséklete 35 °C volt. A mozgó fázis áramlási sebessége 1 ml/perc volt.

A mozgó fázis minden esetben vizes foszfát-citrát puffer: acetonitril (AcN), 10:2 arányú keveréke volt. Ennek elkészítéséhez a következő összetevőket használtuk:

50 mM dinátrium hidrogén foszfát dihidrát, $Na_2HPO_4.2H_2O$ (M_w= 177,99)

50 mM citromsav monohidrát (M_w= 210,14)

0,027 mM dinátrium etilén diamin tetraacetát (Mw= 372,24)

1-oktánszulfonsav nátrium só változó mennyisége (M_w= 216,27)

Az összes mozgó fázist alkotó, analitikai tisztaságú összetevőt a Sigma-Aldrich Kft-től (St.Louis. USA) rendeltük.

A vizes foszfát – citrát puffer pH-ját 85 %-os foszforsavval (H_3PO_4; M_w= 100,46) (Finomvegyszer Szövetkezet, Budapest, Magyarország) 3,7-re állítottuk be (inoLab pH Level 2, WTW GmbH, Germany).

A mérések során kapott kromatogramokat Borwin (JMBS, Le Fontanil, Franciaország) 1.21 és 1.5 kromatográfiás programmal regisztráltuk.

A retenciós vagy kapacitási faktor (k') értéknek meghatározása:

Az ionpárképzők mennyiségének és minőségének hatását a vizsgált piridínium-aldoximok retenciós idejére a k' retenciós faktor értékek segítségével vizsgáltuk, amelyet következő képlet alapján számoltunk:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

ahol „t_0" a holtidő, azaz a késleltetés nélkül eluálódó komponens retenciós ideje, a „t_R" az adott vegyület retenciós ideje.

4.2.2. A HPLC módszer validálása

A K203 biológiai mintákból történő mennyiségi meghatározására kidolgozott optimalizált módszer validálását az FDA (Food and Drug Administration; Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation; 2001) és az EMA (European Medicines Agency – Guidline on Validation of Bioanalytical Methods; 2009) ajánlása alapján végeztük el.

A validálási paramétereket a korábbi vizsgálatokban optimálisnak talált mozgófázis segítségével határoztuk meg, amely a következő összetevőket tartalmazta:

Vizes foszfát – citrát puffer : AcN 10:2 arányú keveréke

50 mM $Na_2HPO_4.2H_2O$

50 mM citromsav monohidrát

0,027 mM EDTA

2,5 g/l OSA

A vizes foszfát – citrát puffer pH-ját 3,7-re 85 %-os H_3PO_4-al állítottuk be.
A validálási folyamat során a következő paramétereket határoztuk meg:

4.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity):

Legalább 6 különböző kontroll állatból származó szérum, CSF és agy mintákat illetve K203 különböző mennyiségeivel spike-olt mintákat készítettünk és összehasonlítottuk, hogy a vizsgálandó vegyületünk retenciós idejénél van-e valamilyen zavaró háttércsúcs a kontroll mintákban.

4.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat

A csúcstisztaság megállapításához a vizsgált vegyület 3, az MD-1510 diódasoros detektorral (DAD) felvett spektrumát használtuk; egyiket a csúcs maximumán, a másik kettőt a csúcs két inflexiós pontjánál vettük fel. A spektrumalakzatok hasonlósági fokát, azaz a csúcstisztasági faktort a Borwin PDA Software 1.5 segítségével határoztuk meg, amelyet matematikailag a következőképpen adhatunk meg:

$$\text{tisztasági faktor} = \frac{10^3 \cdot \left[\sum x.y - \left(\frac{\sum x. \sum y}{n} \right) \right]^2}{\left[\sum x^2 - \left(\frac{\sum x. \sum x}{n} \right) \right] \cdot \left[\sum y^2 - \left(\frac{\sum y. \sum y}{n} \right) \right]}$$

ahol *x* és *y* a két spektrumon az azonos hullámhosszon mért abszorbancia értékek, *n* pedig az adatpontok száma. A 0 tisztasági faktor azt jelzi, hogy egyáltalán nincs hasonlóság a két spektrum között, míg az 1000-es értéknél teljes azonosságról beszélhetünk.

4.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision) meghatározása

A vizsgálandó vegyülettel (K203) spike-olt vak mintákból legalább 3 koncentráció értéket (a kalibrációs tartomány egy-egy alacsony, közepes és magas koncentráció értékét) készítettünk, majd mindegyik koncentrációhoz tartozó mintát minimum ötször mértük le, beleértve a vak mintát is. Megfelelő torzítatlanság esetében a mért értékek átlaga ±15%-al térhet el a várt értéktől, míg a megfelelő precizitás esetében az RSD% értéke nem haladhatja meg a 15%-ot.

4.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity):

A kalibrációs görbe felvételéhez minden egyes biológiai mátrix esetében a vakmintán kívül minimum további 7, a vizsgálandó vegyülettel különböző koncentrációban spike-olt kalibrációs standardot készítettünk. A kapott csúcsok területeit ábrázoltuk a koncentráció függvényében, majd a kapott eredményekből a legkisebb négyzetek módszere segítségével (Microsoft Excell 2003) kiszámítottuk a regressziós együtthatót a komponens koncentrációja függvényében. Az ajánlások alapján a mérési módszer akkor jó, ha a regressziós együttható értéke $R^2 \geq 0{,}98$.

4.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection, LOD) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation, LOQ)

A LOD és LOQ értékek meghatározásánál minimum 6 különböző állatból származó vakmintát készítettünk a zaj megállapításához. Ezután mindkét detektor esetén (UV, EC) az alacsonyabb koncentráció tartományban a K203-al spike-olt vak mintákból készített standardokra kapott válaszjelek és a zaj segítségével az alábbi módon számoltuk ki a LOD és LOQ értékeket:

$$LOD = \frac{3 \times jel[mm]}{\frac{zaj[mm]}{2}} \qquad LOQ = \frac{10 \times jel[mm]}{\frac{zaj[mm]}{2}}$$

4.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery)

A visszanyerési tényező értékét az alábbi képlet alapján számoltuk és százalékos alakban adtuk meg:

$$R(\%) = \left(\frac{c_i}{c_{ref}}\right) \times 100$$

ahol c_i a mért érték; c_{ref} pedig a referencia vagy várt érték.

4.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness)

A rugalmassági és zavartűrési vizsgálatok során az előre optimalizált és megadott működési paramétereket (szerves oldószer mennyisége a mozgó fázisban, a mozgó fázis pH-ja) külön-külön kis mértékben az előre meghatározott tartományon belül (±5 %), szándékosan megváltoztattuk és néztük az elválasztásra gyakorolt hatását.

4.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok

A stabilitás vizsgálatok során mind a standard vegyületet (K203), mind a standardot ismert koncentrációban tartalmazó biológiai mintákat egyaránt különböző erős savakban (PCA, TFA, HCl), különböző hőmérsékleteken (4 C° és 25 C°) tároltuk, majd a kromatogramokból számolt koncentráció értékeket a kiindulási (0 perces) értékekhez viszonyítva számoltuk ki a stabilitásban bekövetkező változásokat, amelyeket %-osan adtunk meg.

4.3. Állatmodellek

4.3.1. Patkánymodell

Kísérleteinket hím Wistar (Toxicoop, Budapest) (állatsúly:200g ± 10g) patkányokon végeztük. Az állatokat *ad libitum* víz és táp, normál - 12 órás - fény-sötét ciklusú standard (hőmérséklet: 22-24 °C; páratartalom: 55 ± 6 %) körülmények között tartottuk. az állatvédelmi és tartási szabályok betartásával; 86/509/ECC.

Az állatokat intramuscularisan (i.m.) egyszeri 50 μmol/200 g K203 vegyülettel kezeltük illetve a dózisfüggés kinetikájának a megállapításához 3-50 μmol/200 g tartományban 3 különböző dózisban K203 anyaggal. A vegyületet frissen desztillált vízben oldottuk fel közvetlenül a kezelés előtt. A kontroll csoport azonos térfogatú (0,2 ml) oldószeres kezelést kapott. Mindegyik csoportba (kontroll ill. kezelt) 5-5 állatot soroltunk.

A kezelést követő meghatározott mintavételi időpontokban (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 és 240 percnél) éteres narkózist alkalmazva (állatkísérleti engedély száma: 1810/003/2004 ÁNTSz, Budapest) a belső szemzugon át elvéreztettük az állatokat majd a *foramen occipitale magnum*-on át liquor mintát vettünk.

A vért 1600 g-n, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk (Janetzky-K70, Berlin, Németország) és a felülúszóban található szérum frakciót mintavételi csövekbe gyűjtöttük. A liquor mintákat (50-100 µl) Eppendorf mintavételi csövekbe gyűjtöttük. A liquor vételt követően a koponyatető feltárása után jéghideg alumínium lapon távolítottuk el az agyrészleteket (frontális cortex, hypothalamus, hippocampus, striatum, agytörzs, nyúltvelő ill. a szemeket). A gerincoszlop thoracalis tájékáról kb 1 cm-es darabot metszettünk ki, majd a gerinccsatorna feltárásával izoláltuk a gerincvelői szakaszt. A mintákat súlymérés után a felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

4.3.2. Kutyamodell

A kísérleteinket beagle (állatsúly: 14 ± 2 kg) kutyákon végeztük az Országos „Frederic Joliot Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézetében. Az állatokat *ad libitum* víz és táp, normál - 12 órás - fény-sötét ciklusú standard (hőmérséklet: 22-24 °C; páratartalom: 55 ± 6 %) körülmények között tartottuk az állatvédelmi és tartási szabályok betartásával; 86/509/ECC.

A kezelést megelőzően az állatokat elaltattuk, majd a vérvételhez a bal oldali mellső felszíni lábvénába kanült helyeztünk. Hasonlóan a CSF kinyeréséhez a IV. agykamrába is kanült helyeztünk be, amelyet a *foramen occipitale magnum*-on át vezettünk ki és a mintavételezésig lezártuk, majd az állatokat felébresztettük. Az altatást minden esetben ketamin-HCl (1,5 mL), 2%-os Xylazine (0,5 mL) és 10 mg Seduxen (2,0 mL) elegyével végeztük. Az ébresztéshez 0,4 mL antisedan-t használtuk. (állatkísérleti engedély száma: 22.1/610/4/2010 Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal; Budapest)

Az állatokat i.m. egyszeri 3 és 50 µmol/200 g tartományban 3 különböző dózisban K203 vegyülettel kezeltük. A vegyületet frissen desztillált vízben oldottuk fel közvetlenül a kezelés előtt. A kontroll csoport azonos térfogatú (0,2 ml) oldószeres kezelést kapott.

A kezelést követő meghatározott mintavételi időpontokban (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 és 240 percnél) vért, míg 0, 15, 30, 60, 120 és 240 percnél pedig CSF mintát vettünk. A vért, a patkány vérmintáihoz hasonlóan 1600 g-n, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk (Janetzky-K70, Berlin, Németország) és a felülúszóban található szérum frakciót mintavételi csövekbe gyűjtöttük. A CSF mintákat 2 ml-es vakuténerekbe gyűjtöttük.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

A kezelést követően az állatokat véglegesen elaltattuk, majd a kezelést és a mintavételt végző állatorvos vezetésével az egyes agyrészleteket is feltártuk és mintát vettünk. A mintákat súlymérés után a felhasználásig t= -80 °C-on tároltuk.

4.4. Mintaelőkészítés

A mintaelőkészítés során a mintatartó edényekben lévő, jeges vízfürdőben tárolt biológia mintákat 0,8M-os perklórsav (PCA) hozzáadásával fehérjementesítettük; szérum esetében 1:19 (50 µL szérum + 950 µL 0,8M PCA) míg CSF esetében 1:4 (50 µL CSF + 200 µL 0,8M PCA) arányban. A teljes agymintákat, az agyrészleteket, a gerincvelőt illetve a szemeket négyszeres mennyiségű 0,8M PCA hozzáadása után homogenizáltuk. Ezt a folyamatot a teljes agyminták és a szemek esetében Janke&Kunkel Ultra Turrax T25 késes homogenizáló készülékkel (IKA Labortechnik, Staufen, Németország), 20.000 rpm/perc fordulatszámon, 1 percig; míg az agyrészletek és a gerincvelő esetében Labsonic 2000 ultrahangos homogenizáló készülékkel (Labsonic 2000, B.Braun AG., Melsungen, Németország) 20 másodpercig végeztük. Ezután a mintákat Eppendorf centrifugával (A. Hettich Mikro 22 R (V 3.02), Tuttlingen, Németország) 14 000g-n, 20 percig, 4 ^{0}C-on centrifugáltuk. Az így kapott felülúszók pH-ját dietilamin-foszforsav (1:2 v/v) puffer segítségével 2,0-re állítottuk be (1:9 arányban, 10-szeres hígításban). A továbbiakban az így kapott felülúszókból 50 µl-t injektáltunk az RP-HPLC mérések során.

5. EREDMÉNYEK

5.1. *In silico* vizsgálatok; TPSA és logP értékek meghatározása

A Pallas program segítségével számolt TPSA és logP értékeket az **5. táblázatban** foglaltam össze:

5. táblázat: A K-vegyületek Pallas programmal számolt TPSA és logP értékei (Szegi et al. 2010).

Név	TPSA (Å^2)	logP
PRX	36,47	-2,56
OBX	82,17	-2,87
K27	83,44	-2,84
K48	83,44	-2,79
K74	72,94	-2,36
K75	72,94	-2,46
K203	83,44	-3,04
K1000	112,65	-2,3

5.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok

5.2.1. A piridínium aldoximok elválasztásának optimalizálása

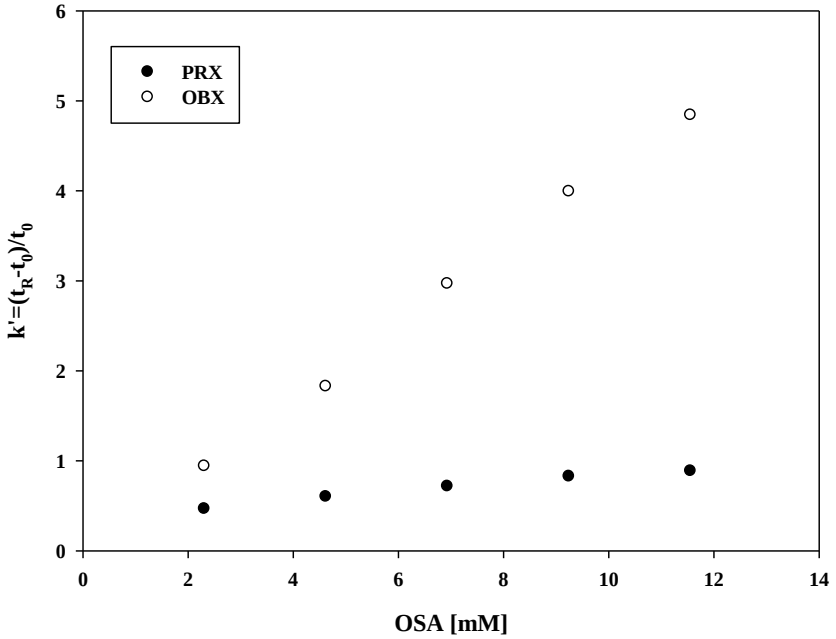
5.2.1.1. Módszerfejlesztés

A **4. és 5. táblázat**ban található vegyületek szerkezeti képletei és a logP értékek alapján is megállapítható, hogy ezek a vegyületek rendkívül hidrofil karakterűek. A piridínium gyűrűik, a bennük található kvaterner nitrogén atomoknak köszönhetően, egy-egy töltéssel rendelkeznek, ami szöveti pH-n kettő pozitív töltésnek felel meg. Ennek következtében az RP-HPLC segítségével történő mérésük nehézségekbe ütközik.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

A két állandó pozitív töltésük ismeretében vizsgáltuk különböző ionpárképzők és ezek mennyiségének a hatását az egyes vegyületek retenciós idejére, így sikerült olyan retenciós időket elérni, ahol a zavaró háttércsúcsoktól kifogástalanul elválasztódnak a vizsgálni kívánt K-vegyületek. Az ionpárképző retenciós időre gyakorolt hatását a k' értékkel jellemeztük.

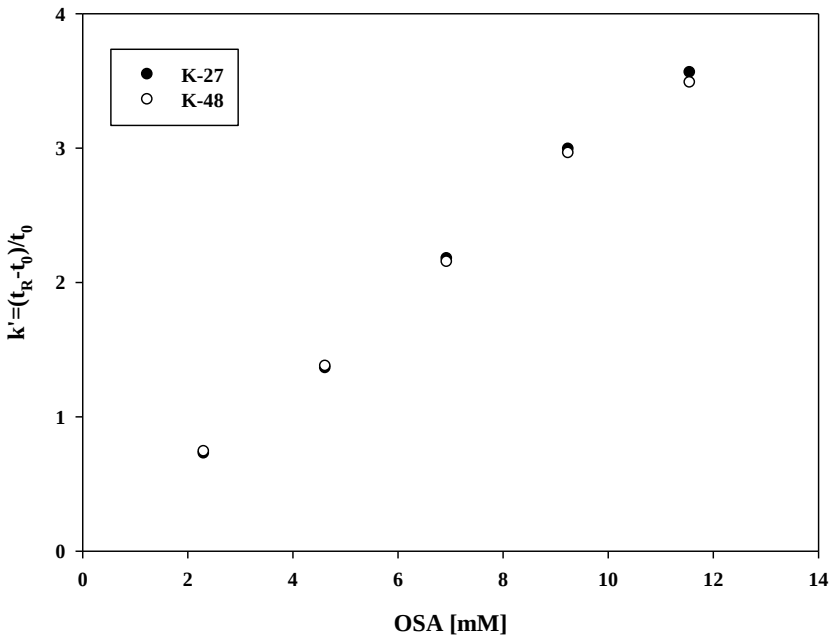
Az OSA, mint a legjobbnak talált ionpárképző hatásának koncentráció-függését az egy piridínium-gyűrűt tartalmazó PRX és a két piridínium-gyűrűs szerkezetű OBX esetében az **4. ábra** mutatja.



4. ábra: PRX és OBX k' értékei az OSA változó mennyiségének a függvényében (Szegi et al. 2010).

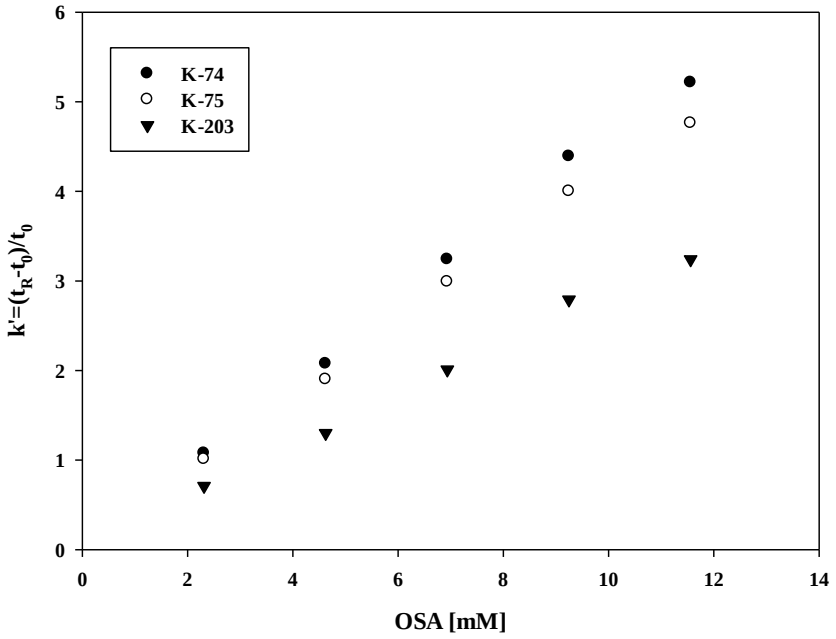
A K27 és a K48 esetében (melyek szerkezetileg csak abban különböznek, hogy a két piridínium-gyűrűt propilén, ill. butilén-lánc köti össze) az OSA koncentrációjának a növelése azonos hatású volt (**5. ábra**).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



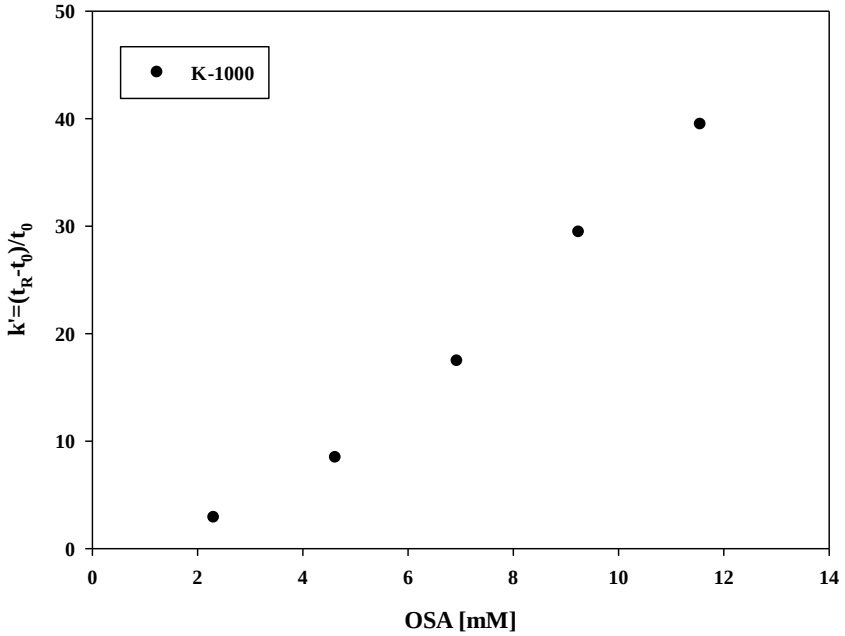
5. ábra: K27 és K48 k' értékei az OSA koncentráció függvényében (Szegi et al. 2010).

A K74, a K75 és a K203 esetén a retenciós idő függését az ionpárképző koncentrációjától a **6. ábrán** foglaltam össze.



6. ábra: K74, K75 és K203 k' értékei az OSA koncentráció függvényében (Szegi et al. 2010).

Az egyedüli triszpiridínium-triszaldoxim szerkezetű K1000 retenciós idejének ionpárképző koncentráció függését a **7. ábrán** mutatom be.



7. ábra: K1000 k' értékei az OSA koncentráció függvényében (Szegi et al. 2010).

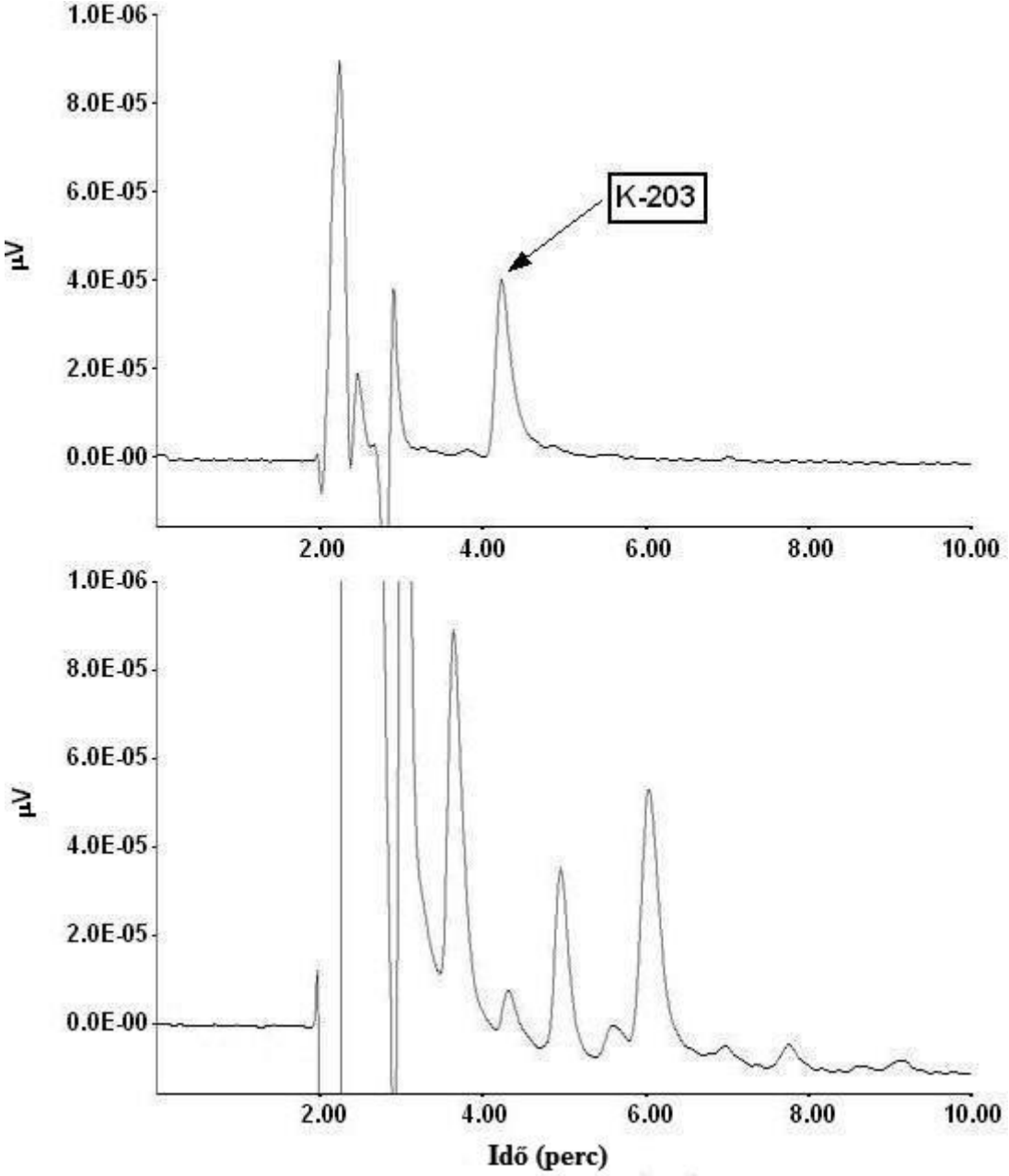
Az előző ábrákon szereplő vegyületek retenciós ideje és az OSA mennyisége közti összefüggést leíró egyenes egyenleteinek jellemző értékeit a **6. táblázat**ban foglaltam össze.

6. táblázat: Az OSA koncentráció és a k' értékek összefüggése (Szegi et al. 2010).

Név	y0 konstans; 0% (y=0) ionpárképző koncentrációra extrapolálva [(y = ax + y0)]	Az egyenes meredeksége (a) [(y = ax + y0)]
Pralidoxim	0,0604	0,0710
Obidoxim	-0,0884	0,4117
K27	-0,0373	0,3000
K48	-0,0035	0,2927
K74	-0,0212	0,4418
K75	0,0073	0,4015
K203	0,1175	0,2713
K1000	-4,7517	3,1754

DOI:10.14753/SE.2014.1960

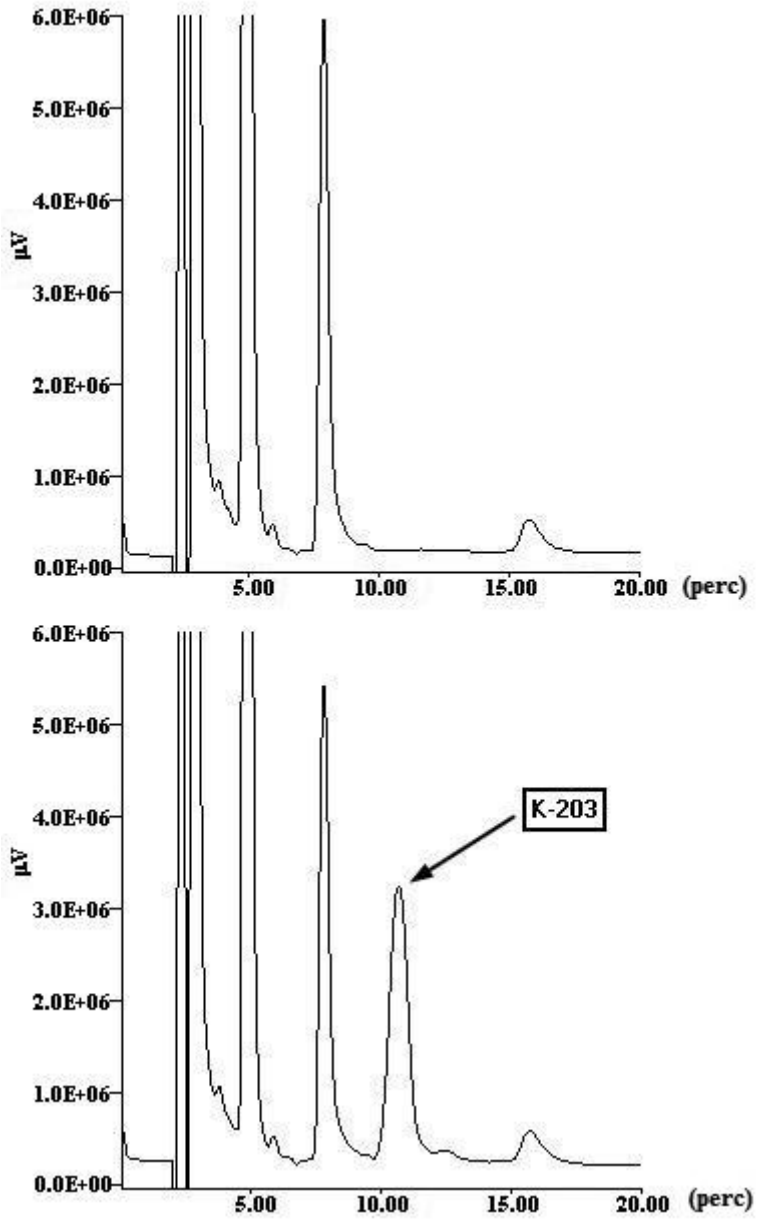
Az **8. ábrán** a módszer optimalizálás során alkalmazott OSA-ACN páros alkalmazásával készült kromatogramok láthatók. A farmakokinetikai vizsgálatokra kiválasztott K203 a biológiai minta zavaró háttércsúcsaival egy időben eluálódott az oszlopról.



8. ábra: Standard K203 oldat (felső) és kontroll patkány agy (alsó) kromatogramja 1 g/l OSA-t alkalmazva (Szegi et al. 2010).

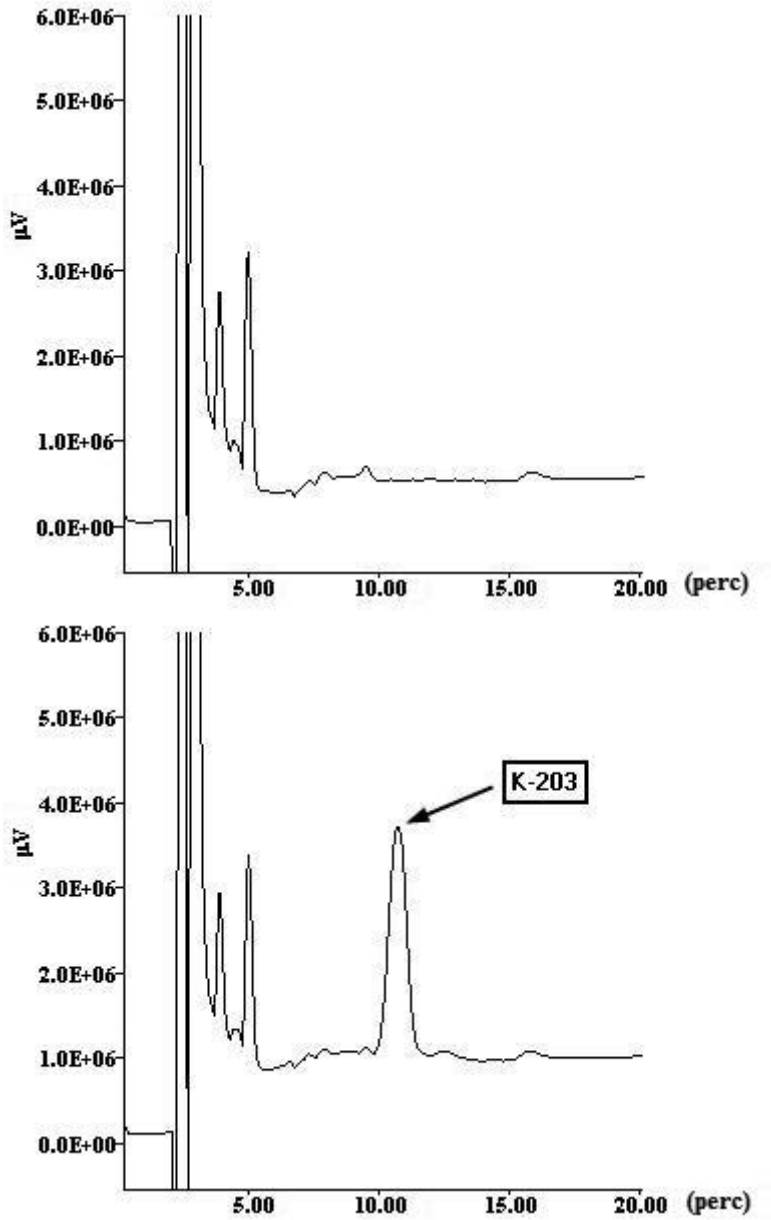
DOI:10.14753/SE.2014.1960

Ahogyan azt a **4.-7. ábrák** is mutatják, az OSA koncentrációjának növelése a retenciós időket nagyon megnöveli. 2,5 g/l OSA alkalmazásával az eluensünk már megfelelő a K203 elválasztására, kvantitatív és érzékeny meghatározására, hiszen jól elválasztható a biológiai mátrix zavaró csúcsaitól. Az optimalizált módszerrel kapott kromatogramokat patkány szérum, CSF, agyhomogenizátum és szem esetében a **9., 10., 11., és 12. ábrán** mutatjuk be.



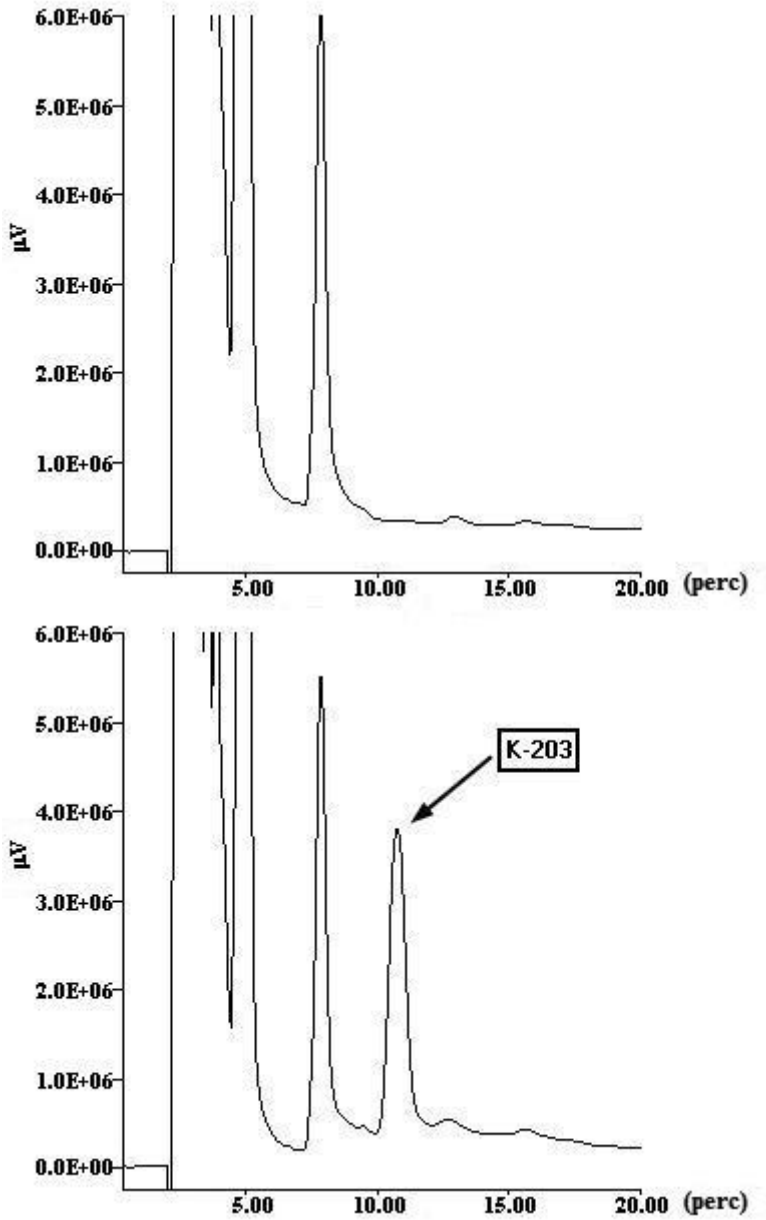
9. ábra: Kontroll patkány szérum (felső), és az 1 µg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány szérum (alsó) kromatogramja.
A mozgó fázis 2,5 g/l OSA-t tartalmazott. A mérések elektrokémiai detektálással történtek (Eox= +0,8 V, érzékenység: 2 nA/V).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



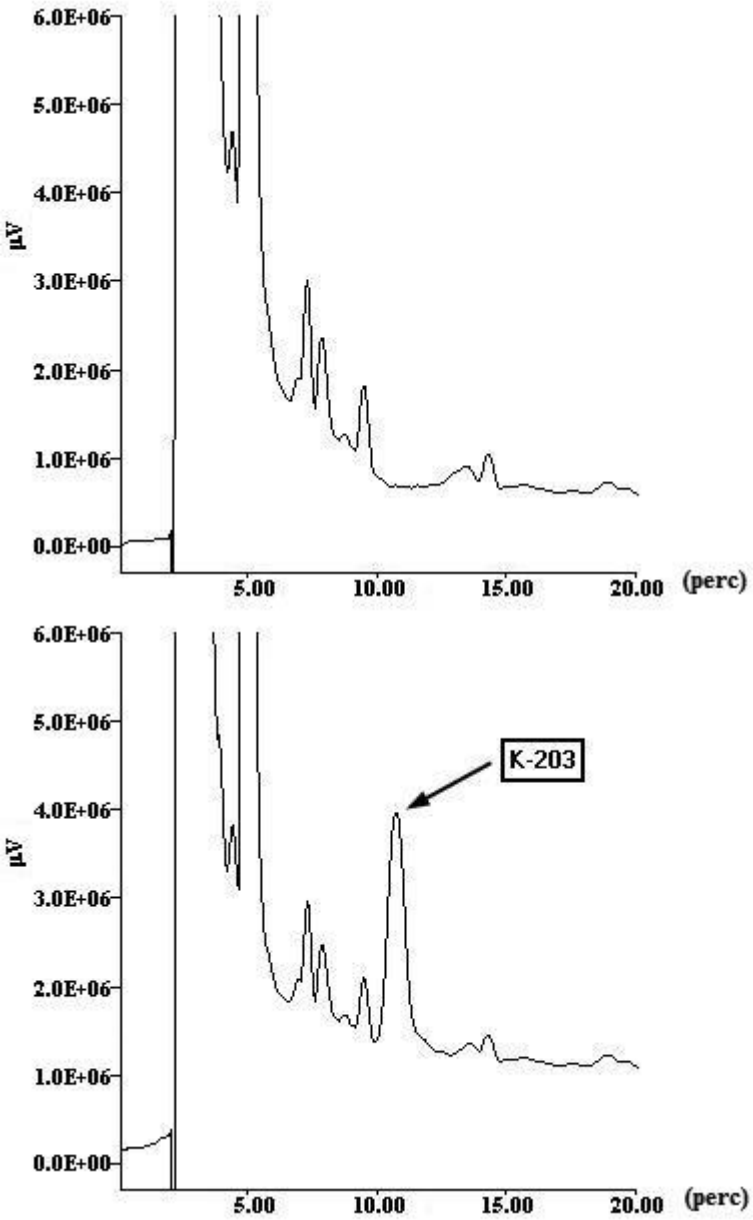
10. ábra: Kontroll patkány CSF (felső), és az 1 µg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány CSF (alsó) kromatogramja.
A mozgó fázis 2,5 g/l OSA-t tartalmazott. A mérések elektrokémiai detektálással történtek (E_{ox}= +0,8 V, érzékenység: 2 nA/V).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



11. ábra: Kontroll patkány agy (felső), és az 1 µg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány agy (alsó) kromatogramja.
A mozgó fázis 2,5 g/l OSA-t tartalmazott. A mérések elektrokémiai detektálással történtek (E_{ox}= +0,8 V, érzékenység: 2 nA/V).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



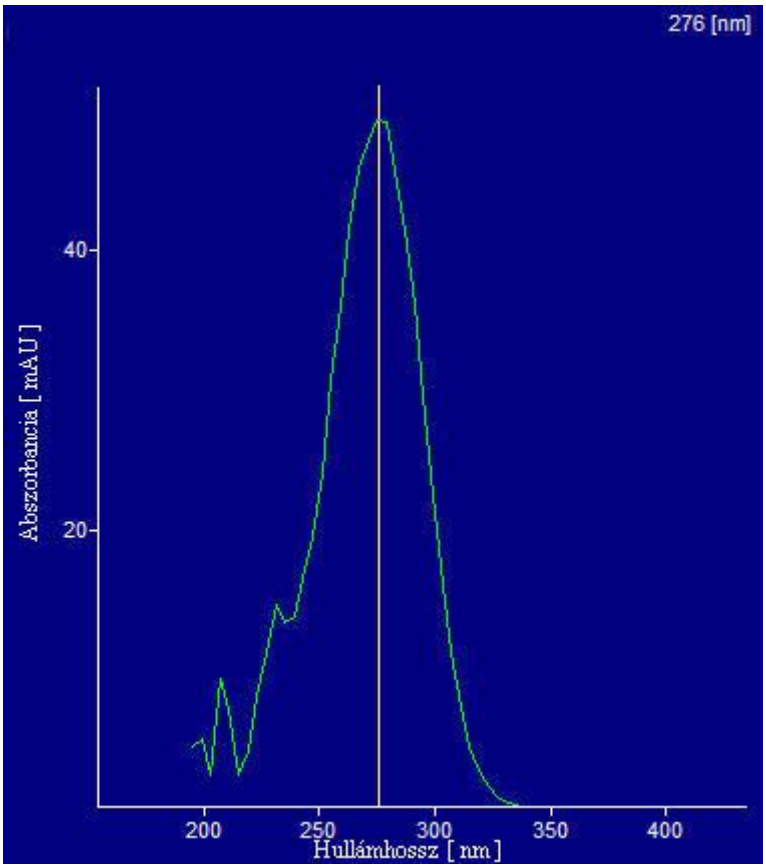
12. ábra: Kontroll patkány szem (felső), és az 1 µg/ml K203-mal spike-olt kontroll patkány szem (alsó) kromatogramja.

A mozgó fázis 2,5 g/l OSA-t tartalmazott. A mérések elektrokémiai detektálással történtek (E_{ox}= +0,8 V, érzékenység: 2 nA/V).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.1.2. A módszer érzékenységének optimalizálása

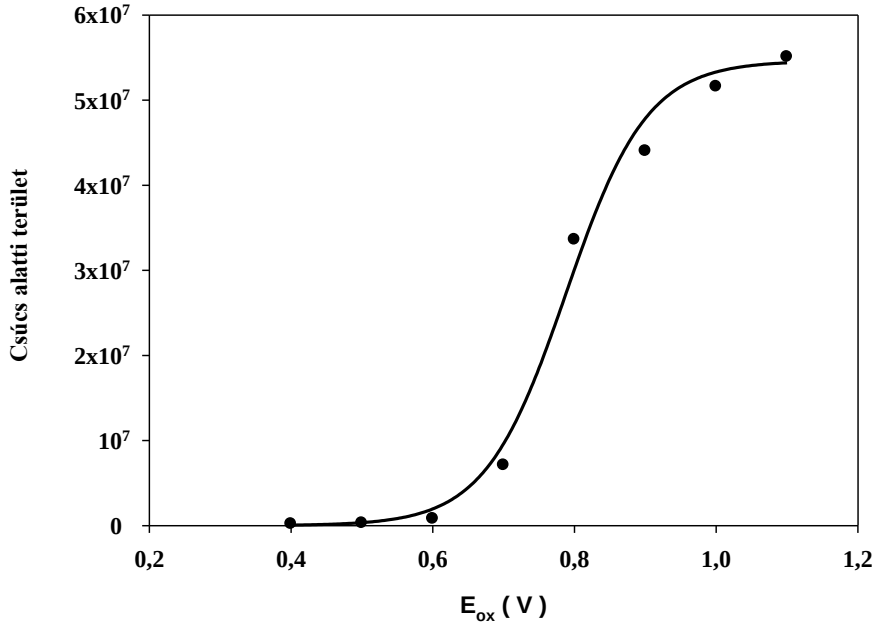
Az abszorpciós maximum megállapítását DAD detektor segítségével végeztük el az optimálisnak talált mozgó fázisban. A K203 λ_{max} (276 nm) értékének meghatározása során kapott teljes spektrumot a **13. ábra** mutatja:



13. ábra: A K203 DAD detektorral felvett teljes spektruma.

Az optimális cellaáram meghatározásához (voltamogram) 1,1 nmol K203 injektálásával és a cellaáram változtatásával kapott csúcsalatti területek nagysága közti összefüggést a **14. ábrán** mutatom be.

DOI:10.14753/SE.2014.1960



14. ábra: K203 voltamogramja (injektált mennyiség 1,1 nmol).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2. Az optimalizált RP-HPLC módszer validálása

5.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity):

A módszer specifikusságának eldöntéséhez a 6 különböző állatból származó vak biológiai mátrixot (szérum, CSF, agy, szem) hasonlítottuk össze ugyanezen mátrixok K203-at is tartalmazó mintáival. A vegyületünket tartalmazó minták injektálása során meghatároztuk a K203 retenciós idejét (**7. és 8. táblázat**) majd a kapott időpontnál néztük a vak mintáknál kapott kromatogramokon, hogy van-e valamilyen zavaró háttércsúcs.

7. táblázat: A K203 retenciós idejének mérése UV detektálás esetén.

Minta száma	R_t	Átlag	SD	RSD (%)
1	9,817	9,811	0,007	0,072
2	9,817			
3	9,808			
4	9,817			
5	9,808			
6	9,800			

Limit (RSD%) ≤ 0.5

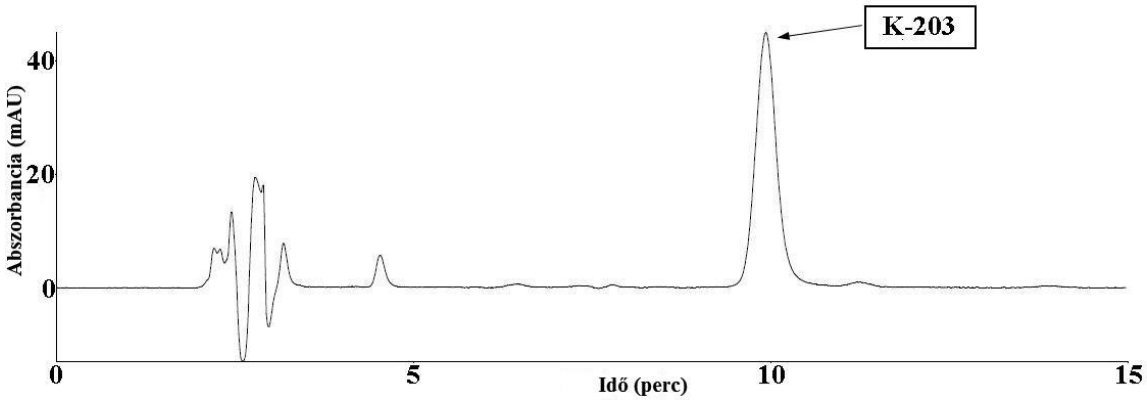
8. táblázat: A K203 retenciós idejének mérése EC detektálás esetén.

Minták száma	Rt	Átlag	SD	RSD (%)
1	10,083	10,079	0,004	0,043
2	10,075			
3	10,083			
4	10,075			
5	10,083			
6	10,075			

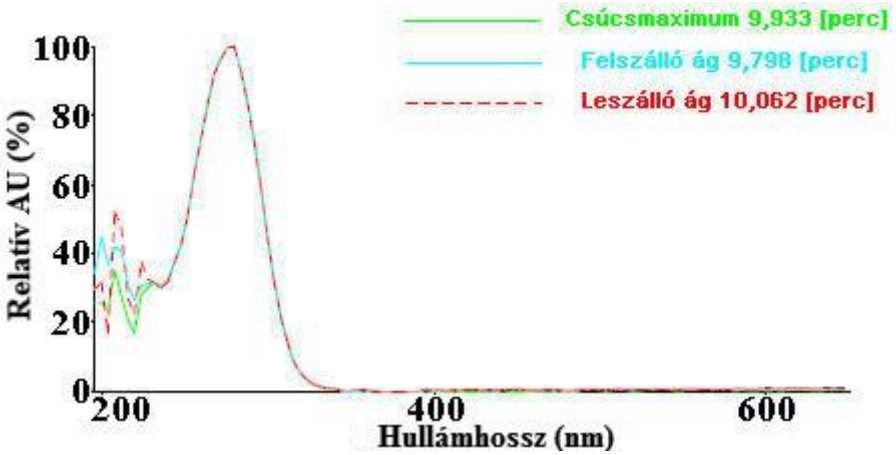
DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat

Az optimálisnak talált mozgófázisban a K203 abszorcpiós maximuma λ_{max}=276 nm-nél volt. A csúcstisztasági vizsgálatkor a Borwin PDA program segítségével ezen a hullámhosszon kapott UV kromatogramon található csúcsnak (**15. ábra**) a DAD detektorral felvett spektrumait hasonlítottuk össze. A program 3 spektrum összehasonlításából számolja ki a tisztasági faktorokat. A csúcsmaximumnál felvett spektrumot, a felszálló ág és a leszálló ág inflexiós pontjainál felvett spektrumokat egymásra illesztve a **16. ábra** mutatja be.



15. ábra: K203 DAD-al felvett UV kromatogramja λ_{max}=276 nm-nél.



16. ábra: A K203 csúcstisztasági vizsgálata.
A spektrumokat a csúcs alapvonalától számítva a csúcs teljes magasságának 0.607-nél, vagyis ahol a csúcs szélessége pontosan 2σ.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision):

A torzítatlanság és a precizitás meghatározásához mind az UV, mind pedig az EC detektálások során a K203-mal ismert koncentrációban spike-olt vak mintákból 3 koncentrációértéket készítettünk úgy, hogy ezek a vizsgált tartomány alacsony, közepes és magas részébe essenek. Ezek UV detektálás esetén a 100; 1000 és 5000 ng/ml végkoncentrációra spike-olt, míg EC detektálásnál az 50; 100 és 1000 ng/ml végkoncentrációra spike-olt minták voltak. A kapott csúcsterületekből a kalibrációs egyenesek alapján kiszámoltuk a mintában lévő K203 koncentrációját. Az **9. és 16. táblázatban** a különböző biológiai minták validálásakor kapott precizitás (átlag±SD; ill. RSD (%)) illetve a torzítatlanság (%)-ának intra- és interday értékeit tüntettük fel. Az interday (egymást követő napokon történő) meghatározásoknál minden egyes napon frissen készített kalibrációs oldatokat és QC mintákat használtunk.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

9. táblázat: K203 standard intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	95 ± 0,39	0,41	95
1000	1015 ± 0,94	0,09	101,5
5000	5016 ± 2,13	0,04	100,3

10. táblázat: K203-mal spike-olt patkány szérum intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	96,3 ± 0,47	0,49	96,3
1000	1052,8 ± 4,80	0,46	105,3
5000	4962,8 ± 7,72	0,16	99,3

DOI:10.14753/SE.2014.1960

11. táblázat: K203-mal spike-olt patkány agy intraday precizitás és torzítatlanság értékei (EC detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
50	56,6 ± 2,45	4,32	113,2
100	107,2 ± 0,70	0,34	107,2
1000	1007 ± 9,76	0,97	100,7

12. táblázat: K203-mal spike-olt beagle kutya szérum intraday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	111,4 ± 0,29	0,26	111,4
1000	1049,2 ± 3,55	0,34	104,9
5000	5001,2 ± 4,49	0,09	100,02

DOI:10.14753/SE.2014.1960

13. táblázat: K203 standard interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	98,2 ± 4,56	4,64	98,2
1000	1002,6 ± 17,52	1,75	100,3
5000	5006,5 ± 13,44	0,27	100,1

14. táblázat: K203-mal spike-olt patkány szérum interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	93,47 ± 3,96	4,23	93,47
1000	1024,11 ± 40,49	3,95	102,41
5000	4987,44 ± 24,17	0,48	99,75

DOI:10.14753/SE.2014.1960

15. táblázat: K203-mal spike-olt patkány agy interday precizitás és torzítatlanság értékei (EC detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
50	57,21 ± 0,81	1,41	114,42
100	105,97 ± 1,76	1,66	105,97
1000	1002,89 ± 5,86	0,58	100,29

16. táblázat: K203-mal spike-olt beagle kutya szérum interday precizitás és torzítatlanság értékei (UV detektálás).

Spikolt koncentráció [ng/ml]	Mért koncentráció átlag±SD [ng/ml]	RSD (%)	Torzítatlanság (%)
100	111,13 ± 0,39	0,35	111,13
1000	1022,38 ± 37,86	3,7	102,38
5000	4987,44 ± 0,18	0,004	99,75

A mérés és a mérőműszer ismételhetőségének ellenőrzésére a nemzetközi ajánlások alapján egy 1000 ng/ml K203-mal spike-olt mintából 50 µl-t injektáltunk egymást követően hat alkalommal és vizsgáltuk a kapott csúcs alatti területek szórását **(17. táblázat)**.

17. táblázat: A K203 kvantitatív meghatározásának ismételhetőségi vizsgálata (UV detektálás).

Injektálás száma	Csúcs alatti terület	Átlag	SD	RSD (%)
1	97567	97543	88,44	0,09
2	97558			
3	97666			
4	97585			
5	97430			
6	97450			

Limit (RSD%) ≤ 0,5

5.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity):

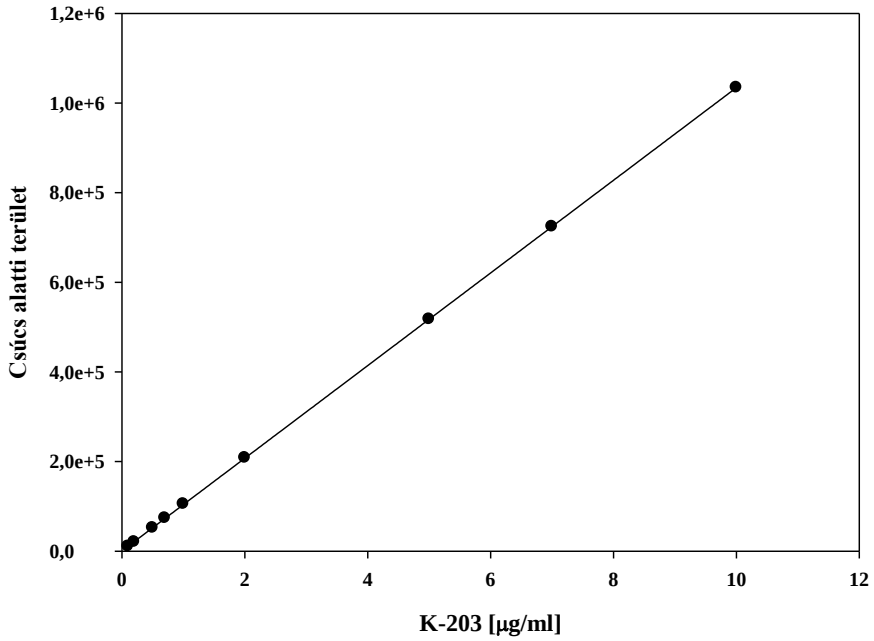
A kalibrációs görbék felvételéhez a 4.2.2.4 fejezetben leírtak szerint készítettem el a kalibrációs oldatokat. Az UV detektálás során a vak mintán kívül 0.1 µg/ml – 10 µg/ml koncentrációtartományban vizsgáltam a K203 különböző koncentrációira kapott válaszjelek nagyságát a koncentráció függvényében. A vizsgálatokat az egy nagyságrenddel érzékenyebb EC detektálás során is elvégeztem 0.01 µg/ml – 1 µg/ml közötti koncentrációtartományt alkalmazva. A validálás során ezeket a vizsgálatokat mind a K203 standard (**17. és 18. ábra**), mind pedig a standarddal spike-olt biológiai minták esetén is elvégeztem. A kapott kalibrációs görbék egyenleteit valamint az ezekhez tartozó korrelációs együtthatók értékeit a **18. táblázatban** tüntettem fel:

DOI:10.14753/SE.2014.1960

18. táblázat: A kalibrációs görbék egyenletei és a hozzá tartozó korrelációs együtthatók.

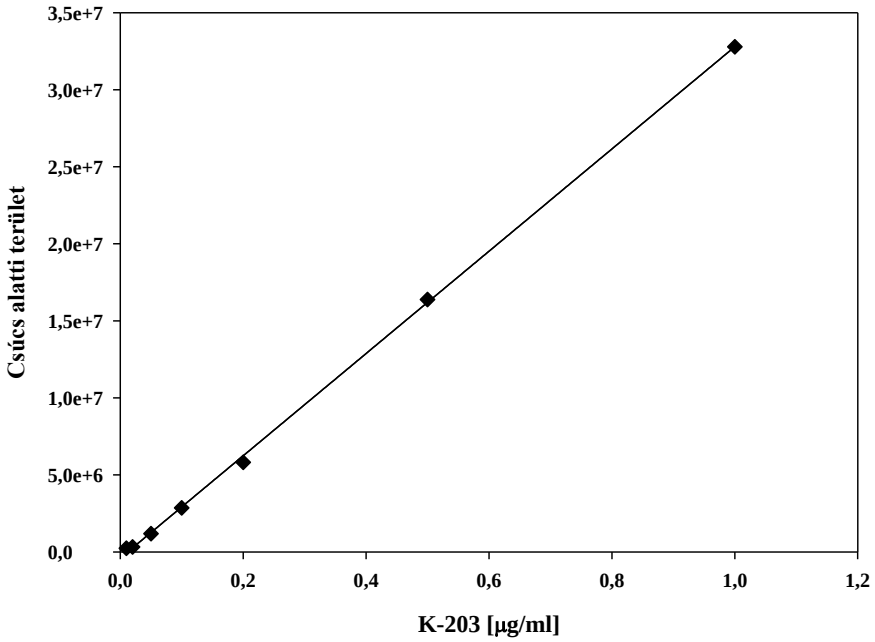
Minta típusa	Egyenes egyenlete	Korrelációs együttható (r^2)
K203 standard (UV)	y = 103x + 583	0,9999
K203 standard (EC)	y = 33191639x - 400806	0,9999
Patkány szérum (UV)	y = 92x - 338	0,9996
Kutya szérum (UV)	y = 92x - 2194	0,9997
Patkány agy (EC)	y = 96755x - 570385	0,9994

Limit (r^2) ≥ 0.98



17. ábra: K203 standard kalibrációs görbéje UV detektálás esetén.
(λ=276 nm; az egyenes egyenlete: y= 103x+583; r^2=0,9999)

DOI:10.14753/SE.2014.1960



18. ábra: K203 standard kalibrációs görbéje EC detektálás során (Szegi et al. 2010).
(E_{ox}=+0,8V, érzékenység=2 nA/V; az egyenes egyenlete: y= 33191639x-400806; r^2=0,9996).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation)

Az K203 UV és EC detektálási módjainak LOD és LOQ értékeit minden esetben olyan, a kalibrációs tartománytól alacsonyabb koncentrációtartományba eső értékeken végeztem, ahol a jel/zaj arány 1 és 20 között volt. Ez UV detektálás esetében 10 ng/ml – 100 ng/ml közötti, míg EC detektálás esetén 1 ng/ml és 50 ng/ml közötti koncentrációtartományt jelentett. A jel/zaj arányoknak a koncentráció függvényében történt ábrázolása esetén kapott egyenesek egyenletéből, valamint az 5.2.2.5-ös fejezetben található képletek alapján a K203 vegyület LOD és LOQ értékei a következőképpen alakultak:

EC detektálás esetén	LOD=1,8 ng/ml
	LOQ=6,2 ng/ml
UV detektálás esetén	LOD=12,95 ng/ml
	LOQ=43,18 ng/ml

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery)

A visszanyerési/kitermelési vizsgálatok esetében az előzőekhez hasonlóan 3 különböző koncentrációt tartalmazó QC mintában (100; 1000 és 5000 ng/ml) vizsgáltuk a K203 mennyiségét összehasonlítva az ugyanilyen koncentrációjú standard oldatok koncentrációjával (**19. és 20. táblázat**).

19. táblázat: Patkány szérumból mért K203 visszanyerési tényezőjének értékei (UV detektálás).

Vegyület	Hozzáadott konc.[ng/ml]	Visszanyerés átlag ± SD (%)	RSD (%)
K203	100	90,48 ± 1,10	1,22
	1000	95,60 ± 0,37	0,39
	5000	88,82 ± 0,11	0,12

20. táblázat: Beagle kutya szérumból mért K203 visszanyerési tényezőjének értékei (UV detektálás).

Vegyület	Hozzáadott konc.[ng/ml]	Visszanyerés átlag ± SD (%)	RSD (%)
K203	100	85,57 ± 1,76	2,05
	1000	93,43 ± 0,33	0,35
	5000	89,15 ± 0,08	0,09

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness)

A módszer zavartűrésének és robusztusságának a megállapításához az optimálisnak talált mozgófázishoz képest ±5 %-os változtatást eszközöltünk mind a szerves összetevő (190 ml ill. 210 ml AcN) mind a pH (3,5 és 3,9) vonatkozásában. Ez annyit jelentett, hogy a korábbi vizsgálatokban optimálisnak talált „eredeti" eluens mellett még további 4 különböző eluensben is megvizsgáltuk, hogy az előbb említett paraméterek milyen mértékben változtatták meg a K203 retenciós idejét. A szerves módosító AcN mennyiségének változtatásával nyert adatokat a **21. táblázatban** foglaltam össze.

21. táblázat: A kromatográfiás rendszer robusztusságának vizsgálata az AcN mennyiségének változtatásával.
A mozgó fázis összetétele az AcN mennyiségének változtatásakor:50 mM $Na_2HPO_4.2H_2O$; 50 mM citromsav; 0,027 mM EDTA; 2,5 g/l OSA; pH=3,7; változó mennyiségű AcN a vizes foszfát pufferben.

	Az AcN mennyisége a mozgó fázisban		
	95% (190 ml)	100% (200 ml)	105% (210 ml)
Retenciós idő (perc) ± SD	11,028 ± 0,02	9,814 ± 0,01	8,106 ± 0,03
RSD (%)	0,19	0,05	0,33
Δ (%)	11,01	0	17,41

DOI:10.14753/SE.2014.1960

A mozgó fázis pH-jának változtatásával nyert adatokat a **22. táblázatban** foglaltam össze

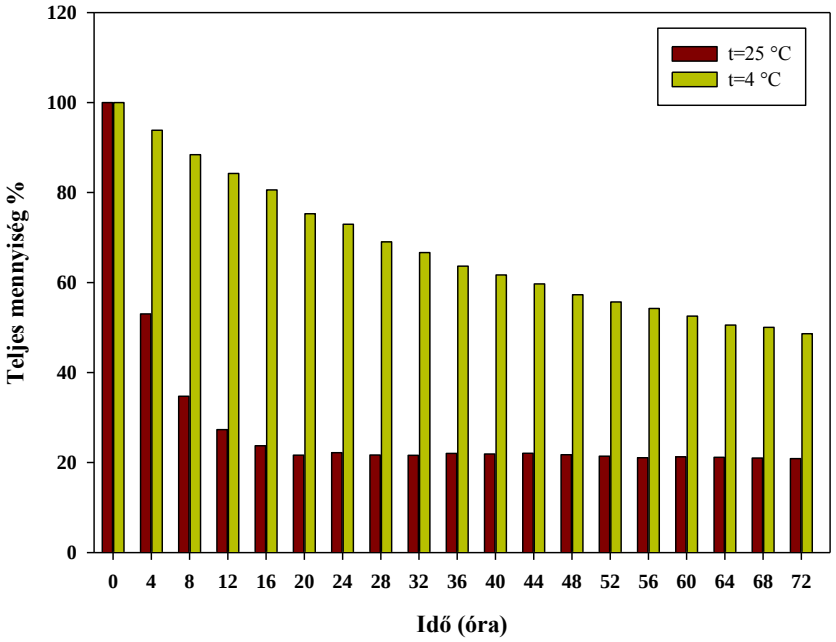
22. táblázat: A mozgó fázis pH-jának hatása a kromatográfiás rendszer robusztusságára.
A mozgó fázis összetétele a pufferrendszer pH-jának változtatásakor:50 mM $Na_2HPO_4.2H_2O$; 50 mM citromsav; 0,027 mM EDTA; 2,5 g OSA; vizes foszfát puffer – AcN 10:2 arányú keveréke; pH 3,5 és 3,9.

	A mozgó fázis pH-ja		
	95% (3,5)	100% (3,7)	105% (3,9)
Retenciós idő (perc) ± SD	10,086 ± 0,03	9,814 ± 0,01	9,461 ± 0,03
RSD (%)	0,31	0,05	0,31
Δ (%)	2,70	0	3,60

DOI:10.14753/SE.2014.1960

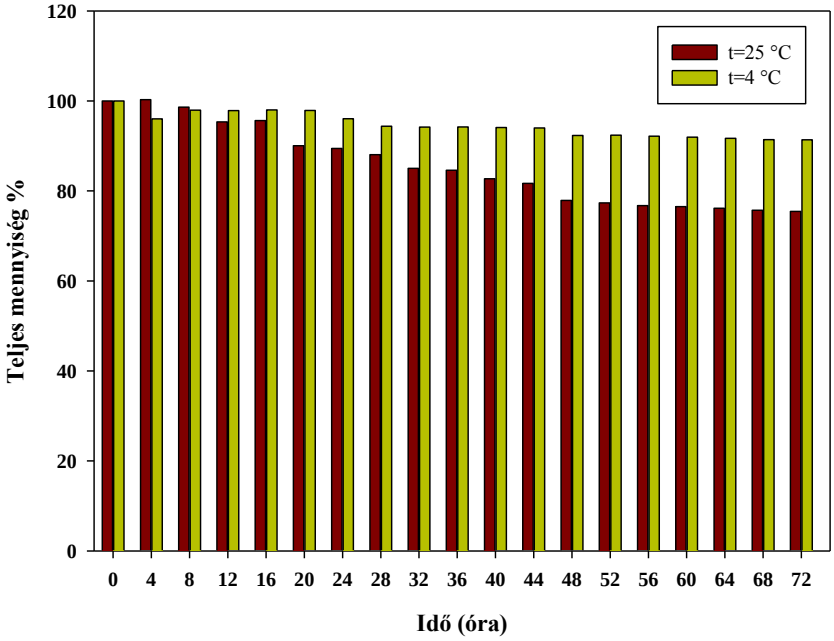
5.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok

Biológiai mátrixokból történő meghatározások esetén a fehérjék kicsapására a leginkább költséghatékony savas módszert alkalmaztuk. Annak ellenőrzése céljából, hogy a savas közegben a K203 mennyire őrzi meg stabilitását, ill. a különböző hőmérsékleten végzett meghatározások mennyire függnek a hőmérséklettől, különböző hőmérsékleti viszonyok mellet és eltérő pH értékeken vizsgáltuk az azonos koncentrációjú standard illetve a K203-mal spike-olt biológiai minták stabilitását. A mérés során 72 órán keresztül 4 óránként injektáltunk a frissen elkészített standard oldatokból 50 µl-t, majd a mennyiségi meghatározást követően a kezdeti (t=0) időponthoz képest adtam meg a stabilitásban bekövetkező változásokat 4 órás intervallumokra lebontva **(19. és 20. ábra)**.



19. ábra: K203 bomlása erősen savas (0,8 M PCA) közegben (Szegi et al. 2010).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



20. ábra: K203 bomlása neutrális (pH=7) közegben.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

A stabilitásvizsgálatokat ugyanígy elvégeztem a K27, a K48 és a K74 esetében a PCA-n kívül TFA, ill. HCl hatását is vizsgálva erős savas környezetben (**23. és 24. táblázat**).

23. táblázat: Piridínium aldoximok bomlása erősen savas (0,8M) közegben szobahőmérsékleten (t=25 °C).
(PCA – perklórsav, TFA – trifluorecetsav, HCl – sósav). A táblázatban szereplő értékek a kiindulási koncentrációhoz viszonyított, adott időpontban regisztrált koncentrációértékek %-ban kifejezve.

		Idő (óra)						
		0	**4**	**12**	**24**	**36**	**48**	**72**
K27	PCA	100	56	27	20	20	20	19
	TFA	100	80	53	35	30	28	27
	HCl	100	68	35	22	19	19	17
K48	PCA	100	51	25	22	22	21	21
	TFA	100	74	47	32	29	28	27
	HCl	100	64	32	22	20	19	19
K203	PCA	100	53	27	22	22	22	21
	TFA	100	88	58	40	35	34	32
	HCl	100	65	34	21	18	18	18
K74	PCA	100	29	13	12	12	11	11
	TFA	100	57	26	17	17	16	16
	HCl	100	52	13	7	7	7	7

24. táblázat: Piridínium aldoximok bomlása erősen savas (0,8M) közegben t = 4 °C-on.
(PCA – perklórsav, TFA – trifluorecetsav, HCl – sósav). A táblázatban szereplő értékek a kiindulási koncentrációhoz viszonyított, adott időpontban regisztrált koncentrációértékek %-ban kifejezve.

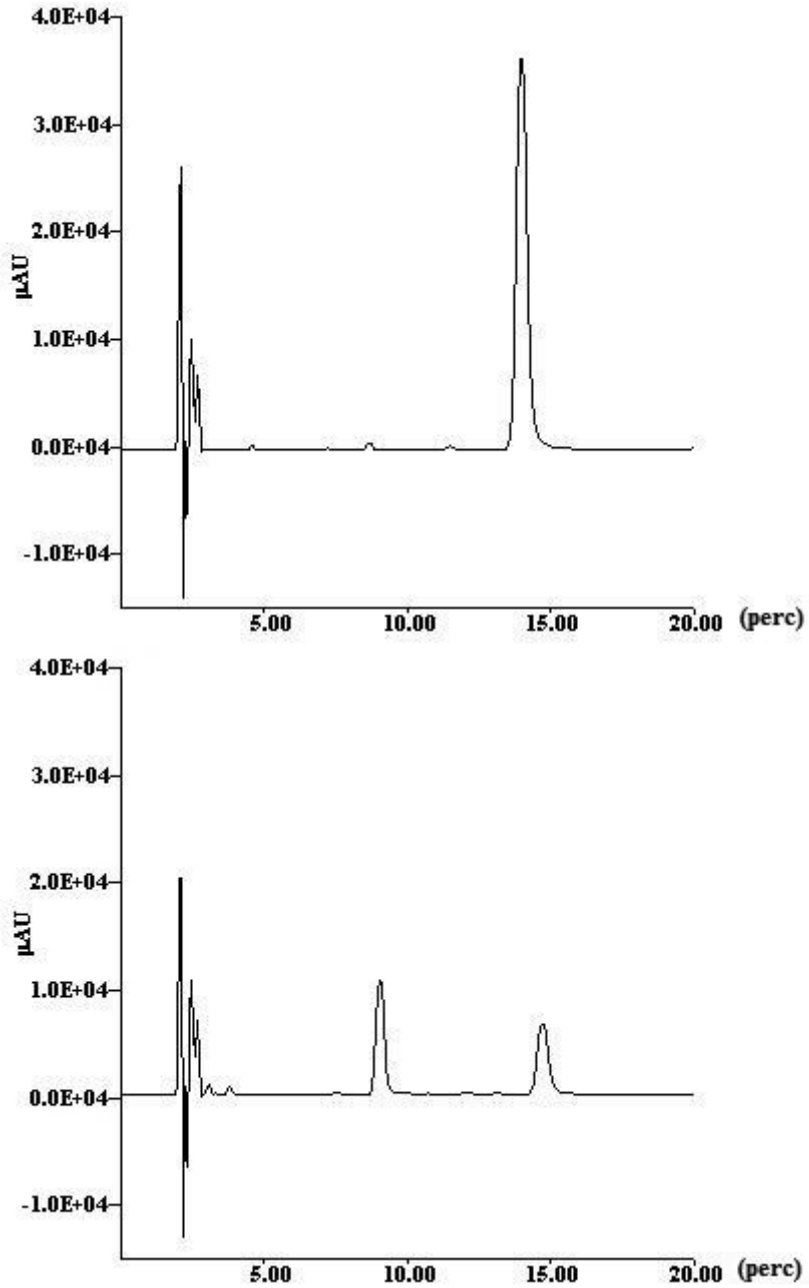
		Idő (óra)						
		0	**4**	**12**	**24**	**36**	**48**	**72**
K27	PCA	100	96	84	72	63	53	48
	TFA	100	99	90	89	79	79	71
	HCl	100	99	94	83	69	61	50
K48	PCA	100	93	84	71	62	55	47
	TFA	100	99	96	90	82	76	70
	HCl	100	96	85	74	61	54	44
K203	PCA	100	94	84	73	64	57	49
	TFA	100	98	94	87	81	76	70
	HCl	100	95	86	77	67	59	50
K74	PCA	100	88	67	51	40	35	29
	TFA	100	98	88	75	66	59	50
	HCl	100	91	76	59	45	37	27

Mivel a későbbiekben a K203 biológiai mintákból történő mennyiségi meghatározása során az UV detektálás mellett EC detektálást is kellett alkalmaznunk, ezért a stabilitásvizsgálatokat mindkét detektálási mód mellett is elvégeztük. Az UV mérések során azt tapasztaltuk, hogy a kiindulási állapotban frissen készített K203 standard oldat injektálása után a kromatogramokon egyetlen homogén csúcs volt látható a megfelelő retenciós időnél. A kromatogramok elemzésekor azonban azt tapasztaltuk, hogy a bomlás előrehaladtával szobahőmérsékleten, erős savban a főkomponenshez képest kisebb retenciós idővel egy újabb csúcs jelenik meg (**21. ábra**). A megjelenő csúcs csúcsalatti területe a mérés első felében mindig olyan mértékben növekedett, mint amennyivel a főkomponens csúcsalatti területe csökkent.

Az UV detektálással párhuzamosan zajló EC detektálás során ilyen „plusz” csúcs nem jelent meg a mérés teljes időtartama alatt sem (**22. ábra**).

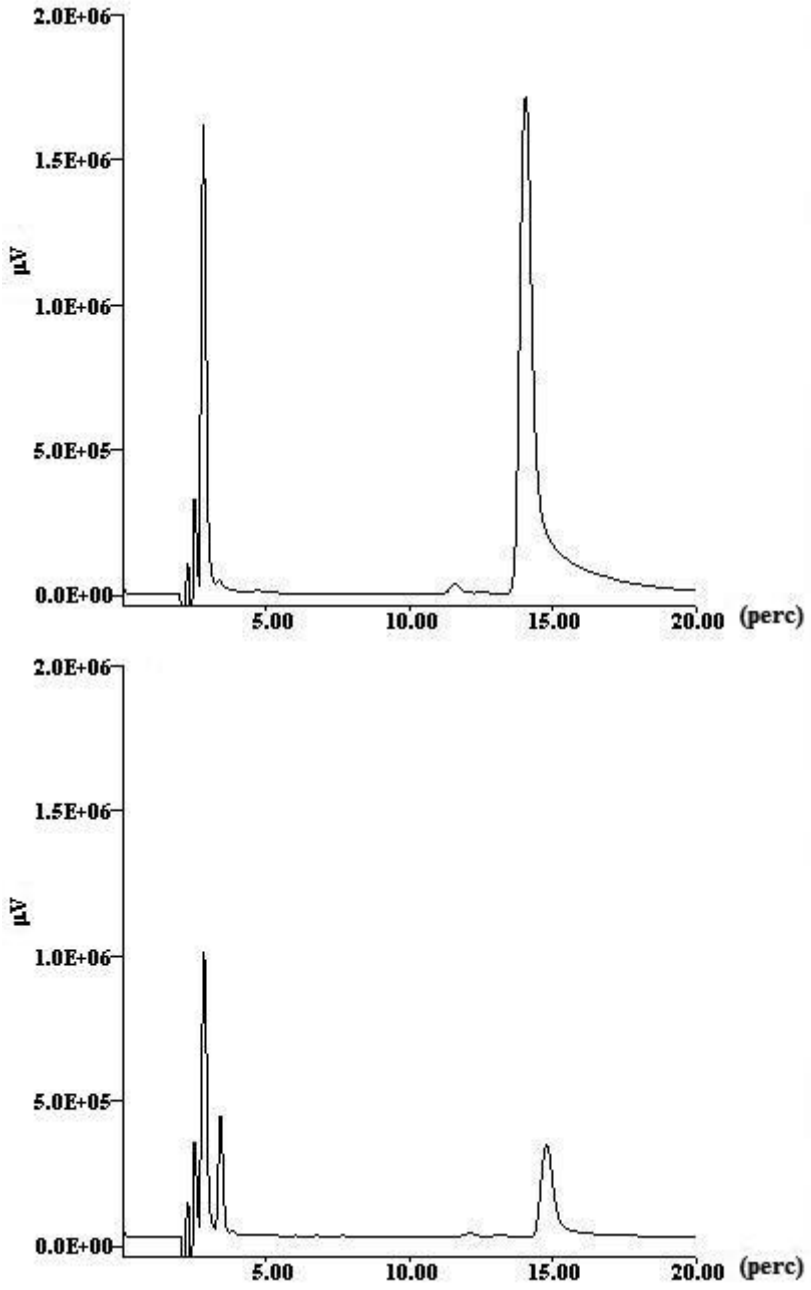
DOI:10.14753/SE.2014.1960

Ugyanezen „plusz” csúcs megjelenése volt megfigyelhető, amikor a méréseket szintén erős savas közegben, de t=4°C-on végeztük. Hasonló jelenséget a K27-tel, a K48-cal illetve a K203-mal spike-olt biológiai mátrixok UV detektálási móddal végzett meghatározások esetében is megfigyeltünk.



21. ábra: K203 standard oldat savas bomlása során UV detektorral regisztrált kromatogramok (Szegi et al. 2010).
Felső kezdeti (t=0) időpont, az alsó 36 órával később. (PCA 0,8 M; t=25°C; λ=276 nm).

DOI:10.14753/SE.2014.1960



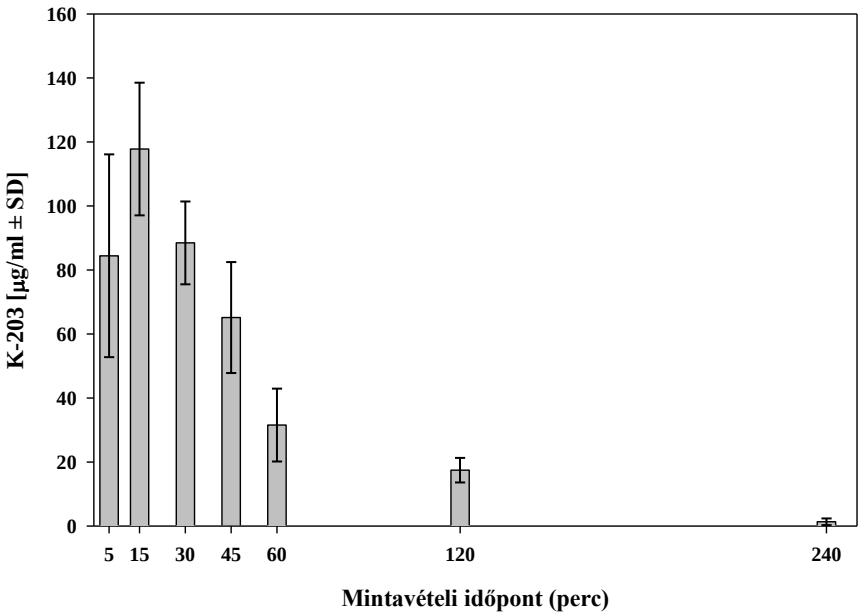
22. ábra: K203 standard oldat savas bomlásakor elektrokémiai detektorral regisztrált kromatogramok (Szegi et al. 2010).
Felső kezdeti (t=0) időpont, az alsó 36 órával később. (PCA 0,8 M; t=25°C; E_{ox}=+0,8V; érzékenység=2nA/V).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

5.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása

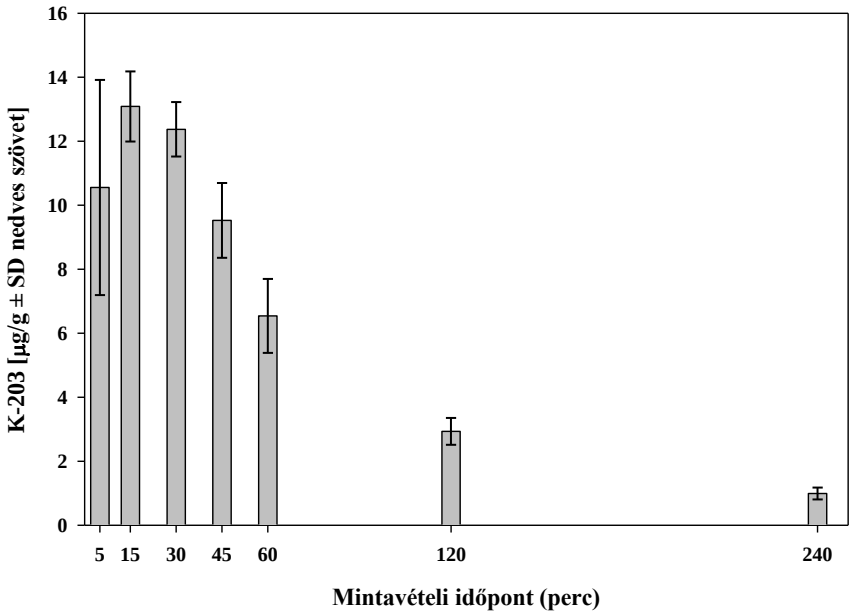
5.3.1. Patkánymodell

Az állatok egyszeri 50 µmol/200g i.m. kezelését követően a K203 szérum szintjének időbeli alakulását a **23. ábrán** mutatom be.



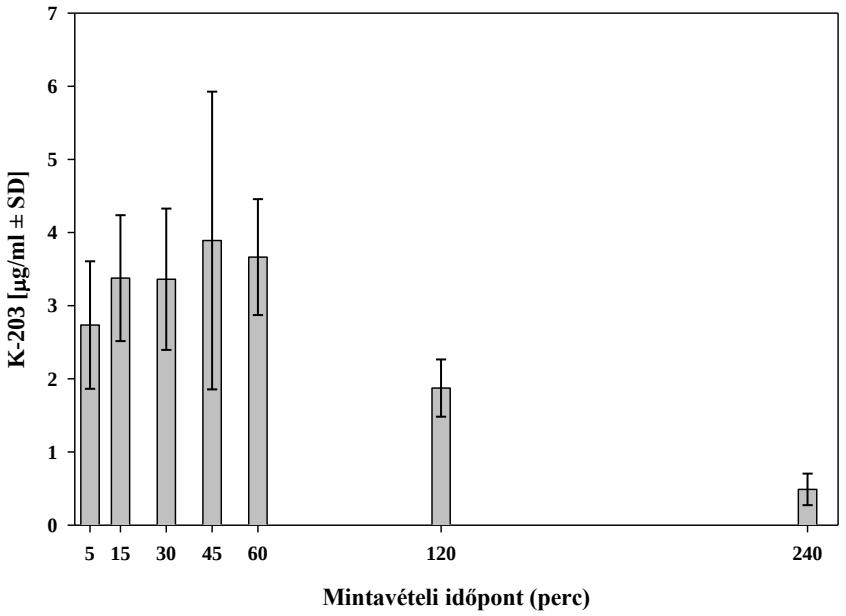
23. ábra: A patkány szérum K203 szintjének változása a teljes kezelési idő alatt (n=5) (Kalasz et al. 2008).

A K203 szemből mért szöveti szintjeit az idő függvényében a **24. ábra** mutatja.



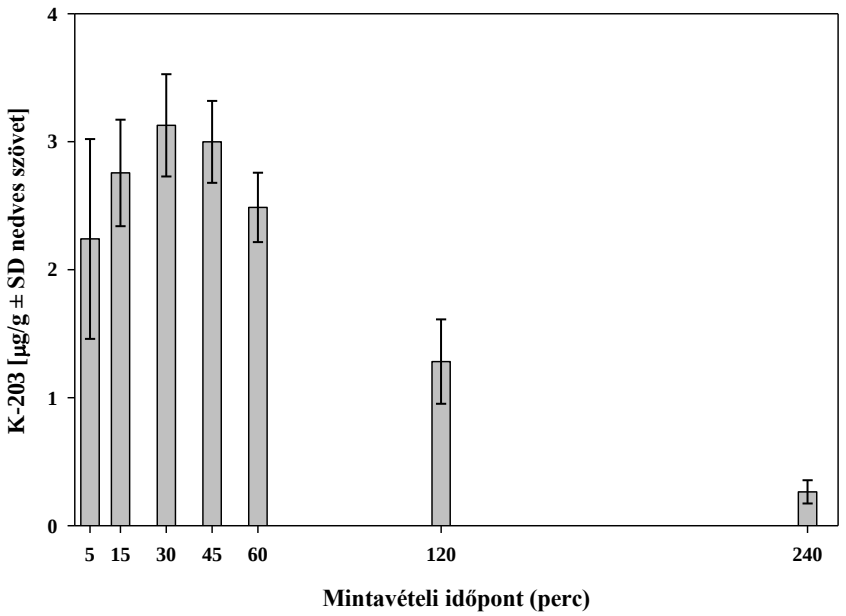
24. ábra: K203 szintjének változása az idő függvényében patkány szem esetében (n=5) (Kalasz et al. 2008).

A K203 liquorból mért szöveti szintjeit az idő függvényében a **25. ábrán** mutatom be.



25. ábra: A patkány liquor K203 szintjének változása az idő függvényében (n=5) (Kalasz et al. 2008).

A K203 agyhomogenizátumokból mért szöveti szintjeit az idő függvényében a **26. ábrán** mutatom be.



26. ábra: A patkány agyminták K203 szintjének változása az idő függvényében (n=5) (Kalasz et al. 2008).

A **25. táblázatban** az egyes agyrészletek K203 tartalmának változását foglaltam össze 3µmol/200g és 50µmol/200g dózis esetén:

25. táblázat: A K203 koncentrációjának [µg/g ± SD nedves szövet] alakulása különböző dózisú kezelések hatására az egyes agyrészletekben (Szegi et al. 2010).
HC=hippocampus; BS=agytörzs; FC=frontal cortex; MO=nyúltvelő; HT=hypothalamus; ST=striatum; SC=gerincvelő.

Dózis [µmol/200g]	Idő (perc)	Agyrészlet						
		HC	BS	FC	MO	HT	ST	SC
50	15	4,23±0,77	8,27±4,02	10,70±2,60	8,21±1,92	10,36±2,54	3,80±0,60	4,55±0,39
	60	2,94±0,50	7,39±2,11	5,62±1,05	6,46±2,72	7,71±1,46	3,08±0,61	3,82±1,17
	240	1,54±0,20	2,22±0,56	2,71±0,79	1,82±0,51	3,71±1,35	1,27±0,42	2,09±0,19
3	15	2,27±1,41	1,93±0,49	2,39±0,33	2,60±0,63	1,62±0,32	0,91±0,23	0,77±0,08
	60	2,38±1,55	1,44±0,26	1,26±0,17	0,95±0,23	0,71±0,13	0,29±0,07	0,22±0,01
	240	1,03±0,10	0,86±0,51	0,78±0,23	0,28±0,14	0,30±0,10	0,19±0,03	0,19±0,01

A **26.** és **27. táblázatokban** az agyhomogenizátum és a CSF K203 szöveti szintjének változásait foglaltam össze a szérum K203 szöveti szintjének a függvényében.

26. táblázat: Patkány agy/szérum koncentrációk aránya az idő függvényében.

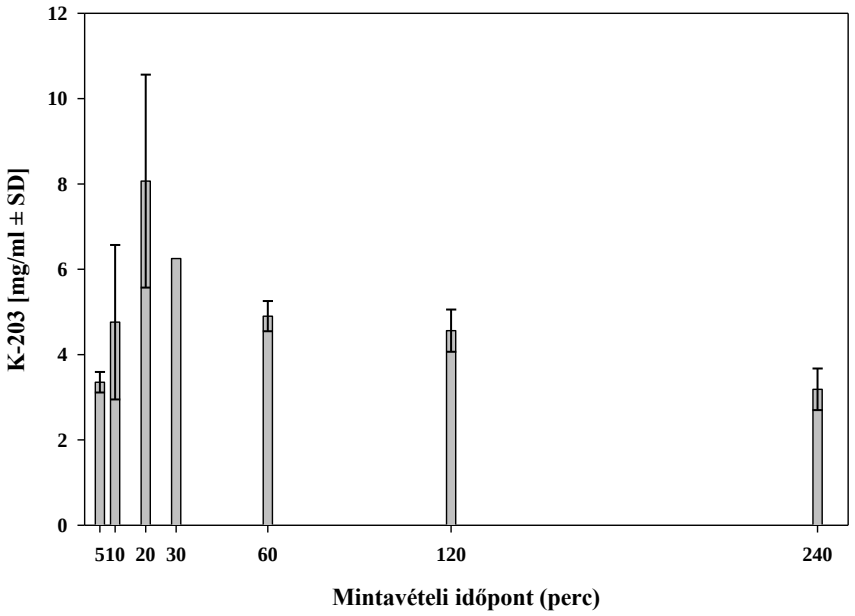
Idő (perc)	K203 koncentráció [µg/g±SD nedves szövet]		Agy/Szérum koncentráció aránya (%)
	Agy	Szérum	
5	2,24±0,78	84,44±31,67	2,65
15	2,76±0,42	117,78±20,73	2,34
30	3,13±0,40	88,47±12,94	3,53
45	3,00±0,32	65,16±17,34	4,60
60	2,49±0,27	31,55±11,39	7,89
120	1,28±0,33	17,47±3,84	7,32
240	0,26±0,09	1,32±1,04	19,69

27. táblázat: Patkány CSF/szérum koncentrációk aránya az idő függvényében.

Idő (perc)	K203 koncentráció [µg/g±SD nedves szövet]		CSF/Szérum koncentráció aránya (%)
	CSF	Szérum	
5	2,74±0,87	84,44±31,67	3,24
15	3,38±0,86	117,78±20,73	2,87
30	3,36±0,97	88,47±12,94	3,79
45	3,89±2,04	65,16±17,34	5,96
60	3,66±0,79	31,55±11,39	5,61
120	1,87±0,39	17,47±3,84	10,70
240	0,49±0,22	1,32±1,04	37,12

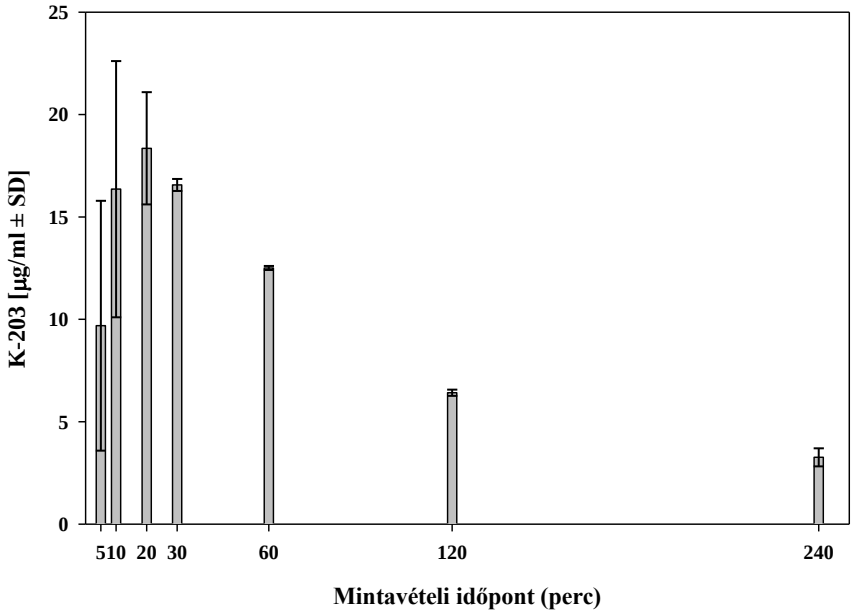
5.3.2. Beagle kutyamodell

A kutyák egyszeri i.m. 250 µmol/kg dózisú kezelését követően a K203 szérum koncentráció alakulását az idő függvényében a **27. ábrán** mutatom be.



27. ábra: Beagle kutya szérum K203 koncentrációja az idő függvényében 250 µmol/kg i.m. dózis alkalmazását követően.

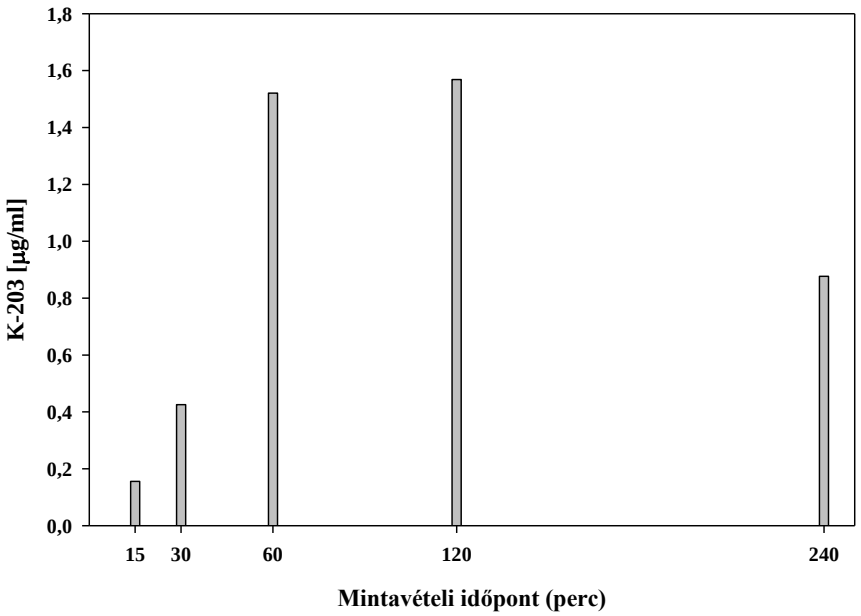
A 15 µmol/kg i.m. dózist követően a K203 szérum koncentrációjának időfüggését a **28. ábrán** mutatom be.



28. ábra: Beagle kutya szérum K203 koncentrációja 15 µmol/kg i.m. dózis alkalmazása után az idő függvényében.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

A CSF K203 koncentrációk alakulását az idő függvényében 15 µmol/kg i.m. dózis adása után a **29. ábrán** mutatom be.



29. ábra: Beagle kutya CSF K203 koncentrációjának időfüggése 15 µmol/kg i.m. dózis alkalmazása után.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. *In silico* vizsgálatok: a logP és TPSA értékek meghatározása

A molekulák lipofilitásának jellemzésére használt logP érték (a molekula megoszlási hányadosának logaritmusa, amelynek a meghatározása oktanol/víz rendszerben történik), valamint a molekula teljes poláris felszínének a területe (TPSA) a gyógyszerkutatásban fontos fiziko-kémiai paramétereknek számítanak, mivel mind farmakokinetikai mind farmakodinámiás szempontokból is meghatározzák a molekulák sorsát a szervezetben. A vizsgált K-vegyületek logP és TPSA értékeit az általam használt Pallas program (CompuDrug Inc.) egy új algoritmus szerint határozta meg (Molnár et al. 2004). A számítások alapján a logP-re kapott negatív értékek a vizsgált K-vegyületek rendkívül hidrofil tulajdonságára utalnak **(5. táblázat)**. Szakirodalmi adatok szerint a molekulák TPSA értéke jól korrelál a molekulák membránokon keresztül történő transzportjával, amit igazoltak is a vékonybélben történő felszívódás (Palm et al. 1997) ill. a BBB-en keresztül történő penetrációt (Kelder et al. 1999, Clark 1999) illetően. Az általam vizsgált PA-k magas TPSA értékei a logP értékekkel egyetemben arra engednek következtetni, hogy ezek a vegyületek kis eséllyel jutnak be a KIR-be.

6.2. Fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatok

6.2.1. A piridínium aldoximok elválasztásának optimalizálása

6.2.1.1. Módszerfejlesztés

A módszerfejlesztés során kiválasztott ionpárképző, az OSA mennyiségének a változtatása különböző mértékben hatott az általunk vizsgált PA-k migrációs tulajdonságát kifejező retenciós faktorra fordított fázis alkalmazása esetén. A két, jelenleg a klinikumban is rendelkezésre álló vegyület – PRX, OBX – esetében jól látható különbség mutatkozik a k' értékekben. Az OSA mennyiségének növelése a két piridínium gyűrűt tartalmazó OBX retencióját jelentősen, míg a PRX-ét alig befolyásolta (**4. ábra**). Az újonnan szintetizált PA-k közül a K27 és a K48 esetében a

két vegyület között minimális volt a különbség ebben a tekintetben; a piridínium-gyűrűket összekötő propilén ill. butilén linker a retenciós idő változását nem befolyásolta (**5. ábra**). A K203 a K48 but-2-én linkerrel összekötött származéka. Retenciós idejének változása a K27-tel ill K48-cal mutat analógiát. Ugyanakkor összehasonlítva a K74 és K75-tel azt látjuk, hogy adott OSA koncentráció mellett hamarabb eluálódik az oszlopról és retenciós ideje kisebb mértékben függ az adott ionpárképző koncentrációjától szemben az előbb említett két vegyülettel **(6. ábra)**. A K74 ill. K75 a szimmetrikus biszpiridínium biszaldoximok közé tartoznak, tehát OBX analógok, amit a k' értékük változása is jól mutat.

A K1000 az általunk vizsgált egyedüli triszpiridínium triszaldoxim. Sajátságos kémiai szerkezetének, azaz a három piridínium-gyűrű – három pozitív töltésnek köszönhetően még kifejezettebben reagál az ionpárképző koncentrációjának a változására az összes többi vizsgált PA mellett **(7. ábra)**.

Hasonló megállapításokra jutunk, ha az OSA változó mennyisége és a retenciós faktor közötti összefüggést leíró egyenesek jellemző paramétereit vesszük az összehasonlítás alapjául **(6. táblázat)**. Az „y_0" konstanst 0% ionpárképző mennyisége mellett kifejezve láthatjuk, hogy az így kapott értékek az egyes PA-k esetében – a K1000-es értékének a kivételével – gyakorlatilag közelítettek a 0-hoz. Ez annyit jelentett, hogy ezek a vegyületek ionpárképző alkalmazása nélkül mindenféle visszatartó erő hiányában a frontban eluálódnak az oszlopról. A K1000-es az előbb említett sajátságos kémiai szerkezetének köszönhetően még ilyen körülmények között is meghatározott retenciós idővel rendelkezik, és szépen elválik a fronttól.

Az egyenesek meredekségének –„a" – vizsgálata még feltűnőbb különbségeket mutatott az egyes vegyületek esetében, mint az y_0. A PRX (monopiridínium monoaldoxim) álló fázison történő visszatartása kevésbé függött az OSA mennyiségének a változásától, mint a biszpiridínium aldoximoké. A biszpiridínium monoaldoximok (K27, K48 és K203) elúciós tulajdonságaira szintén befolyással volt az OSA mennyiségének a változása, de ez kisebb mértékű volt a biszpiridínium biszaldoximokhoz (K74, K75) képest. Az összekötő lánc kettős kötése (K203, K75) kis mértékben csökkentette a vegyületek retenciós idejét.

6.2.1.2. A módszer érzékenységének optimalizálása

Az analitikai mérések során az elválasztás után a lehető legérzékenyebb detektálási ill. mérési határ (LOD, LOQ) megállapításához UV detektálásnál meg kell határozni az abszorpciós maximumot míg az elektrokémiai mérésekhez az optimális cellaáramot az adott vegyületre nézve.

Az elektrokémiai detektálás során a lehető legkisebb cellaáramra törekszünk. A megfelelő érték az inflexiós pont fölötti, de még a szigmoid görbe nem ellaposodó tartománya között keresendő. Efölött már nem kapunk nagyobb jelet adott injektált anyagmennyiségre, hanem sokkal inkább csak a háttér zavaró csúcsai nőnek meg, ami jelentősen rontja a jel/zaj arányt. A K203 DAD-ral történt teljes spektrum vizsgálatát követően a vegyület UV elnyelési maximumát λ_{max}= 276 nm-n érte el **(13. ábra)**, míg EC detektálás során az ideális cellaáram esetünkben E_{ox}=+0,8 V, ahogyan az a vegyület voltamogramjából is látszik **(14. ábra)**.

6.2.2. Az optimalizált RP-HPLC módszer validálása

A K203 farmakokinetikai vizsgálatához az előzőekben leírt paraméterek alapján optimálisnak beállított kromatográfiás módszert az FDA és az EMA ajánlásai alapján validáltuk, amely során a következő validálási paraméterek meghatározása történt:

6.2.2.1. Szelektivitás (Selectivity) és Specifikusság (Specificity):

Ezekkel az értékekkel azt adjuk meg, hogy az adott elválasztási módszer képes-e a vizsgálandó komponensünk elválasztására/felbontására a biológiai mátrix zavaró alkotóinak (endogén mátrix komponensek, metabolitok, bomlástermékek) a jelenlétében. Tehát specifikusnak tekinthetjük a módszerünket, ha csak az általunk vizsgált vegyületet méri, azaz teljesen szelektív.

Az általunk optimálisnak beállított kromatográfiás rendszerben a K203 R_t=(9,811±0,007) percnél **(7. táblázat)**, valamint R_t=(10,079±0,004) percnél **(8. táblázat)** eluálódott az oszlopról UV ill. EC detektálás esetén, és amint az a **9.-12. ábrákon** is látható a kontroll mintákban nem volt jele zavaró háttércsúcsnak.

6.2.2.2. Csúcstisztasági vizsgálat

Minden elválasztási módszernél az egyik legfontosabb kérdés, hogy a módszerünk által mért és kapott jel csak a meghatározandó anyagtól származik-e és nem valami ahhoz fizikailag vagy kémiailag hasonló anyagtól, vagyis hogy a kapott csúcs egy vagy több komponensnek felel-e meg. Ennek tisztázására csúcstisztasági vizsgálatot végeztünk, amely során felvettük a vizsgálandó anyaggal (K203) spike-olt vak minta teljes spektrumát, majd a csúcs elúciója során kapott spektrumokat összehasonlítottuk.
A program által számolt tisztasági faktorok a felszálló ág esetében 989, míg a leszálló ág esetében 988-nak adódott, amely értékek azt jelzik, hogy a csúcsunk csak az általunk vizsgált K203 vegyülettől származik, és nem tartalmaz egyéb zavaró komponenseket.

6.2.2.3. Torzítatlanság (Accuracy) és Precizitás (Precision)

Egy analitikai eljárás torzítatlanságán a mért és a névleges (referencia) érték %-os eltérését értjük, amelyet a mért koncentrációnak a referenciaanyag igazolt koncentráció százalékában megadva kapunk és amely a rendszeres hiba kimutatására szolgál. A precizitás az azonos, homogén minták mérése közti különbséget fejezi ki, a véletlen hiba mérőszáma, vagyis a befolyásoló körülmények előre nem látható változásából ered. Jellemzően a mérések becsült tapasztalati szórásával (standard deviáció, SD) vagy a százalékos szórással (relatív standard deviáció, RSD (%)) fejezzük ki. A precizitás további kategóriákra bontható: intraday (within-run, intra-batch) precizitás vagy ismételhetőség (repeatability), amely az azonos körülmények (azonos hely, analitikus, műszer) közt rövid időn belül mért értékek eltérése; valamint interday (between-run, inter-batch) precizitás vagy más néven kiterjesztett ismételhetőség, amely eltérő körülmények (egymást követő napokon, más analitikus) között mért értékek eltérése.
A módszer ismételhetősége meghatározásának másik lehetséges módja az ajánlások szerint, ha ugyanabból a vizsgálandó vegyülettel spike-olt vak mintából egymást követően 6 – 10 injektálást végzünk. Ha a mérési körülmények (pl. az álló fázis termosztálási hőmérséklete) szabályozása megfelelően történik, akkor azonos retenciós időket kell kapnunk. Ugyanígy, ha az injektáló egység megfelelően működik, akkor a csúcsterületek nagysága csak kis mértékben ingadozhat.

Amint az a **9. és 16. táblázatokból** is látható a torzítatlanság %-ban kifejezett értékei 93,47% és 113,2% közötti tartományban mozognak, ami eleget tesz az FDA és EMA ajánlásokban megfogalmazott kritériumoknak. A módszer precizitására kapott eredmények szintén teljesítik a nemzetközi ajánlásokban megadott feltételeket.
A **17. táblázat** adatai alapján a területek csak nagyon kis mértékben szórnak az átlaghoz képest (Csúcs alatti terület= 97543±88,44), tehát a módszerünk ismételhetősége megfelelő, amit az RSD (%) értéke is alátámaszt.

6.2.2.4. Kalibrációs görbe (Calibration curve) és Linearitás (Linearity):

A kalibrációs görbe a mérőműszernek a vizsgálandó vegyület (K203) különböző ismert koncentrációira adott válaszjelei és a vegyület koncentrációja közti összefüggést mutatja meg. A kalibráló görbe linearitásán azt értjük, hogy a görbe adott tartományban, az ún. lineáris tartományban, adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. A linearitási tartománynak a mérendő koncentrációkhoz képest legalább +15%-os tartományt kell lefednie.
Mind a K203 standard, mind pedig a biológiai mintákból felvett kalibrációs görbék **(17. és 18. ábra)** a vizsgált mérési tartományokon belül lineárisnak tekinthetők, amelyet jól tükröznek a **18. táblázatban** szereplő, az egyes görbékhez tartozó korrelációs együtthatók értékei is.

6.2.2.5. Kimutatási (Limit of Detection, LOD) és Meghatározási határ (Limit of Quantitation, LOQ)

A kimutatási határ (LOD) az a legkisebb mennyiség vagy koncentráció, amit az analitikai módszerünk még meg tud különböztetni a vak mintától, de mennyiségileg meghatározni már nem képes. Ez az a legkisebb koncentráció, amelyhez tartozó válaszjel legalább a vakminta közepes válaszjeléhez (ezt tekintjük zajnak) tartozó szórás háromszorosával egyenlő.
A meghatározási határ (LOQ) az a legalacsonyabb mennyiség vagy koncentráció, amit az analitikai eljárás megfelelő precizitással és helyességgel mennyiségileg képes meghatározni. Általában ez az a legkisebb koncentráció, amelyhez tartozó válaszjel legalább a vakminta közepes válaszjeléhez tartozó szórás tízszeresével egyenlő.

6.2.2.6. Visszanyerési tényező (Recovery)

A visszanyerési vizsgálat azért szükséges, hogy megmutassuk, az adott módszerünk a vizsgált mintában lévő komponensünk pontos mennyiségi meghatározását teszi lehetővé. A meghatározandó mintában lévő anyag teljes mennyisége sokszor nem határozható meg (oldhatósági problémák, homogenizálási és extrakciós veszteségek, az anyag kölcsönhatása a biológiai mátrix-al), ezért a visszanyerés hatásfokát az adott körülményekre meg kell mérni. A veszteség korrigálásához használják az ún. „spiked samples" módszert: a meghatározandó komponens ismert mennyiségét adjuk (spike-oljuk) a vizsgálandó mintához, majd a módszerrel meghatározzuk a hozzáadott anyag koncentrációját. A hozzáadott anyag így meghatározott koncentrációját összehasonlítjuk az ismert valódi koncentrációval (várt érték). Természetesen ezt az összehasonlítást 3 koncentráció értéknél (alacsony, közepes és magas – lefedve a vizsgált tartományt) is el kell végezni. Vegyületünk esetében az összehasonlítás alapját a kapott csúcsok alatti területek képezték, a visszanyerési tényező értékei 85,57% és 95,60% között mozogtak a megfelelő precizitási értékek mellett.

6.2.2.7. Robusztusság (Robustness) és Zavartűrés (Ruggedness)

Ez a vizsgálat annak megállapítására irányul, hogy a módszer hogyan viseli a kisebb változásokat a működés körülményeiben, így a módszer használatának validált rugalmasságát jelenti. A vizsgálat eredményeiből az egyes működési paraméterekre küszöbértékek állapíthatók meg, vagyis hogy a módszerünk milyen paraméter intervallumban ad megbízható eredményt.

Amint az a **21. és 22. táblázatokból** is jól látszik, a szerves oldószer mennyiségének változtatása nagyobb mértékű (11,01% és 17,41%) eltolódást eredményezett a K203 retenciós idejében, mint az eluens pH-jának változása során fellépő (2,70% ill. 3,60%) időeltolódás.

6.2.2.8. Stabilitás (Stability) vizsgálatok

Ezek a mérések magukba foglalják a vizsgálni kívánt vegyület stabilitásvizsgálatát a mintavételtől kezdve a minta előkészítésen, a különböző hőmérsékleteken eltérő ideig történő tároláson keresztül egészen a törzsoldat stabilitásáig. A vizsgálni kívánt vegyület biológiai mintában bekövetkező stabilitásváltozásának számtalan oka lehet: a tároló edény falára történő abszorpció, párolgás, hidrolízis, lebomlás. Segítségével a mérések időbeni és tárolási (hőmérséklet, fényhatás) követelményei határozhatóak meg.

A K203 biológiai szövetekből történő meghatározása során a RP-HPLC-s mérések előkészítéséhez megfelelő fehérjementesítést kell végezni. Ezt a folyamatot legegyszerűbben különböző savaknak a biológiai mátrixokhoz való hozzáadásával érhetjük el. Centrifugálást követően a fehérjementes felülúszót könnyedén szétválaszthatjuk az oldat többi részétől, amely ezek után már alkalmas a kromatográfiás rendszerbe történő injektálásra. Az erősen savas közeg a szerves vegyületeket is károsíthatja.

A K203 bomlását megfigyelve azt látjuk, hogy erős savas közegben, szobahőmérsékleten a vegyület erőteljes bomlásnak indul: az első 4 órában (47%-os veszteség a kiindulási állapothoz képest) és 24 óra múlva már csak az eredeti mennyiség 22%-a volt regisztrálható. Ugyanakkor a további 48 órában már számottevő változást nem tapasztaltunk **(19. ábra)**.

Ezzel ellentétben a t=4°C-on a K203 bomlási sebessége alapvetően lassabb tendenciát mutatott. A 72 órás mérési idő alatt a kiindulási koncentráció mindössze a felére csökkent (49%). Még lassabb mértékű koncentrációcsökkenést tapasztaltunk abban az esetben, amikor a stabilitási vizsgálatokat pH=3,7 ill. neutrális közegben végeztük el **(20. ábra)**. Ebben az esetben nem volt jele a hirtelen koncentrációváltozásnak és a 72 órás mérés végére a kiindulási mennyiségnek 91% (t=25°C) ill. 75%-át (t=4°C) sikerült regisztrálnunk.

A K203 PCA-ban tapasztalt bomlásához hasonlóan TFA és HCl esetében is az első 4 – 24 órában volt számottevő a bomlás sebessége szobahőmérsékleten (65 – 87%-os veszteség), míg a fennmaradó 48 órában nem tapasztaltunk további stabilitásváltozást egyik vizsgált vegyületnél sem. Kisebb kivételt képez a TFA-ban mért bomlás, ahol a vegyületek mindegyike az első 4 órában kisebb mértékű (12 – 43%) bomlást szenved,

és ez a tendencia a mérés végéig megmarad, azaz mintegy 7 – 14 %-al nagyobb végkoncentrációt mértünk a többi savas (PCA, HCl) bomláshoz képest. A négy vegyületet összehasonlítva a K74 esetében tapasztaltunk legnagyobb mértékű koncentrációváltozást a mérés során, különösen HCl-as környezetben **(23. táblázat)**.
A mintaadagoló belső hőmérsékletének 4°C-ra állításával a vizsgált vegyületek stabilitása a K203-hoz hasonló mértékben változott az első 24 órában (11-29%-os veszteség), és a mérés végére a kiindulási koncentráció közel a felére csökkent. Itt is megfigyelhető, hogy a TFA-ban a bomlás mértéke valamelyest lassabb volt. A négy vizsgált vegyület közül minden savban a K74 szenvedte el a legnagyobb mértékű bomlást, különösen a HCl-as közeg iránt mutatott érzékenységet **(24. táblázat)**.

6.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása

6.3.1. Patkánymodell

Az állatok egyszeri 50 µmol/200g i.m. kezelését követően a K203 maximális szérumszintjét (c_{max}:120 µg/ml) t_{max}=15 perc múlva éri el, majd egészen 60 percig 0-ad rendű kinetikát követve távozik a szérumból. A vegyület felezési ideje ($t_{1/2)}$ 45 percnél volt a kezelést követően **(23. ábra)**.
A K203 kinetikája a szem esetében a szérum szintjét követi **(24. ábra)**. Ebben az esetben is elég hamar (t_{max}:15 - 20 perc) eléri a maximális szintjét (c_{max}:13 µg/g nedves szövet), majd a 60. percig 0-ad rendű kinetikát követve ürül, 60 perces felezési idővel.
A K203 maximális koncentrációja az agyhomogenizátum ill. a CSF esetén **(25. és 26. ábra)** kissé később éri el a maximális szintjét (t_{max}:35 - 45 perc), majd elsőrendű kinetikát mutatva távozik, míg a felezési ideje ezekben a szöveti mintákban $t_{1/2}$:120 percnél volt.
Figyelemre méltó, hogy a K203 szintje a liquor esetében kis mértékben magasabb volt, mint az agy esetében.
Az agy illetve a CSF K203 szintjét a szérumbeli szinthez viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy az idő előrehaladtával szintén változott, növekvő tendenciát mutatva **(26. és 27. táblázat)**.

6.3.2. Beagle kutyamodell

A beagle kutyák egyszeri 250 µmol/kg dózisú kezelését követően A K203 szintén rövid időn (t_{max}:20 perc) belül eléri a maximumát (c_{max}:8,07±2,50 mg/ml±SD) a szérumban, és amint az a **27. ábrán** látható a teljes vizsgált időszak (240 perc) további részében konstans, magas koncentrációt (c:3 – 5 mg/ml) mutatott. Ehhez hasonlóan, a CSF esetében is azt tapasztaltuk, hogy a maximális koncentráció elérése után (t_{max}:20 perc) a K203 szintje egy állandó, relatíve magas értéken marad (c:25 µg/ml) a 4 órás mérés végéig.

A 15 µmol/kg i.m. dózis alkalmazása után a K203 szintén korán (t_{max}:10 – 20 perc között) eléri el a maximális koncentráció értékét (c_{max}:18,35±2,74 µg/ml±SD) a szérumban, majd ezután 30 és 120 perces időintervallumban lineáris csökkenést mutatva ürül a szérumból (**28. ábra**).

A CSF K203 koncentrációja csak mintegy 1 – 2 óra múlva éri el a maximumát (c_{max}:1,5 – 1,6 µg/ml), tehát a patkánykezelésekhez hasonlóan ebben az esetben is későbbi CSF maximumokat kaptunk a szérumhoz viszonyítva (**29. ábra**).

DOI:10.14753/SE.2014.1960

7. KÖVETKEZTETÉSEK

7.1. *In silico* vizsgálatok: a TPSA és log P értékek

A K-vegyületek esetében azért láttuk fontosnak mind a logP, mind a TPSA értékek számszerű meghatározását, mert ezek az értékek a szakirodalomból nem voltak ismertek, viszont értékük a vegyületek szervezetbeni sorsát alapvetően befolyásolják. Az *in silico* vizsgálatokban számolt logP és TPSA értékek alapján bizonyítottuk, hogy rendkívül hidrofil vegyületekkel van dolgunk a K-vegyületek mindegyike esetében. Ilyen vegyületek esetében a szokásos lipofilitás vizsgálatok és számítások (Leo et al. 1971, Tetko et al. 2001) nem végezhetők el, kizárólag a hidrofilitás adatokat lehet kísérleti úton meghatározni és kiszámolni (Csermely et al. 2007, Laufer et al. 2007).
A rendkívüli hidrofilitás viszont a másik oldalról szerepet játszhat az OP-tal való kémiai reakció utáni „normál" hidrofilitás kialakulásában, ami lehetővé teheti a fenti rendkívül lipofil mérgek szervezetből való kijuttatását, hiszen nemcsak az enzimek reaktiválása a cél, hanem a kiürülés elősegítése is.

7.2. RP-HPLC vizsgálatok

7.2.1. Optimalizálás

Az **4. és 7. ábrákon** látható hogy az OSA mennyiségi változtatása rendkívüli módon befolyásolja a vegyületeink retenciós idejét. Ez a tény a mobil fázis pH-ján is jelen levő többszörös töltés következménye.
Ezt sikeresen kihasználhatjuk az elválasztáshoz, hiszen a biológiai mintákban csak a legritkább esetben fordulnak elő többszörös pozitív töltéssel rendelkező kis molekulák melyek a fehérjekicsapás után még a mintánkban maradhat.

7.2.2. Érzékenység

A kezelések során a különböző dózisok alkalmazása szükségessé tette a jóval érzékenyebb EC detektálást az alkalmazott UV detektálás mellett. Különösen igaz volt ez a KIR hatóanyagtartalmának mennyiségi meghatározásakor, főleg kis dózisok alkalmazása esetén. A mérések alapján az optimális eluensben a K203 abszorbciós maximuma 276 nm volt. Az ehhez az értékhez tartozó LOD il. LOQ értékek 1,41 pmol/inj ill. 4,71 pmol/inj.
Az elektrokémiai detektálás során optimálisnak talált +0,8 V-os cellaáram a következő LOD ill. LOQ értékeket adta: 0,2 pmol/inj ill. 0,68 pmol/inj.

7.2.3. Validálás

Az általunk kidolgozott és optimalizált módszer segítségével a K203 R_t=9,811 (UV) illetve R_t=10,079 (EC) percnél eluálódott az oszlopról, amely időpontoknál nem volt látható zavaró háttércsúcs a biológiai mátrixokban. A kapott csúcs a csúcstisztasági vizsgálatok alapján homogénnek volt mondható (tisztasági faktor > 980), tehát a rendszerünk szelektíven az adott időpillanatban a K203-t mérte, zavaró komponensek nélkül. A precizitás és a torzítatlanság értékei rendre a nemzetközi ajánlások által megszabott határokon belül voltak. A módszer, illetve a készülék ismételhetőségének értéke [RSD (%)=0,09] bőven az 5 %-os határon belül volt. A kalibrációs görbék az általunk vizsgált koncentrációtartományban lineárisak voltak, amelyet jól tükröznek a kapott regressziós együtthatók értékei is (r^2: 0,9994 – 0,9999) és amelyek eleget tettek a nemzetközi ajánlásokban szereplő kritériumnak. A visszanyerési vizsgálatok azt mutatták, hogy a biológiai mátrixok előkészítése során az anyagunk 5 – 15 %-a elvész a standard oldatokhoz képest. Azonban az ajánlásokban megfogalmazottak szerint nem cél a 100 %-os kinyerési tényező, hanem az adott kinyerés mellett a módszerünk torzítatlansága és precizitása a mérvadó. Ennek a kritériumnak megfeleltek a kinyerési vizsgálatok RSD (%) értékei. A módszer rugalmasságának és zavartűrésének a vizsgálatai azt mutatták, hogy a mozgó fázis szerves összetevőjének (AcN) a változása jóval nagyobb mértékben befolyásolta a K203 retenciós idejét, mint a mozgó fázis pH-

jának a változtatása. A mérési körülmények ilyen mértékű változtatásával a vegyületünk továbbra is elválasztható maradt a biológiai mátrixok zavaró háttér csúcsaitól.

A stabilitás vizsgálatok alapján elmondható, hogy a vizsgált PA-k savas közegben gyors bomlást szenvednek, mely már t=4 °C-on is számottevő. Ez a tény különösen fontos a biológiai mátrixok mérésre való előkészítése során, a fehérjementesítésre alkalmazott savak használatakor, illetve a mérési körülmények megválasztásakor. A vizsgálandó vegyületünk bomlási folyamata kivédhető az alábbi lépések alkalmazásával:

- a mintákat a minta előkészítés és a RP-HPLC-s rendszerbe történő injektálásig t= -80 °C-on tároljuk
- a mintaelőkészítés során a fehérjementesítést követően a felülúszó pH-ját dietilamin-foszforsav (1:2 v/v) puffer segítségével 2,0-ra állítottuk be. (1:9 arányban, 10-szeres hígításban)
- a kromatográfiás mérések során a mintaadagoló belső terének, így az injektálandó mintáknak a hőmérsékletét t= 4 °C-ra állítottuk be.

Az EC, ill. UV detektálás alapján valószínűsíthető, hogy a bomlástermék egy oxidációs végtermék, hiszen az EC detektálás folyamán nem adott jelet, viszont 276 nm-en elnyelt. Bepárlás majd visszaoldás után a csúcs visszaalakult, ezért valószínűsíthető, hogy vízaddició történt az oxim csoportra.

7.3. A K203 farmakokinetikai paramétereinek meghatározása különböző állatmodellek esetén

Az állatok (patkány, kutya) K203 kis és nagy dózisával (3 és 50 µmol/200g) történő i.m. kezelését követően bifázisos eliminációs kinetikát mutatott a szérum esetében. A vegyületünk viszonylag rövid idő (15 – 20 perc) alatt elérte szérumbeli maximális koncentrációját, majd nagy dózis esetén 0-ad rendű kinetikát követve (patkány esetében 15 és 60 perces, míg kutya esetében a 30 és 120 perces időintervallumban) ürült a szervezetből. A K203 maximális szérumkoncentrációjának meghatározásához több időpont lenne szükséges 8-22 perc között. Előzetes mérések alapján ezek a vegyületek a vizelettel ürülnek. A szérum koncentráció közel azonos arányban csökkent, ezért

valószínűsíthető, hogy az 50 μmol beadott anyagmennyiség a vese valamely aktív transzportere segítségével ürül, ami ez a nagy mennyiség hatására telítődik.

A KIR hatóanyagtartalma a CSF-ből mérhető, a mintavétel alkalmával minden esetben víztisza folyadékot kaptunk, mely vérrel nem volt szennyezett. A K203 KIR tartalma az irodalmi adatokkal összeegyeztethető volt. Érdekesség, hogy a maximum nem 15 percnél, hanem később jelentkezik, mely újabb bizonyítéka lehet az aktív transzportnak. Az agyhomogenizátum esetében is hasonló jelenséget tapasztaltunk. A szem a szérumszintet követte, nem volt benne felhalmozódás.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben egy, a tabun mérgezés esetén rendkívül hatékony, a terápiás kezelések során antidótumként is alkalmazható, újonnan kifejlesztett PA, a K203 farmakokinetikai paramétereit tanulmányoztuk különböző állatmodellek esetén RP-HPLC módszer segítségével. Erre a célra sikerült egy költséghatékony, optimalizált és validált kromatográfiás eljárást kidolgoznunk.

Vizsgálataink során meghatároztuk a K203 és többi hasonló szerkezetű vegyület logP és TPSA értékeit, amellyel igazoltuk rendkívül hidrofil tulajdonságukat. A módszer fejlesztése során az ionpárképző megfelelő koncentrációban történő alkalmazásával sikerült ezen erősen hidrofil vegyületet fordított fázison elválasztani különböző biológiai minták zavaró háttércsúcsaitól.

Módszerünk validálása során meghatároztuk azokat a paramétereket, amelyek bizonyították alkalmazhatóságát nemcsak a K203, de a többi hasonló szerkezetű PA farmakokinetikai paramétereinek kromatográfiás úton történő meghatározására. A validálás részét képező stabilitás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a K203 savas környezetben erőteljesen bomlik, ezért erre különös figyelmet kell fordítani a kísérletek mintaelőkészítési fázisában valamint a mérés során is. A stabilitásból eredő problémák az általunk leírt ajánlások betartásával kiküszöbölhetőek. Stabilitási vizsgálataimmal hozzájárultam egy megfelelő lejárati idejű gyógyszerformula kidolgozásához.

Az általunk kidolgozott validált módszer egyszerűen és rutinszerűen alkalmazható a K203 szérumból, CSF-ből, valamint a módszer érzékenységének növelésével agyszövet homogenizátumokból történő mennyiségi meghatározására az állatkísérletek során.

Állatkísérleteinkben patkány és beagle kutya modelleken vizsgáltuk a K203 dózisfüggő kinetikáját a szervezet különböző kompartmentjeiben. Megállapítottuk, hogy a K203 nulladrendű eliminációs kinetikát követve ürül ki a szérumból, miután az i.m. kezelést követően hamar elérte a maximális koncentrációját, ami egyben igazolja az i.m. beadási mód hatékonyságát is. Igazoltuk, hogy a K203 rendkívül hidrofil tulajdonsága ellenére átjut a vér-agy gáton, tehát KIR károsodását kivédheti, csökkentheti.

9. SUMMARY

K203 is a newly synthesized bispyridinium monoaldoxime type antidote with potential use in organophosphate poisoning, especially in the case of tabun-poisoned subjects.

The aim of our studies was to develop a bioanalytical method for K203 using reverse-phase HPLC (RP-HPLC) technique to measure the tissue levels of K203 in blood serum, brain areas, eyes and CSF for pharmacokinetic studies in rats and beagle dogs. The method could be applicable to determine the blood brain barrier (BBB) penetration of K203 as well.

In the first series of our experiments logP and TPSA values of different K-compounds (K27, K48, K74, K75, K203, K1000) were determined using an *in silico* method. Results confirmed the very hydrophilic character of the compounds. During the method development and optimization of the RP-HPLC method effects of the quantity and quality of ion-pairing agents, methods of sample preparation, effect of temperature, chemical stability of the analyte were determined beside of the optimal wavelength (UV detection) and cell current (electrochemical (EC) detection) for the sensitive determination of K203.

Validation of the optimized bioanalytical method with both UV and EC detections was carried out according to the internationally accepted (FDA, EMA) guidelines determining selectivity, specificity, accuracy, precision, linearity of calibration curves, limit of detection, limit of quantitation, recovery, robustness, ruggedness and stability.

Using the newly developed and validated method pharmacokinetics of low and high doses of K203 were studied in rats and beagle dogs. Time dependence of the concentrations in the plasma, in the CSF, in seven brain areas (hippocampus, hypothalamus, brainstem, medulla oblongata, spinal cord, striatum, frontal cortex) were determined. It was evidenced, that K203 penetrates the BBB in therapeutically effective amount. It was found, that K203 excretion follows a zero order kinetics in case of the high dose both in rats and beagle dogs, however in case of low dose the kinetics follows a first order. It was also shown, that the brain/plasma ratio and the brain/ CSF ratio is changing with the time following the administration.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Antonijevic B and Stojiljkovic MP. (2007) Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. Clin Med Res, 5 (1): 71-82.

Bajgar J. (2004) Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. Adv Clin Chem, 38: 151-216.

Bajgar J. (2005) Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. Acta Medica (Hradec Kralove), 48 (1): 3-21.

Bajgar J, Hajek P, Kassa J, Slizova D, Krs O, Karasova JZ, Fusek J, Capek L and Voicu VA. (2012) Combined approach to demonstrate acetylcholinesterase activity changes in the rat brain following tabun intoxication and its treatment. Toxicol Mech Methods, 22 (1): 60-66.

Balali-Mood M and Shariat M. (1998) Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. J Physiol-Paris, 92 (5–6): 375-378.

Barelli A, Soave PM, Del Vicario M and Barelli R. (2011) New experimental Oximes in the management of organophosphorus pesticides poisoning. Minerva Anestesiol, 77 (12): 1197-1203.

Benkő B, Laufer R and Ohmacht R. (2007) HPLC analysis of microsomal metabolism of K-48. Acta Chromatogr, (19): 61-72.

Bertolote JM, Fleischmann A, Eddleston M and Gunnell D. (2006) Deaths from pesticide poisoning: a global response. Brit J Psychiat, 189: 201-203.

Calic M, Vrdoljak AL, Radic B, Jelic D, Jun D, Kuca K and Kovarik Z. (2006) In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. Toxicology, 219 (1-3): 85-96.

Cassel G, Karlsson L, Waara L, Ang KW and Goransson-Nyberg A. (1997) Pharmacokinetics and effects of HI 6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: a microdialysis study. Eur J Pharmacol, 332 (1): 43-52.

Chatonnet A and Lockridge O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem J, 260 (3): 625-634.

Clark DE. (1999) Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. J Pharm Sci, 88 (8): 815-821.

CompuDrug Inc. The Pallas program is a Trademark of CompuDrug Inc., www.compudrog.com

Csermely T, Petroianu G, Kuca K, Fűrész J, Darvas F, Gulyás Z, Laufer R and Kalász H. (2007) TLC of quaternary pyridinium aldoximes, antidotes of organophosphorus esterase inhibitors. JPC-J Planar Chromat, 20 (1): 39-42.

De Bleecker JL. Organophosphate and carbamate poisoning. In: Andrew GE (szerk.), Handbook of Clinical Neurology. Elsevier, 2008:13.

Eddleston M, Buckley NA, Eyer P and Dawson AH. (2008) Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. Lancet, 371 (9612): 597-607.

Furka Á. Szerves Kémia.3 ed. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 1998:439-440.

Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR and Konradsen F. (2007) The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. BMC Public Health, 7: 357.

Gupta RC. Chapter 2 - Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In: Ramesh CG (szerk.), Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. Academic Press, Burlington, 2006.

Gyenge M, Kalasz H, Petroianu GA, Laufer R, Kuca K and Tekes K. (2007) 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 (1-2): 146-151.

Hollósy F. A vegyi hadviselés története. Az idegmérgek. Természet Világa. Tudományos Ismeretterjesztő Társulat, Budapest, 2003, 134 (6):

Horvath C, Melander W, Molnar I and Molnar P. (1977) Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. Anal Chem, 49 (14): 2295-2305.

Johnson MK, Jacobsen D, Meredith TJ, Eyer P, Heath AJ, Ligtenstein DA, Marrs TC, Szinicz L, Vale JA and Haines JA. (2000) Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. Emergency Medicine, 12 (1): 22-37.

Jokanovic M and Prostran M. (2009) Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. Curr Med Chem, 16 (17): 2177-2188.

Jokanovic M and Kosanovic M. (2010) Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. Environ Toxicol Pharmacol, 29 (3): 195-201.

Kalasz H, Hasan MY, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludanyi K, Gergely A and Tekes K. (2006) HPLC analysis of K-48 concentration in plasma. Anal Bioanal Chem, 385 (6): 1062-1067.

Kalasz H, Laufer R, Szegi P, Kuca K, Musilek K and Tekes K. (2008) HPLC Study of the Pharmacokinetics of K-203. Acta Chromatogr, 20 (4): 575-584.

Kalasz H and Tekes K. (2009a) Terrorist attacks or poisoning by organophosphate pesticides - Is there any defence? BenSci, 1 (1): 3-5.

Kalasz H, Szoko E, Tabi T, Petroianu GA, Lorke DE, Omar A, Alafifi S, Jasem A and Tekes K. (2009b) Analysis of Pralidoxime in Serum, Brain and CSF of Rats. Med Chem, 5 (3): 237-241.

Karasova JZ, Chladek J, Hroch M, Josef F, Hnidkova D and Kuca K. (2011) Pharmacokinetic study of two acetylcholinesterase reactivators, trimedoxime and newly synthesized oxime K027, in rat plasma. J Appl Toxicol.

Karczmar A. (1998) Invited Review Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. Neurochem Int, 32 (5–6): 401-411.

Kardos SA and Sultatos LG. (2000) Interactions of the Organophosphates Paraoxon and Methyl Paraoxon with Mouse Brain Acetylcholinesterase. Toxicol Sci, 58 (1): 118-126.

Kassa J. (2002) Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. J Toxicol Clin Toxicol, 40 (6): 803-816.

Kassa J, Jun D, Karasova J, Bajgar J and Kuca K. (2008a) A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in soman, cyclosarin and tabun-poisoned rats. Chem-Biol Interact, 175 (1-3): 425-427.

Kassa J, Jun D, Karasova J, Bajgar J and Kuca K. (2008b) A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in soman, cyclosarin and tabun-poisoned rats. Chem Biol Interact, 175 (1-3): 425-427.

Kassa J, Karasova J, Musilek K and Kuca K. (2008c) An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. Toxicology, 243 (3): 311-316.

Kassa J, Karasova JZ, Musilek K and Kuca K. (2009a) A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of newly-developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) in cyclosarin-poisoned rats and mice. Toxicol Mech Method, 19 (5): 346-350.

Kassa J, Karasova J, Vasina L, Bajgar J, Kuca K and Musilek K. (2009b) A comparison of neuroprotective efficacy of newly developed oximes (K203, K206) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats. Drug Chem Toxicol, 32 (2): 128-138.

Kassa J, Karasova JZ and Tesarova S. (2011a) A comparison of the neuroprotective efficacy of individual oxime (HI-6) and combinations of oximes (HI-6+trimedoxime, HI-6+K203) in soman-poisoned rats. Drug Chem Toxicol, 34 (3): 233-239.

Kassa J, Karasova JZ, Sepsova V and Caisberger F. (2011b) The benefit of combinations of oximes for the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of sarin poisoning in rats and mice. Basic Clin Pharmacol, 109 (1): 30-34.

Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP and Ploemen JP. (1999) Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. Pharm Res, 16 (10): 1514-1519.

Kovács P and Kelemen K. Részletes méregtan: Nemfémes elemek és egyéb toxikus szerek okozta mérgezések. In: Gyires K and Fürst Z (szerk.), Farmakológia és farmakoterápia I. (Egytemi tankönyv). Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007:16.

Kovarik Z, Vrdoljak A, Berend S, Katalinić M, Kuč K, Musilek K and Radić B. (2009) Evaluation of Oxime K203 as Antidote in Tabun Poisoning. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 60 (1): 19-26.

Krummer SK, Thiermann HT, Worek FW and Eyer PE. (2002) Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate. Arch Toxicol, 76 (10): 589-595.

Kuca K, Bielavský J, Cabal J and Kassa J. (2003a) Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. Bioorg Med Chem Lett, 13 (20): 3545-3547.

Kuca K and Kassa J. (2003b) A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime--1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. J Enzyme Inhib Med Chem, 18 (6): 529-535.

Kuca K, Bielavský J, Cabal J and Bielavská M. (2003c) Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase—1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium)propane dibromide. Tetrahedron Lett, 44 (15): 3123-3125.

Kuca K and Kassa J. (2004) In vitro reactivation of acetylcholinesterase using the oxime K027. Vet Hum Toxicol, 46 (1): 15-18.

Kuca K, Cabal J, Musilek K, Jun D and Bajgar J. (2005a) Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. J Appl Toxicol, 25 (6): 491-495.

Kuca K, Cabal J, Jun D, Kassa J, Bartosova L, Kunesova G and Dohnal V. (2005b) Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators - antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. Biomed Pap, 149 (2): 429-431.

Kuca K, Juna D and Musilek K. (2006) Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. Mini-Rev Med Chem, 6 (3): 269-277.

Kuca K, Cabal J, Jun D and Musilek K. (2007a) In vitro reactivation potency of acetylcholinesterase reactivators--K074 and K075--to reactivate tabun-inhibited human brain cholinesterases. Neurotox Res, 11 (2): 101-106.

Kuca K, Jun D and Bajgar J. (2007b) Currently used cholinesterase reactivators against nerve agent intoxication: comparison of their effectivity in vitro. Drug Chem Toxicol, 30 (1): 31-40.

Kuca K, Musilek K, Pohanka M, Dohnal V and Patocka J. (2009) Reactivation potency of the acetylcholinesterase reactivator obidoxime is limited. Biomed Pap 153 (4): 259-262.

Kuca K, Hrabinova M, Soukup O, Tobin G, Karasova J and Pohanka M. (2010) Pralidoxime--the gold standard of acetylcholinesterase reactivators--reactivation in vitro efficacy. Bratisl Med J, 111 (9): 502-504.

Laufer R, Bathori M, Csermely T, Petroianu G, Kuca K, Toth N and Kalasz H. (2007) TLC determination of hydrophilicity parameter of some pyridinium aldoximes. J Liq Chromatogr R T, 30 (15): 2337-2344.

Leo A, Hansch C and Elkins D. (1971) Partition coefficients and their uses. Chem Rev, 71 (6): 525-616.

Lorke DE, Hasan MY, Arafat K, Kuca K, Musilek K, Schmitt A and Petroianu GA. (2008) In vitro oxime protection of human red blood cell acetylcholinesterase inhibited by diisopropyl-fluorophosphate. J Appl Toxicol, 28 (4): 422-429.

Lorke DE, Hasan MY, Nurulain SM, Kuca K, Schmitt A and Petroianu GA. (2009) Efficacy of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) in rats exposed to diisopropylfluorophosphate: comparison with pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime, and HI-6. Toxicol Mech Method, 19 (4): 327-333.

Lundy PM, Hill I, Lecavalier P, Hamilton MG, Vair C, Davidson C, Weatherby KL and Berger BJ. (2005) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of two HI-6 salts in swine and efficacy in the treatment of GF and soman poisoning. Toxicology, 208 (3): 399-409.

Lundy PM, Raveh L and Amitai G. (2006) Development of the bisquaternary oxime HI-6 toward clinical use in the treatment of organophosphate nerve agent poisoning. Toxicol Rev, 25 (4): 231-243.

Marrs TC. (1993) Organophosphate poisoning. Pharmacol Therapeut, 58 (1): 51-66.

Masson P, Nachon F and Lockridge O. (2010) Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases. Chem-Biol Interact, 187 (1–3): 157-162.

Mercey G, Verdelet T, Renou J, Kliachyna M, Baati R, Nachon F, Jean L and Renard PY. (2012) Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. Accounts Chem Res, 45 (5): 756-766.

Molnár L, Keserű GM, Papp Á, Gulyás Z and Darvas F. (2004) A neural network based prediction of octanol–water partition coefficients using atomic5 fragmental descriptors. Bioorg Med Chem Lett, 14 (4): 851-853.

Musilek K, Kuca K, Jun D and Dolezal M. (2007a) In vitro reactivation potency of bispyridinium (E)-but-2-ene linked acetylcholinesterase reactivators against tabun-inhibited acetylcholinesterase. In vitro, 5 (1): 25-30.

Musilek K, Kuca K, Jun D and Dolezal M. (2007b) Progress in Synthesis of New Acetylcholinesterase Reactivators During the Period 1990-2004. Curr Org Chem, 11 (2): 229-238.

Musilek K, Holas O, Jun D, Dohnal V, Gunn-Moore F, Opletalova V, Dolezal M and Kuca K. (2007c) Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker: preparation and reactivation of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. Bioorgan Med Chem, 15 (21): 6733-6741.

Musilek K, Jun D, Cabal J, Kassa J, Gunn-Moore F and Kuca K. (2007d) Design of a Potent Reactivator of Tabun-Inhibited AcetylcholinesteraseSynthesis and Evaluation of (E)-1-(4-Carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene Dibromide (K203). J Med Chem, 50 (22): 5514-5518.

Nurulain SM, Lorke DE, Hasan MY, Shafiullah M, Kuca K, Musilek K and Petroianu GA. (2009) Efficacy of eight experimental bispyridinium oximes against paraoxon-induced mortality: comparison with the conventional oximes pralidoxime and obidoxime. Neurotox Res, 16 (1): 60-67.

Okudera H. (2002) Clinical features on nerve gas terrorism in Matsumoto. J Clin Neurosci, 9 (1): 17-21.

Okuno S, Sakurada K, Ohta H, Ikegaya H, Kazui Y, Akutsu T, Takatori T and Iwadate K. (2008) Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. Toxicol Appl Pharm, 227 (1): 8-15.

Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ariel N, Segall Y, Velan B and Shafferman A. (1998) Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase. J Biol Chem, 273 (31): 19509-19517.

Paddle BM and Dowling MH. (1993) Simple high-performance liquid chromatographic method for assessing the deterioration of atropine-oxime mixtures employed as antidotes in the treatment of nerve agent poisoning. J Chromatogr A, 648 (2): 373-380.

Palm K, Stenberg P, Luthman K and Artursson P. (1997) Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. Pharm Res, 14 (5): 568-571.

Patocka J, Kuca K and Jun D. (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. Acta Medica (Hradec Kralove), 47 (4): 215-228.

Patocka J, Cabal J, Kuca K and Jun D. (2005) Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. J Appl Biomed, 3: 91-99.

Petroianu GA, Arafat K, Kuca K and Kassa J. (2006a) Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: in vitro reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by paraoxon. J Appl Toxicol, 26 (1): 64-71.

Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Al-Sultan MA, Kuca K and Kassa J. (2006b) Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon. J Appl Toxicol, 26 (3): 262-268.

Petroianu GA, Lorke DE, Hasan MY, Adem A, Sheen R, Nurulain SM and Kalasz H. (2007) Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats. J Appl Toxicol, 27 (4): 350-357.

Petroianu GA. (2008) The history of cholinesterase inhibitors: who was Moschnin(e)? Pharmazie, 63 (4): 325-327.

Petroianu GA. (2009) The synthesis of phosphor ethers: who was Franz Anton Voegeli? Pharmazie, 64 (4): 269-275.

Petroianu GA. (2010a) History of organophosphate synthesis: the very early days. Pharmazie, 65 (4): 306-311.

Petroianu GA. (2010b) Toxicity of phosphor esters: Willy Lange (1900-1976) and Gerda von Krueger (1907-after 1970). Pharmazie, 65 (10): 776-780.

Petroianu GA, Lorke DE and Kalasz H. (2012) Comparison of the Ability of Pyridinium Aldoximes to Reactivate Human Red Blood Cell Acetylcholinesterases Inhibited by ethyl- and methyl-paraoxon. Curr Org Chem, 16 (10): 1359-1369.

Pohjola J and Harpf M. (1994) Determination of atropine and obidoxime in automatic injection devices used as antidotes against nerve agent intoxication. J Chromatogr A, 686 (2): 350-354.

Poziomek EJ, Hackley BE and Steinberg GM. (1958) Pyridinium Aldoximes1. J Org Chem, 23 (5): 714-717.

Primožič I, Odžak R, Tomić S, Simeon-Rudolf V and Reiner E. (2004) Pyridinium, imidazolium, and quinucludinium oximes: synthesis, interaction with native and phosphylated cholinesterases, and antidotes against organophosphates. J Med Chem, 2: 1.

Reiner E and Simeon-Rudolf V. (2006) Pyridinium, imidazolium and quinuclidinium compounds: toxicity and antidotal effects against the nerve agents tabun and soman. Arh Hig Rada Toksiko, 57 (2): 171.

Richardson RJ. 13.25 - Anticholinesterase Insecticides. In: Charlene AM (szerk.), Comprehensive Toxicology (Second Edition). Elsevier, Oxford, 2010:25.

Rosenfeld CA and Sultatos LG. (2006) Concentration-dependent kinetics of acetylcholinesterase inhibition by the organophosphate paraoxon. Toxicol Sci, 90 (2): 460-469.

Rotenberg JS and Newmark J. (2003) Nerve Agent Attacks on Children: Diagnosis and Management. Pediatrics, 112 (3): 648-658.

Sakurada K, Matsubara K, Shimizu K, Shiono H, Seto Y, Tsuge K, Yoshino M, Sakai I, Mukoyama H and Takatori T. (2003) Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier. Neurochem Res, 28 (9): 1401-1407.

Singh H, Moorad-Doctor D, Ratcliffe RH, Wachtel K, Castillo A and Garcia GE. (2007) A rapid cation-exchange HPLC method for detection and quantification of pyridinium oximes in plasma and tissue. J Anal Toxicol, 31 (2): 69-74.

Stenzel J, Worek F and Eyer P. (2007) Preparation and characterization of dialkylphosphoryl-obidoxime conjugates, potent anticholinesterase derivatives that are quickly hydrolyzed by human paraoxonase (PON1192Q). Biochem Pharmacol, 74 (9): 1390-1400.

Stepankova S and Komers K. (2008) Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. Curr Enzym Inhib, 4 (4): 160-171.

Suzuki T, Morita H, Ono K, Maekawa K, Nagai R and Yazaki Y. (1995) Sarin poisoning in Tokyo subway. Lancet, 345 (8955): 980.

Szegi P, Kalasz H, Laufer R, Kuca K and Tekes K. (2010) Pyridinium aldoxime analysis by HPLC: the method for studies on pharmacokinetics and stability. Anal Bioanal Chem, 397 (2): 579-586.

Tekes K, Hasan MY, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludanyi K and Kalasz H. (2006) High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator. Journal of Chromatography A, 1122 (1-2): 84-87.

Tekes K, Szegi P, Laufer R and Kalasz H. Az acetilkolineszteráz gátlói és reaktivátorai a mindennapok gyakorlatában. . Gyógyszerészet. Magyar Gyógyszertudományi Társaság, Budapest, 2010, 54 (4):206-211

Tetko IV, Tanchuk VY and Villa AE. (2001) Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. J Chem Inf Comput Sci, 41 (5): 1407-1421.

Thiermann H, Eyer F, Felgenhauer N, Pfab R, Zilker T, Eyer P and Worek F. (2010) Pharmacokinetics of obidoxime in patients poisoned with organophosphorus compounds. Toxicol Lett, 197 (3): 236-242.

Utley D. (1987) Analysis of formulations containing pralidoxime mesylate by liquid chromatography. J Chromatogr A, 396: 237-250.

Wilson BW. Chapter 68 - Cholinesterases. In: Robert K (szerk.), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). Academic Press, New York, 2010.

Wilson IB and Ginsburg B. (1955) A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. Biochim Biophys Acta, 18 (1): 168-170.

Worek F, Thiermann H, Szinicz L and Eyer P. (2004) Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem Pharmacol, 68 (11): 2237-2248.

Worek F, Eyer P, Aurbek N, Szinicz L and Thiermann H. (2007) Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. Toxicol Appl Pharm, 219 (2–3): 226-234.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Ram N, Szegi P, Kuča K, Hashemi F and Tekes K. (2011) Stability monitoring of some acetylcholinesterase reactivating drugs. BMC Pharmacol, 11 (Suppl 2): A52.

Laufer R, Kalasz H, Musilek K, **Szegi P**, Darvas F, Kuca K and Tekes K. (2010) Synthesis, Antidotal Effects and HPLC Behavior of Some Novel Pyridinium Aldoximes. Curr Org Chem, 14 (5): 447-456.
IF.: 2.92

Szegi P, Kalasz H, Laufer R, Kuca K and Tekes K. (2010) Pyridinium aldoxime analysis by HPLC: the method for studies on pharmacokinetics and stability. Anal Bioanal Chem, 397 (2): 579-586.
IF.: 3.841

Tekes K, Szegi P, Laufer R and Kalasz H. (2010) Az acetilkolineszteráz gátlói és reaktivátorai a mindennapok gyakorlatában. Gyógyszerészet, 54 (4):206-211

Kalasz H, Laufer R, **Szegi P**, Kuca K, Musilek K and Tekes K. (2008) HPLC Study of the Pharmacokinetics of K-203. Acta Chromatogr, 20 (4): 575-584.
IF.: 0.621

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Tekes K, Hashemi F, **Szegi P**, Sotonyi P, Laufer R and Kalasz H. (2011) Prodrugs and active metabolites among antidepressive compounds. Neuropsychopharmacol Hung, 13 (2): 103-110.

Tekes K, **Szegi P**, Laufer R, Hantos M and Csaba G. (2011) Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain. Int J Dev Neurosci, 29 (2): 171-175.
IF.: 2.418

Petroianu G, Szoke E, Kalasz H, **Szegi P**, Laufer R, Benko B, Darvas F and Tekes K. (2009) Monitoring by HPLC of chamomile flavonoids exposed to rat liver microsomal metabolism. Open Med Chem J, 3: 1-7.

Szoke E, Petroianu G, Tekes K, Benko B, **Szegi P**, Laufer R and Veress G. (2009) HPLC Monitoring of the Microsomal Stability of Rutin and Quercetin. Acta Chromatogr, 21 (3): 399-410.
IF.: 0.676

Solti A, **Szegi P**, Basa B, Meszaros I and Sarvari E. (2008) Alleviation of Cd Induced Inhibition of Photosynthesis under Long-Term Cd Treatment in Poplar. Cereal Res Commun, 36: 239-242.

Lang F, **Szegi P**, Basa B, Solti A, Gaspar L, Tamas L, Meszaros I and Sarvari E. (2007) Time scale of the appearance of Cd effects on photosynthetically competent poplar leaves. Photosynth Res, 91 (2-3): 322-322.
IF.: 2.139

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik doktori disszertációm elkészültéhez hozzájárultak, valamint a dolgozat alapját képező kísérletek elvégzésében támogattak, segítettek.

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tekes Kornéliának, aki szakmai irányításával támogatott, értékes tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm azt a rengeteg értékes gyakorlati és elméleti tudást, amit átadott nekem. Nemcsak szakmailag, emberileg is nagyon sokat tanultam tőle.

A folyadékkromatográfiás kísérleti módszerek elsajátításában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és értékes tanácsaiért köszönettel tartozom Dr. Kalász Huba professzor úrnak.

Dr. Bagdy György professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet igazgatójának köszönöm az önzetlen anyagi és emberi segítséget, amelyek lehetővé tették a doktori munkám befejezését.

Köszönettel tartozom Dr. Magyar Kálmán professzor úrnak, programvezetőmnek a szakmai és emberformáló beszélgetésekért.

Köszönettel tartozom Dr. Török Tamás professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet volt igazgatójának, hogy kutatómunkámat az intézet berkein belül elkezdhettem.

A folyadékkromatográfiás kísérletek során nyújtott szakmai segítségért és tanácsaiért köszönettel tartozom Dr. Lengyel József tudományos főmunkatársnak.

Köszönettel tartozom Dr. Laufer Rudolf PhD hallgató kollégámnak az állatkísérletes és kromatográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségéért és nem utolsó sorban a baráti támogatásért.

A kísérleti módszerek elsajátításában és elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen és kiváló technikai segítségért, valamint a családias és baráti légkör megteremtéséért köszönettel tartozom Divikiné Gúth Györgyikének és Fejes Évának.

Hálával tartozom a Gyógyszerhatástani Intézet valamennyi munkatársának barátságukért és támogatásukért.

Köszönettel tartozom az Aesculap Alapítványnak az általuk nyújtott anyagi támogatásért, amely hathatós mértékben segített a doktori disszertációm elkészítésében.

DOI:10.14753/SE.2014.1960

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani feleségemnek, Szegi-Bíró Ildikónak, családomnak, barátaimnak kitartó türelmükért és támogatásukért a disszertációm megírásának időszaka alatt.