

ФАРМАЦИЯ

PHARMACIA

Том/Volume LIV

2007

Книжка/Number 3-4

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

Главен редактор: Ст. Николов

Секретар: Ал. Златков

Редакционна колегия:

Зл. Димитрова, Св. Богданова, И. Иванов, Г. Китанов, И. Йонкова, Н. Данчев, Г. Петрова,
Д. Обрешкова, Ст. Титева, И. Костадинова, Ф. Клерфьой, Е. Х. Хансен,
М. Шефер, Р. Грьонинг, Л. Пистели, М. Унзета

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Editor in Chief: St. Nikolov

Assistant Editor: Al. Zlatkov

Editorial Board:

Zl. Dimitrova, Sv. Bogdanova, I. Ivanov, G. Kitanov, I. Jonkova, N. Danchev, G. Petrova, D. Obreshkova,
St. Titeva, I. Kostadinova, F. Clerfeuille, E. H. Hansen, M. Schaefer,
R. Gröning, L. Pistelli, M. Unzeta

Адрес на редакцията

Фармацевтичен факултет
ул. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4

Гл. редактор: ☎ (02) 987 987 4
E-mail: snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board

Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4

Editor in Chief: ☎ (+359 2) 987 987 4
E-mail: snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

Оригинални статии

<i>A. M. Kottenko, A. I. Tikhonov, Yu. V. Chernykh, O. S. Shpichak и L. I. Tseblykina.</i> Използване на триизмерна флуоресцентна спектроскопия в проучването на лекарства на базата на медени продукти	3
<i>G. Momekov, P. Todorov, E. Naydenova, A. Kostovski и K. Troev.</i> Цитотоксична активност на нови α -аминофосфоновы киселини при човешки малигнени клетъчни линии	9
<i>D. Terziivanov, K. Bozhinova, Em. Hristov, Iv. Atanasova и V. Lindareva.</i> Приложение на стратегията за D-оптималните времена и популационния фармакокинетичен анализ при биофармацевтично проучване на ампицилин	12
<i>V. Tzankova, B. Doncheva, S. Dragoni и M. Valoti.</i> Метаболизъм на 7-ethoxycoumarin в чернодробни срезове, получени по техниката "precision-cut"	17
<i>T. Dimitrov и N. Boyadjeva.</i> Сравнителна оценка на токсичността на Chlorpheniramine и Dexchlorpheniramine при мишки и плъхове и влиянието им върху хематологичните показатели при хроничната им токсичност при плъхове.....	23

Обзори

<i>V. Slavova и N. Boyadjeva.</i> Полови хормони – фармакологични и терапевтични аспекти	31
<i>M. Draganova-Filipova, V. Saraftian и L. Peychev.</i> Влияние на прополис върху клетъчната пролиферация и имунния отговор.....	42

Информационен отдел	48
----------------------------------	----

CONTENTS

Original articles

<i>A. M. Kottenko, A. I. Tikhonov, Yu. V. Chernykh, O. S. Shpichak and L. I. Tseblykina.</i> Using three-dimensional fluorescent spectroscopy while studying drugs on the basis of apiculture products	3
<i>G. Momekov, P. Todorov, E. Naydenova, A. Kostovski and K. Troev.</i> Cytotoxic activity of new α -aminophosphonic acids against human malignant cell lines	9
<i>D. Terziivanov, K. Bozhinova, Em. Hristov, I. Atanasova and V. Lindareva.</i> Application of D-optimal timing strategy and population pharmacokinetic analysis in biopharmaceutical trials of ampicillin	12
<i>V. Tzankova, B. Doncheva, S. Dragoni and M. Valoti.</i> Metabolism of 7-ethoxycoumarin by rat precision-cut liver slices	17
<i>T. Dimitrov and N. Boyadjeva.</i> Comparative assesment of the toxicity of Chlorpheniramine and Dexchlorpheniramine in mice and rats and their influence on the hematological indices in the chronic toxicity in rats	23

Reviews

<i>V. Slavova and N. Boyadjeva.</i> Sex hormones – pharmacological and therapeutic aspects	31
<i>M. Draganova-Filipova, V. Saraftian and L. Peychev.</i> Effects of propolis on cell proliferation and immune response.....	42

Informasion section	48
----------------------------------	----

ФАРМАЦИЯ 3-4/2007

ISSN 0428-0296

УДК 615

Организационен секретар и стилов редактор Св. Цветанова
Корекция Д. Танчева и Св. Цветанова
Терминологичен и семантичен контрол д-р Б. Станчева
Форматиране О. Маркова

Подписана за печат на 25.02.2008 г.
Печатни коли 7,5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски“ № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

МЕТАБОЛИЗЪМ НА 7-ЕТНОХОУСОУМАРИН В ЧЕРНОДРОБНИ СРЕЗОВЕ, ПОЛУЧЕНИ ПО ТЕХНИКАТА “PRECISION-CUT”

В. Цанкова¹, Б. Дончева¹, С. Драгони² и М. Валоти²

¹Катедра по фармакология и токсикология, Фармацевтичен факултет,
Медицински университет – София

²Катедра по биомедицински науки, Фармацевтичен факултет, Университет в Сиена – Италия

Резюме. “Precision-cut” чернодробните срезове са *in vitro* модел, който се използва за проучване на метаболизма или токсичността на нови лекарствени вещества. Целта на настоящото проучване е да се изследва метаболитният капацитет на “precision-cut” чернодробните срезове по отношение на метаболизма на 7-етоксикумарин. “Precision-cut” чернодробните срезове се приготвят от тъканни парчета чрез Krumdieck tissue slicer. След преинкубационен период от 30 min, срезовете се инкубират поотделно в среда от RPMI1640 при $t = 37^{\circ}\text{C}$ за период от 2, 4, 6 и 24 h. В инкубационната среда е добавен субстратът 7-етоксикумарин 50 μM . За оценка на жизнеността на препаратите се определя количеството на освободената лактатдеhidrogenаза (LDH) както в преинкубационната, така и в инкубационната среда. Количеството на свободния 7-хидроксикумарин, както и на неговите метаболитни продукти, е определено спектрофлуориметрично. Резултатите от изследването показват, че чернодробните срезове са подходящ *in vitro* модел за комплексна оценка на метаболитните реакции във фаза I и II на биотрансформацията на 7-етоксикумарин.

Ключови думи: precision-cut чернодробни срезове, 7-етоксикумарин, метаболизъм, 7-хидроксикумарин

METABOLISM OF 7-ETHOXYCOUMARIN BY RAT PRECISION-CUT LIVER SLICES

V. Tzankova¹, B. Doncheva¹, S. Dragoni² and M. Valoti²

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Facolta di Farmacia, Universita degli studi di Siena

Summary. Precision cut liver slices are used in the study of drug metabolism and toxicity. The aim of the study is to investigate the metabolism of 7-ethoxycoumarin in precision cut liver slices. Liver slices were prepared from liver cores by Krumdieck tissue slicer. After 30 min preincubation period, the liver slices were incubated in RPMI1640 medium, $t = 37^{\circ}\text{C}$, for 2h, 4h, 6h, 24h. 7-ethoxycoumarin 50 μM was added to the incubation medium. The viability of the preparation was evaluated by LDH release in both preincubation and incubation medium. The amount of free 7-hydroxycoumarin and its glucuronide and sulfate conjugates was measured spectrofluorometrically. The results of the study showed that the precision cut liver slices are an appropriate *in vitro* model for complex evaluation of phase I and phase II metabolism of 7-ethoxycoumarin.

Key words: precision cut liver slices, 7-ethoxycoumarin, metabolism, 7-hydroxycoumarin

Въведение

В черния дроб се метаболизират много ендогенни вещества и ксенобиотици. Проучването на метаболитните реакции от фаза I и фаза II на биотрансформацията е важна част от оценката на безопасността на едно ново лекарство. Известни са различни *in vitro* методи за проучване на лекарствения метаболизъм и токсичността на лекарствата. Те включват изолиране на хепатоцити, субклетъчни фракции, микростоми, пречисте-

ни ензимни фракции и чернодробни срезове. Тези методи са широко използвани при фармако-токсикологичните проучвания [7, 9, 14, 16].

През последните години се наблюдава повишен интерес към използването на тъканните срезове поради разработването на апаратурни подобрения за приготвянето на еднакви, прецизно отделени (“precision-cut”) чернодробни срезове, както и вследствие на разработването на нови, оптимизирани среди и методи за инкубация, които да поддържат продължително вре-

ме жизнеността на срезове. Методът на чернодробни срезове представлява важна част от *in vitro* техниките. Той е междинно звено между широко използваните методи за култивиране на клетки и много по-сложната система на изолиран перфузиран орган. Методът на тъканните срезове може да предостави ценна фармако-токсикологична информация за едно лекарствено вещество. Той има много предимства: не са необходими протеолитични ензими при приготвянето на препаратите; чернодробните клетки остават интактни; поддържат се нормалната клетъчна хетерогенност и междуклетъчните взаимодействия. Методът позволява запазването на клетъчната структура, което дава възможност за проследяване на лекарствения метаболизъм от няколко часа до няколко дни.

Алкокумарините са често използвани като моделни субстрати за охарактеризиране на метаболитната активност при различни животински видове [1, 4, 9, 17]. Тези субстрати позволяват анализирането на активността на ензими както от фаза I на биотрансформацията (групата на цитохром P-450), така и на участващите в реакциите на фаза II (глюкуронидиране и сулфатно свързване).

Настоящото изследване представя данни за жизнеността и метаболитния капацитет по отношение на субстрата 7-етоксикумарин на тъканните срезове от черен дроб на плъх, приготвени по съвременната техника "precision-cut".

Материали и методи

Реактиви. В проучването са използвани: 7-ethoxycoumarin; 7-hydroxycoumarin; RPMI 1640 Medium; L-methionin; Hydrocortisone 21-hemisuccinate, BSA; β -glucuronidase; α -arylsulphatase; HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonic acid); Krebs-Henseleit буфер, закупени от Sigma (St. Louise, MO).

Експериментални животни. Използвани са мъжки плъхове от порода "Sprague-Dawleys" с тегло 220-260 g (Charles River, Italy). Животните са отглеждани при стандартни условия с достъп до храна и вода *ad libitum*. 16 часа преди експеримента е спрял достъпът им до храна. Черният дроб се перфузира с леденостуден физиологичен разтвор (0.9%) след екстракцията.

Получаване на срезове. Черният дроб се отделя на лобове. Със специален уред от него се получават малки, цилиндрични парчета с големина 8-11 mm (liver cores). С помощта на апарата Krumdieck tissue slicer (Alabama R&D, Mun-

ford, Alabama, USA), при температура 4°C от тези чернодробни сърцевини се правят срезове с дебелина 200-250 μ m. Процедурата по получаването на тъканни срезове се извършва в буфер Krebs-Henseleit, pH 7.4. Буферът, който е предварително наситен със смес от 95% O₂ + 5% CO₂, се използва за съхраняването на органа и на срезове. Критерии за селекция на срезове за експериментите са еднаквите размери и ненаранените повърхност и краища. Размерите на срезове се контролират периодично с помощта на микроскоп с микрометър.

Подготовка на срезове и инкубация. В експериментите са използвани по 2 среза за всяка инкубация на 2-рия, 4-тия, 6-ия и 24-тия час. Срезове се поставят в 12-ямкови микроплаки (AP Wyott, Baltimore, MD), съдържащи 1.5 ml преинкубационен разтвор (RPMI Medium – 100 ml; 5% v/v FCS – 5ml; 0.5 mM L-methionin; 1 μ M insulin; 0.1 mM hydrocortisone 21-hemisuccinate; Gentamicin (50 μ g/ml) – 100 μ l).

Извършва се преинкубация за 30 min, а преинкубационната среда се използва за по-нататъшно определяне на метаболити.

Срезове се промиват в разтвор на 0.2 M Tris/HCl, 0.154 M KCl, pH 7.4 и се прехвърлят в нови микроплаки, съдържащи 1.5 ml пресен инкубационен разтвор и 50 μ M 7-етоксикумарин (субстрат). Инкубационният разтвор съдържа 50 μ M разтвор на 7-ethoxycoumarin/DMSO в RPMI; 0.2 M Tris HCl, pH 7.4; 50 mM Tris HCl, 0.154 M KCl, pH = 7.4; 30 mM Na-пируват в 0.2 M Tris HCl; 6.6 mM NADH в 0.2 M Tris HCl; 30 μ M Натетраборат; 0.5 M Na-ацетат; β -glucuronidase 5000 U/ml; α -arylsulphatase 250 U/ml.

Плаките се инкубират при температура 37°C. Инкубацията се преустановява на 2-рия, 4-тия, 6-ия или 24-тия час с отделяне на срезове. Тъканните срезове и инкубационната среда се използват за определяне на LDH на свободния и на конюгирия 7-хидроксикумарин.

Оценка на жизнеността на срезове. Оценката на жизнеността се извършва чрез определянето на количеството освободена LDH в инкубационната среда. Активността на LDH се установява спектрофотометрично чрез готови тестове Sigma Kit instructions (kit 228-UV). Кинетичните промени в абсорбцията при 340 nm са измерени на спектрофотометър Shimadzu UV-160[®]. Количеството на LDH се представя като процент от общото съдържание на маркерния ензим.

Определяне на свободен 7-хидроксикумарин. Анализът на пробите се извършва, като към 100 µl от инкубационната среда се добавят 900 µl 0.2 M Tris/HCl. Реакцията се прекратява с добавянето на 100 µl 4N HCl и 2 ml CHCl₃ за пълна екстракция на свободния 7-хидроксикумарин. Пробите се центрофугират на 300 rpm за 5 min. За пълна екстракция след отделянето на органичната фаза се прибавят 2 ml 30 µM разтвор на Na-тетраборат и се центрофугира. Количеството на свободния 7-хидроксикумарин се определя флуориметрично във водната фаза. За построяване на калибрационна крива се използва стандартен 7-хидроксикумарин (0.1-0.4 µM) [8].

Определяне на конюгиран 7-хидроксикумарин. Глюкуронидите и сулфатните конюгати на 7-ОН кумарин в инкубационната среда са подложени на специфични хидролитични ензими – глюкуронидаза и сулфатаза. Ензимната хидролиза е необходима за освобождаване на свободния 7-хидроксикумарин. От инкубационната среда се вземат по 3 проби от 200 µl. Ензимната хидролиза във всяка проба се извършва с 500 U глюкуронидаза и 10 U сулфатаза, съдържаща 20 mM d-saccharic acid 1,4-lactone в 0.2 M натриев ацетат, рН 5.1 (в обем 100 µl). Пробите се инкубират при 37°C в продължение на 16 часа. След инкубацията освобождаването на 7-хидроксикумарина се извършва чрез екстракция, както е описано по-горе, за определяне на свободния 7-хидроксикумарин. Количеството на свободния 7-хидроксикумарин се установява спектрофлуориметрично във водната фаза (excitation 370 nm; emission 450 nm). За построяване на калибрационна крива се използва стандартен 7-хидроксикумарин (0.1-0.4 µM).

Определяне на тъканния белтък. Чернодробните срезове се хомогенизират и съдържанието на протеините се определя спектрофотометрично по метода на Lowry и сътр. [10]. Стандартната крива е построена с прясно приготвени разтвори на BSA (bovine serum albumin). Стандартната крива е линейна при концентрации от 2 до 20 µg/ml.

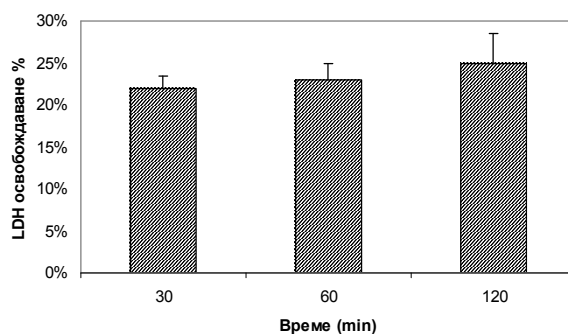
Статистическа обработка на резултатите. Статистическата оценка на резултатите е извършена чрез Student's t-test, като стойности на $p \leq 0.01$ са приети за статистически значими.

Резултати

Оценка на влиянието на фактора “преинкубация” върху жизнеността на чернодробните срезове. Преинкубацията на тъканните препара-

ти има важно значение за качеството на метаболитните или токсикологичните проучвания с чернодробни срезове. Тя се прави с цел изолиране на тъканните препарати от ензимите, освободени от увредените клетки по време на преинкубацията (LDH, ALT и др.). Това е изключително важна стъпка, особено ако като маркер за клетъчното увреждане се използва ензимната активност.

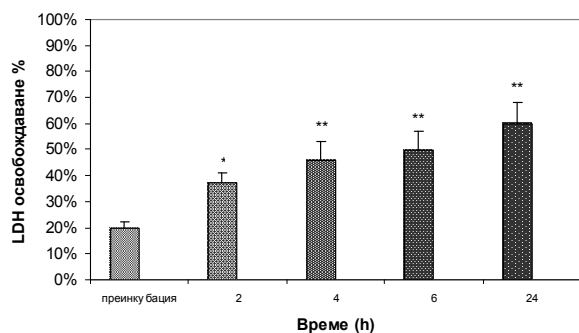
Препоръчаното време за преинкубация при метаболитни проучвания е до 30 min, а за токсикологични – до 120 min. Затова за целта на нашите експерименти бе избрано проследяване на показателя освобождаване на LDH за периода 0-120 min (фиг. 1). В резултат от проведените експерименти е установено, че при преинкубацията на чернодробни срезове в среда RPMI 1640 в продължение на 30 min освобождаването на LDH е по-малко от 25%. Не се наблюдава статистически значимо повишаване на количеството освободена LDH по време на целия проследяван период от 30 до 120 min.



Активността на ензима LDH в средата е представена като процент от общата активност. Представени са резултатите ± S.E.M за 8 препарата

Фиг. 1. Освобождаване на ензима LDH след преинкубация на контроли от чернодробни срезове от плъх ($n = 8$ среза за всяко определяне)

Оценка на жизнеността на чернодробните срезове в присъствие на субстрат. Проведени са серия експерименти за оценяване на жизнеността на чернодробните срезове в условията на продължителна инкубация до 24 h при температура 37°C, в присъствието на субстрата 7-хидроксикумарин (100 µM). В инкубационната среда е добавен като бактериостатичен агент Gentamicin – 50 µg/ml. Жизнеността на срезовете е оценявана на 2-рия, 4-тия, 6-ия и 24-тия час на инкубацията чрез определяне на количеството на освободената LDH в инкубационната среда (фиг. 2).



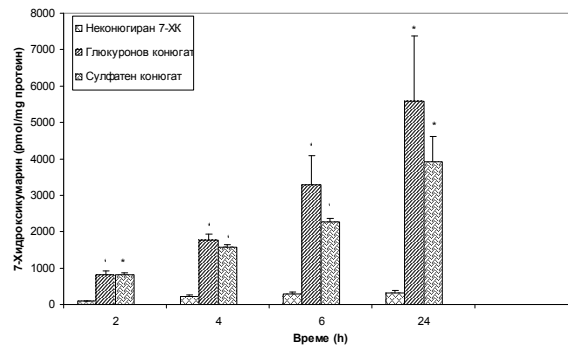
Активността на ензима LDH в средата е представена като процент от общата активност. Представени са резултатите \pm S.E.M. за 8 препарата. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ – статистическа значимост от стойностите при преинкубация

Фиг. 2. Оценка на жизнеността на чернодробните срезове на 2-рия, 4-тия, 6-ия и 24-тия час на инкубацията чрез определяне на количеството на освободената LDH в инкубационната среда

На 2-рия час от инкубацията количеството на освободената LDH в инкубационната среда е около 40%. Това количество остава относително постоянно до 6-ия час на инкубацията. На 24-тия час количеството на освободената LDH показва тенденция към повишаване, но без статистическа значимост по отношение на 4-тия и 6-ия час. Липсата на значително освобождаване на LDH за цялото време на инкубацията обаче показва, че чернодробните срезове, приготвени по метода "precision-cut", запазват своята жизненост и могат да се използват за по-нататъшна оценка на метаболитния капацитет.

Оценка на метаболитния капацитет на "precision-cut" чернодробните срезове чрез определяне на метаболизма на 7-етоксикумарин като субстрат за реакциите във фаза I и фаза II на лекарствения метаболизъм. За оценяване на метаболитния капацитет на чернодробните срезове е проведена инкубация с продължителност до 24 h при температура 37°C в присъствието на субстрата 7-етоксикумарин (50 μ M). 7-етоксикумаринът се метаболизира от ензимната система на цитохром P-450 чрез O-деетиране до 7-хидроксикумарин в реакция от I фаза на лекарствения метаболизъм. В инкубационната среда е добавен като бактериостатичен агент Gentamicin – 50 μ g/ml. Метаболитният капацитет на срезове е оценяван на 2-рия, 4-тия, 6-ия и 24-тия час на инкубацията чрез определяне на количеството на освободения, неконюгиран 7-хидроксикумарин и неговите глюкуронидни и сулфатни конюгати в инкубационната среда (фиг. 3). Преди определянето на коли-

чеството на свободния 7-хидроксикумарин и на неговите метаболити се измерва количеството на протеините във всеки срез.



Стойностите са представени в pmol/mg протеин \pm S.D. ($n = 3$ плъха). Субстратът на реакцията е добавен след 30 min преинкубационен период. Метаболитите са определени, както е описано в „Материали и методи“.

*Статистическа значимост ($P \leq 0.001$) от стойностите на неконюгирания 7-ХК

Фиг. 3. Метаболитен профил на 7-етоксикумарин

Анализът на резултатите показва слабо повишаване на количеството на свободния 7-хидроксикумарин във времеви интервал от 2-рия до 24-тия час. Наблюдава се правопрпорционално увеличение в същия интервал от време на конюгираните метаболити, като се забелязва преференциалният път на глюкуронидиране. Количеството на свободния 7-хидроксикумарин е 316.70 pmol/mg протеин на 24-тия h от инкубацията. Установена е линейна зависимост в продукцията на глюкуронидните и сулфатните конюгати на 7-хидроксикумарин в реакциите на II фаза на лекарствения биотрансформация. Количеството на глюкуронидните конюгати е от 706.17 pmol/mg протеин на 2-рия h до 4099.67 pmol/mg протеин на 24-тия h от инкубацията, а на сулфатните конюгати – от 670.84 pmol/mg протеин на 2-рия h до 3984.10 pmol/mg протеин на 24-тия h от инкубацията.

Обсъждане

Основна цел на това проучване е апробиране на *in vitro* метода на тъканни срезове от черен дроб на плъх по техниката "precision-cut" като модел за проучване на лекарствения метаболизъм и токсичността, както и приложението на метода за оценка на метаболитния профил на различни лекарствени вещества. В хода на експериментите са оценявани жизнеността на чернодробните срезове и метаболитният профил на 7-етоксикумарин за период на инкубация до 24 часа.

Жизнеността на чернодробните срезове е оценявана чрез количеството на освободената LDH, измерена като процент от тоталното ° съдържание в тъканните срезове. Освобождаването на ензима в инкубационната среда се приема за маркер на паренхимно тъканно увреждане, независимо че връзката между LDH освобождаването и жизнеността на клетките не е напълно изяснена [2, 6, 7, 12]. Тъй като в литературата няма данни за точно установени стойности между освобождаването на ензима и жизнеността на тъканните срезове, е необходимо подбирането на такива условия на експеримента (инкубационна среда, температура, преинкубация, брой срезове в средата и др.), при които се наблюдава най-ниска степен на освобождаване на ензима.

Съставът на инкубационната среда може да окаже влияние върху качеството на препаратите и да даде отражение върху резултатите при метаболитните изследвания. В литературата е описано използването на различни инкубационни среди: RPMI 1640, Waymouth's, William's medium E, буфер на Krebs-Henseleit [15]. Важно условие при избора на средата е компонентите, които тя съдържа, да не интерферират с резултатите, да не усложняват идентифицирането на метаболитите и да не редуцират токсикологичния риск. Средата RPMI 1640 е подходяща за оценка на метаболитните процеси в отсъствие на други добавки, поради което тя бе избрана за най-подходяща за провеждане на експериментите [3, 5, 6, 16].

Проведена бе инкубация на срезове от черен дроб на плъх за определяне на времезависимото O-деетилиране на 7-етоксикумарин. 7-етоксикумаринът е избран като моделен субстрат по няколко причини. Основният продукт от I фаза на биотрансформацията е 7-хидроксикумарин, който се образува под действието на цитохром P-450-медирано окислително деалкилиране. В последствие той се конюгира с глюкуронова киселина и сулфати, което позволява последователната оценка както на окислителните, така и на конюгиращите реакции [1, 11]. 7-хидроксикумаринът се определя лесно чрез спектрофлуориметричен метод, което позволява бързата оценка на голям брой проби. Друг важен фактор при оценяването на метаболизма е, че метаболитите на 7-хидроксикумарина се освобождават лесно от чернодробните срезове в инкубационната среда [2].

Резултатите от проведените експерименти показват, че чернодробните срезове метаболлизират времезависимо 7-етоксикумарина при ин-

кубация до 24 часа. Установено е образуването на незначително количество неконюгиран 7-хидроксикумарин за сметка на неговите глюкуронидни и сулфатни конюгати. Тези резултати съответстват с публикуваните в литературата данни [13]. Връзката между фаза I и фаза II на биотрансформацията се доказва от ниските количества на неконюгиран 7-хидроксикумарин за сметка на неговите глюкуронидни и сулфатни конюгати. Във фаза II реакциите се наблюдава тенденция за преимущество на образуването на глюкуронидни конюгати за сметка на сулфатни, което потвърждава вече публикуваните литературни данни за метаболизма на 7-хидроксикумарина в микросоми [16]. Измерените ниски стойности на свободния 7-хидроксикумарин в резултат на активността на O-деетилиращата ензимна активност потвърждават факта, че реакциите във фаза I са определящ фактор за метаболизма на алкоксикумарина, а конюгиращите реакции във фаза II имат по-висок капацитет от окислителните реакции във фаза I на биотрансформацията.

Резултатите от изследването показват, че чернодробните срезове са подходящ *in vitro* модел за проучване на лекарствения метаболизъм. Те позволяват извършването на комплексна оценка на метаболитните реакции във фаза I и II на биотрансформацията. Биха могли да бъдат приложими при изследването на влиянието на редица физиологични фактори или на факторите на средата, като: възраст, пол, циркадни ритми, хранителен режим, болестно състояние, ензимна индукция или/и инхибиция, върху метаболизма на ендогенни или екзогенни вещества.

Библиография

1. Ball, S. E. et al. [14C]-Ethoxycoumarin metabolism by precision-cut rat hepatic slices. – *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 1996, 383-389.
2. Barr, J. et al. Liver slices in dynamic organ culture. I: an alternative *in vitro* technique for the study of rat hepatic drug metabolism. – *Xenobiotica*, **21**, 1991, 331-339.
3. Berthou, F. et al. Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. – *Xenobiotica*, **19**, 1989, 401-417.
4. Carlile, D. J., N. Hakooz et J. B. Houston. Kinetics of drug metabolism in rat liver slices: IV. Comparison of ethoxycoumarin clearance by liver slices, isolated hepatocytes, and hepatic microsomes from rats pretreated with known modifiers of cytochrome P-450 activity. – *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1999, 526-532.
5. Dogetrom, P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. – *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 1993, 699-704.
6. Ekins, S. Past, present and future applications of precision-cut liver slices for *in vitro* xenobiotic metabolism. – *Drug Metab. Rev.*, **28**, 1996, 591-623.

7. Fisher, R. L. et al. Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices: Optimization of tissue culture, part 1. – *Toxicol. Methods.*, **5**, 1995, 99-113.
8. Greenlee, W. F. et al. Poland. An improved assay for 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by Phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. – *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **205**, 1978, 569-605.
9. Hashemi, E. et al. Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures. – *Xenobiotica*, **29**, 1999, 11-25.
10. Lowry. Protein measurement with the Folin phenol reagent. – *J. Biol. Chem.*, **193**, 1951, 265.
11. Matsubara, T. et al. Biotransformation of coumarin derivatives (2) oxidative metabolism of 7-alkoxycoumarin by microsomal enzymes and a simple assay procedure for 7-alkoxycoumarin O-dealkylase. – *Jpn. J. Pharmacol.*, **33**, 1983, 41-56.
12. Olinga, P. et al. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. – *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, **38**, 1997, 59-69.
13. Steensma, A. et al. Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, cynomolgus, monkey and human precision-cut liver slices. – *Xenobiotica*, **24**, 1994, 893-907.
14. Toutain, H. J. et al. Morphological and functional integrity of precision-cut rat liver slices in rotating organ culture and multiwell plate culture: effects of oxygen tension. – *Cell Biol. Toxicol.*, **14**, 1998, 175-190.
15. Thohan, S. et al. Chung. – In: *Cytotoxicity Profiles for a series of Investigational Compounds Using Liver Slice Technology and Human Derived Cell Cultures*. Totowa, N. J., Humana Press Inc. 1999, 35-52.
16. Worboys, P. D, A. Bradbury et J. B. Houston. Kinetics of drug metabolism in rat liver slices: relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. – *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1997, 460-467.
17. Walsh, J. S. et al. An improved HPLC assay for the assessment of liver slice metabolic viability using 7-ethoxycoumarin. – *Drug Metab. Dispos.*, **20**, 1995, 869-874.

Постъпила – 06.06.2007 г.

✉ **Адрес за кореспонденция:**

Вирджиния Цанкова
Катедра по фармакология и токсикология
Фармацевтичен факултет
Медицински университет
ул. „Дунав“ № 2
1000 София

☎ +35929236524

e-mail: virginia_tzankova@yahoo.com

✉ **Address for correspondence:**

Virginia Tzankova
Department of Pharmacology and Toxicology
Faculty of Pharmacy
Medical University
2 Dunav Str.
1000 Sofia

☎ +35929236524

e-mail: virginia_tzankova@yahoo.com
