

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

PRZEMIANY METABOLICZNE *IN VITRO*
PRZECIWNOWOTWOROWEJ POCHODNEJ
IMIDAZOAKRYDONU, C-1311, I JEJ WPŁYW NA AKTYWNOŚĆ
WYBRANYCH IZOENZYMÓW CYTOCHROMU P450

Mgr inż. Agnieszka Potęga

Promotor: **Dr hab. inż. Zofia Mazerska**

Gdańsk 2010

... mojej Mamie oraz pamięci mojego Taty...

Pragnę serdecznie podziękować:

Pani Doktor Zofii Mazerskiej, za życzliwość, przekazaną wiedzę oraz czas i nieocenioną pomoc podczas prowadzenia eksperymentów i redagowania niniejszej pracy.

Basi Fedejko-Kap, za wiele dyskusji w trakcie realizacji doświadczeń, Asi Polewskiej i Monice Pawłowskiej, za nieustanne wsparcie duchowe – dziękuję, że zawsze mogłam na Was liczyć.

Pani Doktor Ewie Augustin, Ani Skwarskiej, Dorocie Nowak-Ziatyki, Magdalenie Niemira oraz pozostałym osobom z zespołu, za wspólnie spędzony czas, serdeczność i miłą atmosferę pracy.

Moim Kochanym Najbliższym, za miłość, zrozumienie i podtrzymywanie wiary w osiągnięcie zamierzonego celu. Cieszę się, że Was mam...

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

ABT	<i>1-aminobenzotriazole</i> , 1-aminobenzotriazol
C-1311	5-dietyloaminoetyloamino-8-hydroksymidazoakrydon (Symadex TM)
C-1330	5-dietyloaminoetyloamino-8-metoksymidazoakrydon
CPR	<i>cytochrome P450 reductase</i> , NADPH-reduktaza cytochromu P450 (NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450)
CYPH lub L	izoenzym cytochromu P450 z podwyższoną lub obniżoną aktywnością CPR
DDIs	<i>drug-drug interactions</i> , oddziaływania pomiędzy lekami
EC₅₀	<i>half maximal effective concentration</i> , stężenie związku hamujące proliferację komórek w 50%
FADH₂ / FAD	<i>flavin adenine dinucleotide</i> , dinukleotyd flawinoadeninowy (forma zredukowana / forma utleniona)
FMN	<i>flavin mononucleotide</i> , mononukleotyd flawinowy
FMO	<i>flavin monooxygenase</i> , monooksygenaza flawinowa
GUS	<i>β-D-glucuronide glucuronosohydrolase</i> , <i>β-glucuronidase</i> , β-glukuronidaza
HepG2	<i>human hepatocellular carcinoma cell line</i> , linia komórkowa ludzkiego nowotworu (wątrobiaka) wątroby
Hep3A4	linia komórkowa ludzkiego nowotworu (wątrobiaka) wątroby z nadekspresją genu izoenzymu CYP3A4
HRN	<i>hepatic reductase null</i> , oznaczenie myszy lub frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z komórek wątroby myszy z nokautem genu kodującego NADPH-zależną reduktazę cytochromu P450
ESI-MS	<i>electrospray ionization-mass spectrometry</i> , spektrometria masowa z jonizacją elektrorozpraszającą
M	masa cząsteczki / atomu
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry</i> , spektrometria masowa z jonizacją przez desorpcję laserową w matrycy
MBI	<i>mechanism-based inhibition</i> , inhibicja nieodwracalna oparta na mechanizmie działania enzymu
MIC	<i>metabolic intermediate complex</i> , kompleks reaktywnego metabolitu pośredniego z jonem żelaza grupy prostetycznej cytochromu P450
MS	<i>mass spectrum</i> , widmo masowe
MTZ	<i>methimazole</i> , metimazol
NADPH / NADP⁺	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (forma zredukowana / forma utleniona)
P	oznaczenie produktu C-1311
P*	oznaczenie produktu C-1330
P450	cytochrom P450
POR	<i>P450 oxidoreductase</i> , NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450

LC/QTOF-MS	<i>liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> , chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem masowym z kwadropolowym analizatorem czasu przelotu
RP-HPLC-DAD	<i>reversed-phase-high performance liquid chromatography-photodiode array detector</i> , wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych z udziałem detektora wielodiodowego
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu
UDPGA	<i>uridine diphosphate glucuronic acid</i> , kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy
UGT	<i>UDP-glucuronosyltransferase</i> , UDP-glukuronylotransferaza, transferaza glukuronianowa
WT	<i>wild type</i> , oznaczenie myszy lub frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z komórek wątroby myszy typu dzikiego
XO	<i>xanthine oxidase</i> , oksydaza ksantynowa

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE	1
I.1. Nowoczesne strategie leczenia chorób nowotworowych	2
I.2. Nowa generacja przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny	4
I.3. Pochodne imidazoakrydonu jako potencjalne leki przeciwnowotworowe	6
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	9
III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	12
III.1. Ogólna charakterystyka cytochromów P450	12
III.1.1. Właściwości i budowa cytochromów P450	12
III.1.2. Funkcje fizjologiczne i mechanizm działania izoenzymów cytochromu P450	14
III.2. Hamowanie aktywności izoenzymów cytochromu P450	17
III.2.1. Mechanizmy inhibicji aktywności cytochromów P450	17
III.2.1.1. Inhibicja odwracalna	18
III.2.1.2. Inhibicja quasi-nieodwracalna i nieodwracalna	20
III.2.2. Inhibicja „mechanism-based” (MBI) izoenzymów cytochromu P450	23
III.2.2.1. Podział i charakterystyczne cechy inhibicji „mechanism-based”	24
III.2.2.2. Metody wykrywania inhibicji „mechanism-based”	26
III.2.2.2.1. Określenie charakteru inhibicji	26
III.2.2.2.2. Badania wpływu stężenia inhibitora oraz czasu inkubacji enzymu z inhibitorem	27
III.2.2.2.3. Określenie wpływu obecności NADPH	27
III.2.2.2.4. Przebieg inhibicji w obecności standardowego substratu enzymu lub inhibitora odwracalnego kompetycyjnego	27
III.2.2.2.5. Przebieg inhibicji w obecności tzw. „wychwytywaczy” wolnych rodników tlenowych i „pułapek” nukleofilowych	28
III.2.2.2.6. Metoda oparta na stechiometrii wiązania inhibitora z enzymem	28
III.2.2.2.7. Badanie zmian w widmie UV-vis cytochromu P450	29
III.2.3. Inhibitory „mechanism-based” cytochromów P450	31
III.2.3.1. Uwarunkowania strukturalne inhibitorów „mechanism-based”	31
III.2.3.2. Przykłady leków przeciwnowotworowych indukujących inhibicję „mechanism-based” cytochromów P450	36
III.2.4. Kliniczne znaczenie inhibicji „mechanism-based” cytochromów P450	39
IV. OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ	41
IV.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec różnych enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby	43
IV.1.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów monooksygenazy flawinowej, FMO	44
IV.1.1.1. Ogólne informacje o monooksygenazach flawinowych	44
IV.1.1.2. Opracowanie warunków reakcji związku C-1311 z FMO	45

IV.1.1.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 wobec FMO	46
IV.1.1.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 wobec FMO	47
IV.1.1.5. Identyfikacja produktu reakcji C-1311 i C-1330 z FMO	49
IV.1.1.6. Udział FMO w metabolizmie C-1311 zachodzącym we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby	53
IV.1.2. Transformacje metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec enzymów z rodziny transferazy glukuronianowej, UGT	55
IV.1.2.1. Ogólne informacje o transferazach glukuronianowych	55
IV.1.2.2. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby i UDPGA jako kosubstratu zawartych w niej enzymów UGT.	56
IV.1.2.3. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT	58
IV.1.2.3.1. Wyniki badań metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec UGT1A1	58
IV.1.2.3.2. Wyniki badań metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec UGT2B7	59
IV.1.2.4. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura oraz NADPH i UDPGA jako kofaktorów FMO i UGT	60
IV.1.2.5. Identyfikacja produktów reakcji C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura, NADPH i UDPGA	61
IV.1.3. Metabolizm C-1311 wobec oksydazy ksantynowej, XO	63
IV.1.4. Badania roli NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450, CPR, w metabolizmie C-1311 i C-1330	65
IV.1.4.1. Ogólne informacje o CPR	65
IV.1.4.2. Model myszy HRN	66
IV.1.4.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN	67
IV.1.4.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN	69
IV.1.4.5. Identyfikacja produktów reakcji C-1311 i C-1330 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN	71
IV.1.4.6. Wyniki badań farmakokinetycznych związku C-1311 u myszy WT i HRN	76
IV.1.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.1	78
IV.2. Badania wpływu C-1311 i C-1330 na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450	78
IV.2.1. Metabolizm 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2	79
IV.2.1.1. Opracowanie warunków reakcji 7-etoksykumaryny z CYP1A2	80
IV.2.1.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP1A2	81
IV.2.1.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP1A2	82
IV.2.2. Metabolizm testosteronu wobec CYP3A4	83
IV.2.2.1. Opracowanie warunków reakcji testosteronu z CYP3A4	84
IV.2.2.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP3A4	85
IV.2.2.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP3A4	86

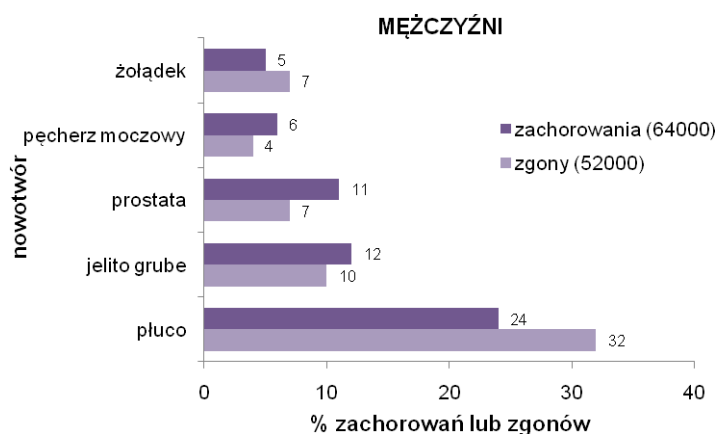
IV.2.3. Metabolizm imipraminy wobec CYP2C19 i CYP2D6.....	88
IV.2.3.1. Opracowanie warunków reakcji imipraminy z CYP2C19	89
IV.2.3.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP2C19	90
IV.2.3.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP2C19	90
IV.2.3.4. Opracowanie warunków reakcji imipraminy z CYP2D6	91
IV.2.3.5. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP2D6	92
IV.2.3.6. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP2D6	92
IV.2.4. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.2.....	93
IV.3. Badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez związek C-1311	93
IV.3.1. Określenie charakteru inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.....	93
IV.3.2. Badania wpływu stężenia inhibitora, czasu inkubacji enzymu z inhibitorem oraz obecności kofaktora NADPH	95
IV.3.3. Określenie swoistych parametrów inhibicji MBI.....	98
IV.3.3.1. Wyznaczenie współczynnika podziału i liczby przemiany dla inaktywacji CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311	98
IV.3.3.2. Wpływ obecności standardowych substratów enzymów na stopień inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311	99
IV.3.3.3. Określenie wpływu glutationu na stopień zahamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311	100
IV.3.3.4. Określenie wpływu katalazy na stopień zahamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311	101
IV.3.3.5. Efekt żelazicyjanku potasu na hamowanie aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311	102
IV.3.4. Przewidywanie miejsc metabolizmu C-1311 wobec CYP1A2 i CYP3A4 (program MetaSite)	104
IV.3.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.3.....	104
IV.4. C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4	104
IV.4.1. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 w komórkach nowotworowych HepG2 i Hep3A4	105
IV.4.1.1. Oznaczanie cytotoksyczności C-1311 w komórkach HepG2 i Hep3A4.....	105
IV.4.1.2. Opracowanie warunków biotransformacji w komórkach nowotworowych	106
IV.4.1.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 w HepG2 i Hep3A4	106
IV.4.1.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 w HepG2 i Hep3A4	107
IV.4.1.5. Identyfikacja produktów metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec HepG2 i Hep3A4.....	108
IV.4.2. Wpływ imidazoakrydonu C-1311 na poziom izoenzymu CYP3A4 w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2	109
IV.4.3. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.4.....	110
V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	111
V.1. Materiały.....	111
V.1.1. Badane związki przeciwnowotworowe.....	111
V.1.2. Związki chemiczne i zestawy	111
V.1.3. Składniki roztworów	111

V.1.4. Odczynniki chemiczne do przygotowania faz ruchomych do analizy RP-HPLC	112
V.1.5. Enzymy	112
V.1.6. Przeciwciała	113
V.1.7. Linie komórkowe oraz materiały stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej.....	112
V.1.8. Zwierzęta doświadczalne.....	113
V.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	113
V.3. Warunki analizy chromatograficznej	114
V.4. Metody i techniki doświadczalne.....	115
V.4.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec różnych enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby	115
V.4.1.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów	115
V.4.1.2. Roztwory buforowe.....	116
V.4.1.3. Skład mieszanin reakcyjnych	116
V.4.1.4. Przebieg doświadczeń	117
V.4.1.4.1. <i>Metabolizm wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, rekombinantowych ludzkich izoenzymów CYP i FMO oraz XO.....</i>	117
V.4.1.4.2. <i>Wykazanie udziału FMO w metabolizmie C-1311 wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.....</i>	117
V.4.1.4.3. <i>Metabolizm wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby oraz rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT.....</i>	117
V.4.1.4.4. <i>Badania farmakokinetyczne związku C-1311 u myszy WT i HRN.....</i>	118
V.4.2. Badania wpływu C-1311 i C-1330 na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450 .	118
V.4.2.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów	118
V.4.2.2. Skład mieszanin reakcyjnych	119
V.4.2.3. Przebieg doświadczeń	119
V.4.3. Badania mechanizmu hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez związek C-1311	119
V.4.3.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów	119
V.4.3.2. Przebieg doświadczeń i skład mieszanin reakcyjnych.....	120
V.4.4. C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4	122
V.4.4.1. Hodowla komórek nowotworowych.....	122
V.4.4.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej C-1311 wobec komórek HepG2 i Hep3A4 w oparciu o test MTT	122
V.4.4.3. Izolacja metabolitów z komórek HepG2 i Hep3A4 traktowanych C-1311 i C-1330.....	123
V.4.4.4. Immunodetekcja białka CYP3A4 metodą Western blotting	124
V.4.4.4.1. <i>Przygotowanie odczynników i roztworów</i>	124
V.4.4.4.2. <i>Izolacja frakcji mikrosomalnej z komórek HepG2.....</i>	124
V.4.4.4.3. <i>Elektroforeza SDS-PAGE.....</i>	125
V.4.4.4.4. <i>Immunobarwienie (immunoblotting)</i>	125
VI. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI.....	127
VII. STRESZCZENIE	143
VIII. LITERATURA	148

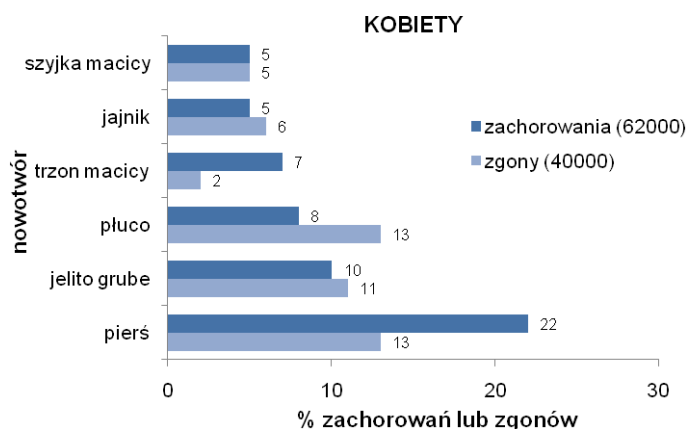
I. WPROWADZENIE.

W XXI wieku choroby nowotworowe nadal stanowią poważne zagrożenie i jedno z największych wyzwań dla ludzkości. Statystyki wskazują, że są one, po chorobach układu krążenia, najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, głównie w krajach uprzemysłowionych¹. Liczba zachorowań stale rośnie. Jest to spowodowane głównie zmianami cywilizacyjnymi środowiska oraz wydłużeniem się średniego wieku życia ludzi. Obecnie wśród populacji ludzkiej każdego roku nowotwór złośliwy rozpoznany zostaje u około 11 milionów osób a niemal 7 milionów rocznie umiera w wyniku tego schorzenia. Ponadto, około 25 milionów ludzi żyje ze świadomością rozwijającej się choroby nowotworowej. Do 2020 roku można się spodziewać rocznie 16 milionów nowych przypadków zachorowań na nowotwory złośliwe i 10 milionów zgonów z tego powodu².

A.



B.



Rys.1. Struktura zachorowań i zgonów na najczęściej występujące nowotwory złośliwe w Polsce wśród (A) mężczyzn i (B) kobiet (dane z 2006 roku, źródło: Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie).

¹ Wg Cancer National Institute, Bethesda, USA (www.nci.nih.gov/statistics).

² Dane za stroną internetową: www.kodekswalkizrakiem.pl (Światowa Deklaracja Walki z Rakiem 2006).

Według danych przekazanych przez Międzynarodową Unię Walki z Rakiem wzrastająca liczba zachorowań na nowotwory złośliwe jest problemem całej Europy. Co więcej, w Polsce dynamika tego wzrostu należy wciąż niestety do najwyższych w Europie. Statystyki są alarmujące. Notuje się, że w naszym kraju na nowotwory złośliwe każdego roku umiera ponad 50000 mężczyzn i niemal 40000 kobiet. Najpowszechniej występującymi nowotworami złośliwymi u mężczyzn są: rak płuca, rak jelita grubego i rak gruczołu krokowego, zaś u kobiet – rak piersi, rak jelita grubego oraz rak płuca (Rys.1).

Leczenie chorób nowotworowych to w dalszym ciągu jeden z najtrudniejszych i niestety ciągle jeszcze nie rozwiązanych problemów współczesnej medycyny. Mimo przeznaczania coraz większych środków na badania, wiedza o przyczynach powstawania tej choroby jest wciąż niewystarczająca, by prowadzić skuteczną profilaktykę i terapię. Przeszkodę w leczeniu chorób nowotworowych tworzą również indywidualne odmienności każdego ludzkiego organizmu, zarówno fizjologiczne jak i psychiczne, co sprawia, że choroba nabiera cech indywidualnych i u każdego chorego jej przebieg jest inny.

I.1. Nowoczesne strategie leczenia chorób nowotworowych.

Dzięki postępom w naukach podstawowych oraz postępom w badaniach klinicznych opracowywane są coraz skuteczniejsze strategie leczenia nowotworów. Odkrycia mechanizmów molekularnych powstawania i rozwoju nowotworów pozwalają powoli na efektywne działania profilaktyczne, diagnostyczne i lecznicze. Niepokojący wzrost zachorowalności na nowotwory, szczególnie w krajach wysokorozwiniętych, jest dodatkowym bodźcem dla poszukiwań nowych sposobów zwalczania chorób nowotworowych, przede wszystkim w obszarze chemoterapii.

Chemoterapia, czyli zastosowanie środków chemicznych do zniszczenia czynników chorobotwórczych, w tym komórek nowotworowych, pojawiła się już w czasach starożytnej Grecji, jednakże zastosowanie jej w leczeniu nowotworów było możliwe dopiero w latach 40-tych XX wieku. Początkowo stosowana była chemoterapia monolekowa, którą stopniowo zastąpiono chemoterapią wielolekową, a więc kombinacją kilku środków leczniczych o działaniu cytostatycznym. Obecnie leczenie farmakologiczne chorób nowotworowych zyskuje na coraz większym znaczeniu, stawiając w perspektywie bliskiej przyszłości chemoterapeutyki przeciwnowotworowe na pozycji głównej metody w leczeniu tych schorzeń [Dobrek i wsp., 2008].

Idealnym sposobem leczenia nowotworów byłby lek wybiórczo niszczący wyłącznie komórki nowotworowe, nie naruszający jednocześnie równowagi biologicznej chorego pacjenta. Ze względu jednak na brak istotnych różnic jakościowych w biochemii komórek zmienionych i niezmienionych nowotworowo procesy chemoterapii zawsze stwarzają

zagrożenie poważnymi konsekwencjami objawów ubocznych, co utrudnia opracowanie skutecznych leków przeciwnowotworowych. Z kolei większość stosowanych powszechnie leków przeciwnowotworowych działa nieselektywnie, a zjawisko oporności komórek nowotworowych na chemoterapię pojawia się coraz częściej. Biorąc pod uwagę powyższe zastrzeżenia, wydaje się, iż medycyna stoi obecnie przed licznymi wyzwaniami związanymi z poszukiwaniem postępu w chemoterapii nowotworowej. W związku z tym kluczowe znaczenie w walce z chorobami nowotworowymi mają badania nad poszukiwaniem nowych związków o silnej aktywności przeciwnowotworowej i jednocześnie niskiej toksyczności ogólnej, jak również poznawanie ich mechanizmów działania. Wraz z postępującą wiedzą w zakresie patofizjologii nowotworów nowe zainteresowania koncentrują się wokół wielu możliwości, do których zaliczamy, m.in. [Jędrzejczak, 2003; Dobrek i wsp., 2008]:

- 1) Poszukiwanie nowych związków chemicznych pochodzenia naturalnego lub syntetycznego o działaniu przeciwnowotworowym.
- 2) Poszukiwanie działania przeciwnowotworowego wśród leków obecnie stosowanych z innych wskazań niż stany nowotworowe.
- 3) Poszukiwanie związków przeciwnowotworowych działających w oparciu o selektywne mechanizmy patofizjologiczne obserwowane w transformowanych kancerogennie komórkach.
- 4) Poszukiwanie ulepszonych form farmaceutycznych (postaci leków, zwłaszcza doustnych o łatwym schemacie dawkowania) i nowych analogów obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych.
- 5) Wykorzystanie układu odpornościowego do generowania odpowiedzi immunologicznej przeciw zmianom nowotworowym.

Wyraźne różnice w skuteczności leczenia u różnych chorych z tym samym rozpoznaniem stanowiły z kolei dowód na to, że leczenie onkologiczne nie może być uniwersalne. Podjęto więc próby zidentyfikowania tzw. biomarkerów pozwalających na zindywidualizowanie terapii. Dzięki zdobyciom biologii molekularnej określono receptory błonowe, szlaki sygnałowe i czynniki transkrypcyjne, których patologiczna aktywność warunkuje złośliwy fenotyp komórki nowotworowej. Wiele spośród tych białek zostało uznanych za potencjalny cel molekularny nowych terapii i przy zastosowaniu metod krystalograficznych zaprojektowano liczne cząsteczki bezpośrednio i swoiście wpływające na ich aktywność. Stanowiło to podstawę do opracowania tzw. terapii celowanych (ang. *targeted therapies*).

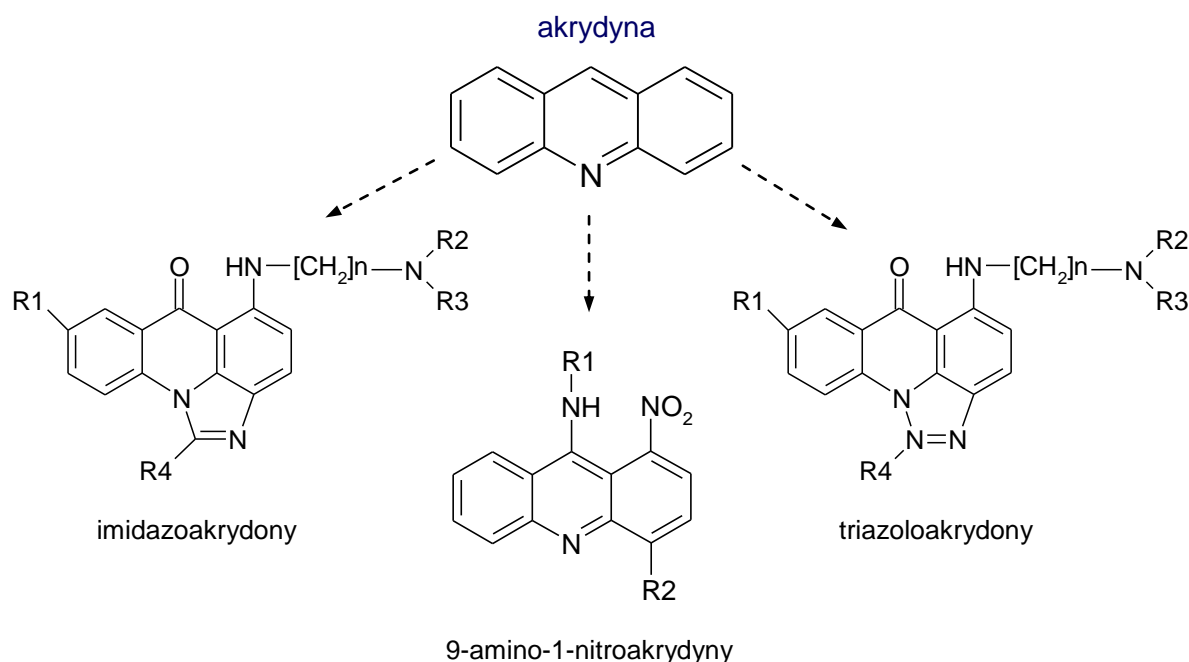
Gwałtowny postęp w zakresie, m.in. genomiki, proteomiki czy immunologii, coraz łatwiejsze określanie profilu molekularnego guza nowotworowego oraz dostępność terapii celowanych pozwalają mieć nadzieję, że współczesna onkologia pozwoli traktować większość nowotworów jako chorobę przewlekłą, a dodatkowo ukierunkowanie terapii na danego pacjenta będzie efektywnym i dobrze tolerowanym postępowaniem, pozwalającym

zachować chorym jakość życia porównywalną z tą, jaką mieli przed rozpoznaniem choroby nowotworowej.

I.2. Nowa generacja przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny.

Badania nad poszukiwaniem nowych związków o silnej aktywności przeciwnowotworowej i jednocześnie niskiej toksyczności ogólnej, jak również poznawanie ich mechanizmów działania są realizowane w licznych pracowniach na całym świecie. Jest to proces niezmiernie długi i złożony, i tylko niewielka liczba zsyntetyzowanych związków kwalifikuje się do dalszych badań.

W kierowanej przez Profesora Jerzego Konopę grupie badawczej w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej od wielu już lat prowadzone są badania nad poszukiwaniem potencjalnych środków przeciwnowotworowych w grupie pochodnych akrydyny. Prace nad otrzymywaniem i badaniem biologicznie czynnych akrydyn są kontynuacją wcześniejszych badań, zapoczątkowanych w latach pięćdziesiątych przez nieżyjących już Profesorów Zygmunta i Andrzeja Ledóchowskich.



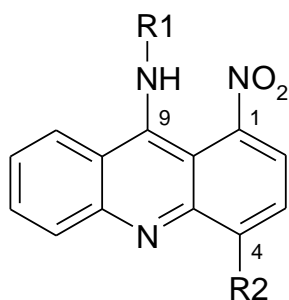
Rys.2. Ogólne struktury chemiczne akrydyny i jej pochodnych.

W ostatnich latach zsyntetyzowano i zbadano szereg związków, spośród których na największą uwagę zasługują trzy ich grupy, a mianowicie: pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, imidzoakrydonu i triazoloakrydonu (Rys.2). Grupy tych związków wykazują

wyjątkowo wysoką aktywność cytotoksyczną *in vitro* i przeciwnowotworową *in vivo* [Konopa i wsp., 1969; Hrabowska i wsp., 1982; Chołody i wsp., 1990].

W grupie pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wyselekcjonowany został Ledakrin (Nitracrine^R, C-283), jedyny jak dotąd polski oryginalny lek przeciwnowotworowy (zarejestrowany w 1974 roku) [Radzikowski, 1976]. Uciążliwe, chociaż nieostre efekty toksyczne tego leku wykluczyły go jednak po kilku latach z listy dopuszczalnych preparatów leczniczych. Pochodna 1-nitroakrydyny o symbolu C-857 (Capridine α), z grupą hydroksyetylową w pozycji 9 pierścienia akrydyny, wykazująca korzystniejsze od Ledakrinu właściwości farmakologiczne [Gniazdowski i Szmigiero, 1995], została skierowana do pierwszej fazy badań klinicznych w końcu lat 80-tych. Z różnych powodów nie zostały one jednak zrealizowane. Dalsze poszukiwania pochodnych 1-nitroakrydyny o obniżonej toksyczności ogólnej doprowadziły do wyłonienia nowej generacji związków z dodatkowym podstawnikiem – grupą metylową – w pozycji 4 pierścienia akrydyny. W badaniach *in vivo* jedna z tych pochodnych, związek C-1748, posiada, m.in. silną zdolność hamowania rozwoju raka prostaty u szczurów oraz ksenoprzeszczepów ludzkich raków prostaty na nagich myszach [Tadi i wsp., 2005]. Stosunkowo szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej wobec ciągle trudnych w terapii nowotworów litych, niższa aktywność mielosupresyjna w porównaniu z innymi stosowanymi chemoterapeutykami przeciwnowotworowymi, słabsze działanie mutagenne a przede wszystkim obniżona toksyczność na zwierzętach [Narayanan i wsp., 2005; Ashok i wsp., 2006] pozwoliły wyselekcjonować ten związek, jako Capridine β , do pierwszej fazy badań klinicznych.

A.

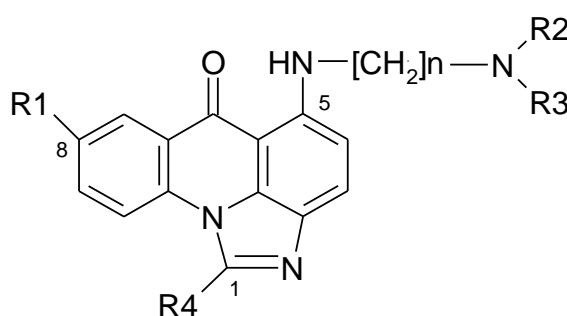


R1 = $(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ – Ledakrin (Nitracrine^R, C-283)

R1 = $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ – C-857 (Capridine α)

R1 = $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, R2 = CH_3 – C-1748 (Capridine β)

B.



R1 = H, OH, OCH_3 , t-butyl

R2, R3, R4 = H, CH_3 , C_2H_5

n = 2,3

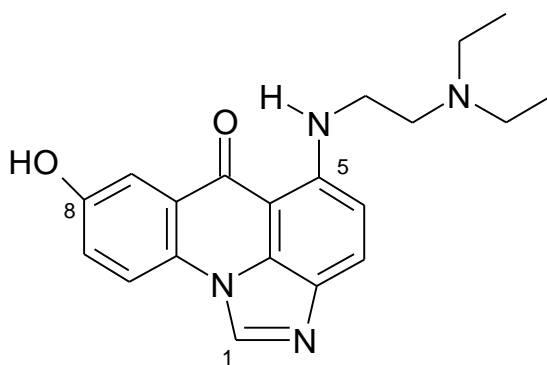
Rys.3. Ogólne struktury chemiczne pochodnych (A) 9-amino-1-nitroakrydyny i (B) imidazoakrydonu.

I.3. Pochodne imidazoakrydonu jako potencjalne leki przeciwnowotworowe.

Grupę wysoce aktywnych związków przeciwnowotworowych reprezentują również imidazoakrydony, w których układ akrydonu został rozbudowany poprzez wprowadzenie dodatkowego pięciocłonowego pierścienia heterocyklicznego zawierającego w swojej strukturze atom azotu. Przyjmuje się, że odgrywa on rolę podstawnika w pozycji *para* w stosunku do grupy aminowej łańcucha bocznego i tym samym poprawia zdolności interkalacyjne związku. Ponadto, zwiększa gęstość elektronów π w układzie heterocyklicznym, co najprawdopodobniej czyni chromofor bardziej opornym na redukcję enzymatyczną do wolnych rodników tlenowych [Showalter i wsp., 1984; Konopa, 2001]. Obecność reszty diaminoalkilowej w pozycji 5 cząsteczki akrydonu jest natomiast kluczowa dla cytotoksycznego i przeciwnowotworowego działania tych pochodnych [Chołody i wsp., 1992; Mazerska i wsp., 1996].

Badania zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną imidazoakrydonów wskazały, że najwyższą aktywnością cytotoksyczną i przeciwnowotworową charakteryzują się związki zawierające grupę hydroksylową w pozycji 8 rdzenia imidazoakrydonu. Obecność podstawnika metoksyłowego, jak również brak podstawnika w pozycji 8, znacznie obniżały aktywność biologiczną badanych pochodnych [Chołody i wsp., 1990, 1992, 1996].

Najbardziej aktywnym związkiem spośród analogów imidazoakrydonu okazała się pochodna oznaczona symbolem C-1311, 5-alkiloamino-8-hydroksyimidazoakrydon (Rys.4).



Rys.4. Struktura chemiczna 5-dietyloaminoetyloamino-8-hydroksyimidazoakrydonu o symbolu C-1311 (SymadexTM).

Szeroko prowadzone badania przedkliniczne pokazały, iż imidazoakrydon C-1311 wykazuje znaczące działanie cytotoksyczne wobec komórek szeregu linii nowotworowych takich jak: białaczka mysia L1210 [Augustin i wsp., 1996], ludzki rak szyjki macicy HeLa S3 [Lamb i Wheatley, 1996] czy mięsak kościopochodny US-OS [Zaffaroni i wsp., 2001]. Na szczególną uwagę zasługuje także zdolność C-1311 do hamowania proliferacji komórek nowotworów litych, m.in. komórek ludzkiego raka jelita grubego HT29 i HCT116 oraz

ludzkiego raka piersi MCF-7 [Burger i wsp., 1996]. Co więcej, C-1311 posiada też wysoką aktywność przeciwnowotworową, zarówno w stosunku do nowotworów przeszczepialnych u myszy, głównie białaczki P388 [Chołody i wsp., 1992], czerniaka B16, a szczególnie nowotworów litych jelita grubego Co38 i Co28 zazwyczaj opornych na stosowane dotychczas chemoterapeutyki [Kuśmierczyk i wsp., 1994], jak również w stosunku do ksenoprzeszczepów ludzkiego raka jelita grubego HT29 u myszy pozbawionych grasicy [Burger i wsp., 1996]. Te cenne właściwości biologiczne pochodnej imidazoakrydonu zdecydowały o wytypowaniu C-1311 do pierwszej fazy badań klinicznych w połowie czerwca 2004 roku. Ten pierwszy etap badań klinicznych został przeprowadzony na niewielkiej grupie pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi. Wyniki badań okazały się na tyle pomyślne, że w styczniu 2006 roku preparat skierowano do drugiej fazy badań klinicznych. Przebiegała ona z udziałem grupy kobiet z przerzutowym rakiem piersi i u pacjentów z rakiem jelita grubego (okrężnicy). Poza tym C-1311 ujawnił w modelu zwierzęcym zdolność do leczenia stwardnienia rozsianego (sclerosis multiplex, SM) oraz reumatoidalnego zapalenia stawów (rheumatoid arthritis, RA). Związek ten jest również badany pod kątem spektrum terapeutycznego wobec kilku innych ważnych chorób autoimmunologicznych³.

C-1311 jest związkiem interesującym z farmakologicznego punktu widzenia także ze względu na kilka innych właściwości biologicznych. Wykazuje, m.in. tylko ograniczoną zdolność do mutagenezy oraz nie indukuje tworzenia wolnych rodników tlenowych [Patterson, dane niepublikowane], które są odpowiedzialne za kardiotoxycywność wielu znanych leków przeciwnowotworowych, głównie z grupy antracyklin i mitoksantronu [Lown, 1993]. Wykazano również, że C-1311 łatwo przenika przez błony komórkowe na drodze dyfuzji biernej i jest szybko transportowany do jądra komórkowego, gdzie ulega akumulacji [Berger i wsp., 1996; Burger i wsp., 1996; Składanowski i wsp., 1996].

W badaniach mechanizmu działania C-1311 na poziomie komórkowym wykazano, że związek ten indukuje nieodwracalny blok w fazie G2 cyklu komórkowego, co ostatecznie prowadzi do programowanej śmierci komórek, czyli apoptozy [Augustin i Konopa, 1996]. Niski poziom indukcji apoptozy obserwowano w komórkach nowotworowych jajnika OAW42 [Zaffaroni i wsp., 2001]. W przypadku komórek nowotworu jelita grubego, HT29, zaproponowano dwa mechanizmy śmierci komórkowej. Jeden z nich przyjmuje, że efekt cytotoxycywny wywołany jest nie tylko uszkodzeniami DNA ale także uszkodzeniami lizosomów, co pociąga za sobą autolizę komórki [Burger i wsp., 1996]. Według drugiego mechanizmu, C-1311 indukuje przejściowy blok w fazie G2 cyklu komórkowego, po którym traktowane związkiem komórki przechodzą do mitozy i rozpoczynając kolejny cykl podziałowy umierają na drodze „katastrofy mitotycznej” [Hyży i wsp., 2005]. W przypadku

³ Dane za stroną internetową: www.xanthus.com.

komórek ludzkiej białaczki limfoblastycznej MOLT4 wykazano z kolei, iż „katastrofa mitotyczna” indukowana przez C-1311 kończy się śmiercią tych komórek w wyniku apoptozy [Skwarska i wsp., 2007]. Wszystkie wymienione właściwości badanej pochodnej imidazoakrydonu, C-1311, czynią ten związek bardzo atrakcyjnym z klinicznego punktu widzenia.

Wyniki uzyskane z dotychczasowych badań nad molekularnym mechanizmem działania pochodnych imidazoakrydonu wyłoniły hipotezę, iż metaboliczna aktywacja jest etapem niezbędnym dla ich aktywności wobec komórek nowotworowych. Przypuszczenie to nasunął fakt, że wyjątkowa zdolność do kowalencyjnego międzyłańcuchowego sieciowania DNA przez tę grupę związków była obserwowana wyłącznie w żywych komórkach. Ponadto, wykazano w warunkach *in vitro*, że przekształcenie związków z formy latentnej w aktywną jest konieczne dla bezpośredniego ich wiązania się do makromolekuł komórkowych, takich jak DNA czy topoizomeraza II [Mazerska i wsp., 2001; Składanowski i wsp., 1996].

Prezentowana praca doktorska stanowi kontynuację badań, prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, nad mechanizmem działania C-1311, a jej celem jest poznanie molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych tego związku oraz jego oddziaływań z enzymami metabolizującymi. Podejmowane zadania badawcze są zatem kluczowe dla poszerzenia wartości farmakologicznej potencjalnego leku przeciwnowotworowego.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.

Badania nad poznaniem molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych pochodnych imidazoakrydonu rozpoczęto od badań ich związku wzorcowego, 2-hydroksyakrydonu, w warunkach modelowych wobec enzymów utleniających – peroksydaz (w tym peroksydazy z korzenia chrzanu – HRP i ludzkiej mieloperoksydazy – MPO) [Mazerska, 2003]. Dysponując wiedzą na temat mechanizmu utleniania 2-hydroksyakrydonu przeprowadzono następnie analogiczne badania nad aktywacją enzymatyczną związku C-1311 [Mazerska i wsp., 2003]. Wyniki tych badań, jak również badania produktów reakcji elektro- i fotochemicznych [Mazerska i wsp., 1997, 2002] pozwoliły poznać możliwe kierunki przemian aktywacyjnych i miejsca reaktywne w cząsteczce badanej pochodnej imidazoakrydonu. Otrzymane produkty metabolizmu stały się związkami wzorcowymi w dalszych pracach, które skupiły się nad metabolizmem C-1311 zachodzącym wobec różnych enzymów frakcji mikrosomalnej pochodzącej z komórek wątroby szczura i człowieka, w szczególności cytochromów P450 [Wiśniewska i wsp., 2007]. Badania te miały na celu poznanie całościowych przemian, czyli aktywacji i detoksykacji, jakim związek C-1311, jako potencjalny chemoterapeutyk, będzie ulegał w organizmie pacjenta.

Cytochromy P450 uczestniczą przede wszystkim w pierwszej fazie przemian ksenobiotyków w organizmie. Szczególny i niezwykle ważny jest ich udział w metabolizmie wielu leków [Smith i wsp., 1997; Guengerich, 2006]. Po pierwsze, niektóre leki zostają przekształcone do ich formy farmakologicznie czynnej dopiero po transformacji przez te enzymy. Z drugiej strony, pod wpływem izoenzymów cytochromu P450 może nastąpić efekt wręcz przeciwny, dający zmniejszenie aktywności lub całkowitą dezaktywację związku biologicznie czynnego. Zdarza się także, iż powstające metabolity są toksyczne dla organizmu. Natomiast w terapii wielolekowej często dochodzi do interakcji pomiędzy dwoma lub więcej podawanymi farmaceutykami. Konsekwencją tego zjawiska może być zanik działania jednego z nich, gdy inny lek hamuje aktywność enzymu odpowiedzialnego za metabolizm drugiego [Wrighton i Stevens, 1992]. Z tych powodów niezmiernie ważne jest zbadanie podatności potencjalnego leku na przemiany wobec różnych enzymów metabolizujących, jak również poznanie jego wpływu na aktywność katalityczną enzymów, co z kolei pozwoliłoby na ustalenie ewentualnych oddziaływań lek (badany związek)-lek.

Wobec powyższego, dalsze badanie przemian metabolicznych zsyntetyzowanej w zespole Profesora Konopy przeciwnowotworowej pochodnej imidazoakrydonu, C-1311, jest szczególnie uzasadnione, zważywszy, że związek ten ma szansę zostać nowym lekiem przeciwnowotworowym.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zatem, z jednej strony, poznanie molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych odpowiedzialnych za działanie przeciwnowotworowe oraz toksyczność wybranej pochodnej imidazoakrydonu, z drugiej strony, określenie, które grupy enzymów metabolizujących pierwszej i drugiej fazy metabolizmu biorą udział w przemianach związku C-1311 w organizmie pacjenta.

Realizacja przedstawionego celu obejmowała następujące zadania badawcze:

- Określenie podatności związków C-1311 i C-1330 na transformacje metaboliczne wobec wybranych enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Poznanie szlaków przemian metabolicznych mogących mieć miejsce w organizmie różnych pacjentów jest niezbędne dla każdego leku a zwłaszcza leku przeciwnowotworowego. Wynika to ze zjawiska polimorfizmu genów enzymów metabolizujących, które powoduje, że metabolizm leków u każdego człowieka przebiega w sposób odmienny i specyficzny [Guengerich, 2006]. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania nad metabolizmem C-1311 zachodzącym wobec różnych enzymów mikrosomalnych obecnych w komórkach wątroby oraz badania struktur produktów tych reakcji enzymatycznych dążyły do poznania możliwych kierunków przemian aktywacyjnych i/lub detoksykacyjnych jakim związek ten, jako potencjalny lek, będzie ulegał w organizmie pacjenta.

Badania dla analogu strukturalnego C-1311 z grupą metoksyłową zamiast hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, związku C-1330, miały na celu ustalenie potencjalnych właściwości substratowych tej grupy związków wobec różnych enzymów metabolizujących, a określenie różnic w metabolizmie C-1311 i C-1330 wskazałoby na jedną z przyczyn ich różnej aktywności przeciwnowotworowej.

- Poznanie wpływu związku C-1311 na aktywność enzymów metabolizujących pierwszej fazy metabolizmu, głównie z rodziny cytochromów P450.

Określenie efektu działania potencjalnego leku na funkcjonowanie enzymów uczestniczących w procesach biotransformacji jest istotne ze względu na interakcje zachodzące pomiędzy różnymi lekami [Wrighton i Stevens, 1992]. Poznanie biochemicznych i molekularnych mechanizmów hamowania bądź indukcji aktywności białek P450 jest szczególnie ważne w terapii wielolekowej, gdyż na tej podstawie można przewidzieć czy i w jaki sposób zmieni się efekt leku podawanego razem z lekiem będącym inhibitorem lub

induktorem enzymu. Określenie tych mechanizmów dla potencjalnego leku przeciwnowotworowego, związku C-1311, było głównym zadaniem badawczym prezentowanej pracy doktorskiej.

➤ Obserwacje przemian metabolicznych związków C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby.

Realizacja tego etapu pracy doktorskiej miała na celu poznanie profilu przemian metabolicznych badanych pochodnych imidazoakrydonu w jednym z miejsc ich oczekiwanego działania terapeutycznego i jednocześnie porównanie go ze zbiorem metabolitów uzyskiwanych podczas przemian C-1311 i C-1330 w wielu różnych układach modelowych. Badania te zostały przeprowadzone na liniach komórkowych ludzkiego raka wątroby, HepG2 i Hep3A4. Ta ostatnia charakteryzuje się wyższym niż w innych komórkach nowotworowych poziomem ekspresji genu izoenzymu CYP3A4.

➤ Zbadanie czy związek C-1311 ma wpływ na poziom enzymów P450 w komórkach nowotworowych.

Wyniki takich badań mogłyby zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej w świetle opisywanych w literaturze różnic pomiędzy poziomem ekspresji genów enzymów metabolizujących w komórce zdrowej i nowotworowej oraz w świetle różnic ekspresji genów tych enzymów u poszczególnych pacjentów.

Jednym z zagadnień badawczych było więc sprawdzenie czy i jak C-1311 wpływa na funkcjonowanie izoenzymów cytochromu P450 w miejscu oczekiwanego działania związku w terapii, czyli w komórkach nowotworowych, głównie w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, stanowiących bogate źródło białek P450.

Podsumowując, wyniki badań podejmowanych w prezentowanej pracy doktorskiej poszerzą dotychczasową wiedzę o przemianach metabolicznych C-1311, który może wkrótce stać się lekiem przeciwnowotworowym. Dostarczą one, m.in. wskazówek jak przyszli pacjenci, wykazujący międzypersonne różnice w sposobie biotransformacji leków, zareagują na C-1311. Przyczynić się więc mogą do planowania nowoczesnej wielolekowej terapii przeciwnowotworowej z udziałem badanego związku, w tym dodatkowo terapii ukierunkowanej na poszczególnych pacjentów.

III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.

Poniższe opracowanie, poza podstawowymi informacjami o cytochromach P450, stanowi przegląd literatury na temat mechanizmów hamowania aktywności izoenzymów cytochromu P450, ze szczególnym uwzględnieniem inhibicji nieodwracalnej „mechanism-based”.

III.1. Ogólna charakterystyka cytochromów P450.

Pod nazwą cytochromy P450 (ang. *cytochrome P450* – CYP)⁴ (EC 1.14.14.1) kryje się liczna i wszechstronnie działająca nadrodzina podobnych do siebie enzymów wykazujących aktywność monooksygenaz (lub oksygenaz o funkcji mieszanej) [Degtyarenko i Archakov, 1993]. Termin ten pojawił się po raz pierwszy w literaturze naukowej w 1962 roku, jednakże o istnieniu „nieznanego barwnika wiążącego tlenek węgla” donoszono już znacznie wcześniej [Mueller i Miller, 1948]. Od tego czasu ponad 50-letnia już historia badań nad poznaniem właściwości i roli izoenzymów cytochromu P450 w funkcjonowaniu organizmów żywych stała się bardzo bogata i nieustannie się rozwija.

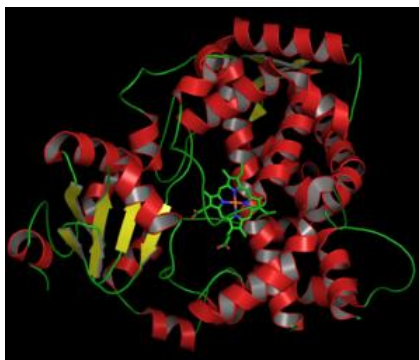
III.1.1. Właściwości i budowa cytochromów P450.

Cytochromy P450 zawdzięczają swoją nazwę zdolności pochłaniania światła przy długości fali około 450 nm, przy której kompleks *in vitro* ich zredukowanej formy z tlenkiem węgla (II) wykazuje wyraźne maksimum absorpcji. Szczegółowe badania spektroskopowe i chromatograficzne wykazały jednakże, iż występuje między nimi pewna heterogeniczność. Poszczególne formy cytochromów P450 różnią się bowiem maksimum absorpcji światła pomiędzy 446 a 452 nm [Omiecinski i wsp., 1999].

Enzymy te występują powszechnie we wszystkich organizmach eukariotycznych. Obecne są u drożdży, grzybów, roślin, zwierząt i ludzi. Spotykane są także w obrębie królestwa Prokariota. U ssaków cytochromy P450 skupione są głównie w siateczce śródplazmatycznej komórek wątroby, z której można wyizolować frakcję białek zwaną mikrosomami (cytochromy mikrosomalne) ale poszczególne izoenzymy rozmieszczone są niemal we wszystkich organach i tkankach, m.in. w jelitach (CYP2C, CYP2D6), w płucach (CYP2E1, CYP2F1) czy w mózgu (CYP4B1, CYP2E1). Nie stwierdzono ich obecności jedynie w dojrzałych erytrocytach i komórkach mięśni prążkowanych. U Eukariota białka P450 mogą

⁴ Od 1991 roku ludzkie cytochromy P450 oraz kodujące je geny oznaczane są odpowiednio symbolem CYP (białko) lub CYP (gen) [Nebert i Nelson, 1991].

być również związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną (cytochromy mitochondrialne). Większość bakteryjnych form P450 jest natomiast dobrze rozpuszczalna w wodzie [Okita i Masters, 1998; Williams i Lemke, 2002]. Badania genomu człowieka pozwoliły na stwierdzenie, że ludzkie izoenzymy cytochromu P450 kodowane są przez 57 genów i ponad 59 pseudogenów. Enzymy te zostały sklasyfikowane w 18 rodzin i 43 podrodziny⁵ [Nelson, 2009].

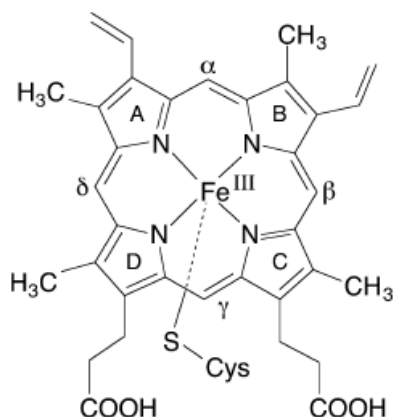


Rys.5. Struktura cytochromu P450 3A4. Symetryczna cząsteczka w jego wnętrzu (na zielono) to hem, będący grupą prostetyczną enzymu [Yano i wsp., 2004].

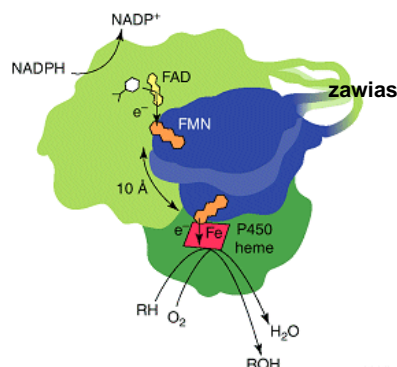
Cytochromy P450 to białka hemowe o masie cząsteczkowej od 42 do 62 kDa. Hem, stanowiący grupę prostetyczną tych enzymów, zawiera wyeksponowany w centrum aktywnym atom żelaza (Fe), który związany jest koordynacyjnie poprzez cztery atomy azotu z tetrapirolowym pierścieniem makrocyklicznym zwanym pierścieniem porfiryńowym (Rys.6A). Jon Fe(III) związany jest poza tym z atomem siarki z grupy tiolowej cysteiny oraz atomem tlenu z cząsteczki wody biorącym bezpośredni udział w reakcjach utleniania. W stanie spoczynkowym cytochromy P450 występują w równowadze pomiędzy strukturą sześciokoordynacyjnego niskospinowego jonu Fe(III) z cząsteczką wody w pozycji *trans* do endogennego ligandu cysteinowego i pięciokoordynacyjnego wysokospinowego jonu Fe(III) z resztą cysteiny jako jedynym ligandem osiowym. Hem ułożony jest równolegle do powierzchni błony, w której zakotwiczone jest białko P450. Wszystkie izoenzymy cytochromu P450 zawierają ten sam kompleks porfiryńowo-hemowy jako centrum katalityczne, natomiast poszczególne izoformy różnią się między sobą sekwencją aminokwasów, która wpływa na zmianę topografii ich miejsca aktywnego [Guengerich, 1995; Smith i wsp., 1997]. Dalsze zwiększenie się ich różnorodności związane jest już ze zróżnicowaniem świata roślinnego i zwierzęcego.

⁵ Rodziny i podrodziny cytochromów P450 określa się na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów w łańcuchu peptydowym (struktura pierwszorzędowa), które mieszczą się w granicach od poniżej 30 do powyżej 98%. Enzymy należące do tej samej rodziny, np. CYP1, wykazują takie podobieństwo co najmniej w 40%, a członkowie podrodziny, np. CYP1A, w ponad 50% [Gonzalez, 1992].

A.



B.



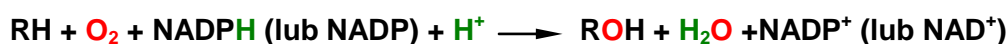
Rys.6. (A) Centrum porfiryńowo-żelazowe cytochromów P450. Jon Fe(III) protoporfiryny IX związany jest osiowo z atomem siarki grupy tiolowej cysteiny [Meunier i wsp., 2004]; (B) Schemat kompleksu enzymatycznego monooksydazy: NADPH-reduktaza cytochromu P450 (kolor jasnozielony), cytochrom P450 (kolor ciemnozielony), fosfatydylocholina (kolor niebieski) [źródło: www.le.ac.uk/biochemistry/].

Cytochromy P450 są jednym z głównych składników układu wieloczynnościowej monooksydazy (ang. *mixed function oxydases* – MFO), w skład którego wchodzi także NADPH-reduktaza cytochromu P450 (zwana pierwotnie NADPH-reduktazą cytochromu c, ang. *cytochrome P450 reductase* – CPR) i fosfatydylocholina (Rys.6B). Wszystkie te elementy występują wspólnie w błonach komórkowych [Smith i wsp., part 1, 1997].

III.1.2. Funkcje fizjologiczne i mechanizm działania izoenzymów cytochromu P450.

Jedną z zasadniczych funkcji fizjologicznych cytochromów P450 w organizmie jest katalizowanie reakcji utleniania szerokiej gamy związków, zarówno endogennych, jak i egzogennych. Reakcja ta określana jest jako monooksygenacja, ponieważ tylko jeden z dwóch atomów cząsteczki tlenu wbudowywany jest do cząsteczki substratu.

Reakcję hydroksylacji, w którą zaangażowany jest cały układ monooksygenazy, można zapisać w postaci następującego równania sumarycznego:



gdzie: RH – substrat, ROH – produkt

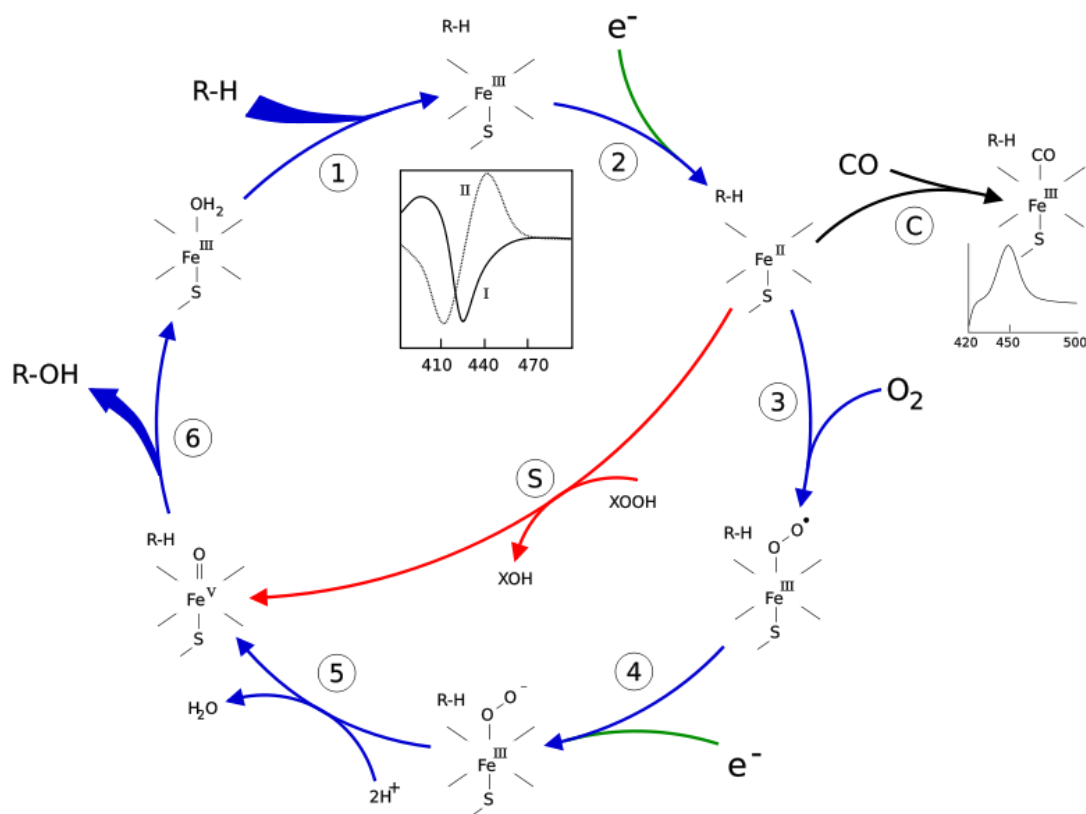
W reakcji tej izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub NADP i poprzez inne przenośniki elektronów przenoszą go na jeden atom tlenu w cząsteczce O_2 , redukując go do cząsteczki H_2O . Drugi atom tlenu jest włączany w substrat. Procesowi temu nie towarzyszy oksydacyjna fosforylacja. Atom tlenu wprowadzanej grupy hydroksylowej

pochodzi z O_2 a nie z H_2O , co wykazano stosując znakowany O^{18} w O_2 i H_2O [Gerber i Sligar, 1992].

Przedstawiony proces odgrywa istotną rolę w syntezie cholesterolu ze skwalenu a także w dalszych przekształceniach cholesterolu w hormony steroidowe i sole kwasów żółciowych. Cytochromy P450 są także ważnym elementem w metabolizmie ksenobiotyków (leki, zanieczyszczenia środowiska, mykotoksyny czy konserwanty żywności), zwłaszcza substancji o charakterze hydrofobowym. Produkty metabolizmu są zwykle bardziej hydrofilowe od substratów, co sprzyja ich dalszemu metabolizowaniu i wydalaniu. Badania dowiodły, iż około 95% leków stosowanych obecnie przez pacjentów jest metabolizowanych przez tę grupę enzymów. Enzymy P450 biorą również udział w przemianach kwasów tłuszczowych, eikozanoidów i witamin, np. D_3 (cholekalcyferolu) i A (retinolu). Reasumując, cytochromy P450 uczestniczą w wielu różnych szlakach metabolicznych odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu wewnętrznej równowagi w komórkach niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu [Smith i wsp., part 2, 1997].

Oprócz reakcji hydroksylacji, cytochromy P450 katalizują także epoksydację, dealkylację, oksydacyjną deaminację, N- oraz S-oksydację i dehalogenację. Jest również włączony (obok dehydrogenazy alkoholowej) w proces detoksykacji alkoholowej. Wszystkie te reakcje wymagają obecności tlenu cząsteczkowego i równoważników redukujących dostarczanych przez NADPH [Smith i wsp., part 1, 1997].

Powszechnie akceptowany mechanizm reakcji przebiegających z udziałem cytochromów P450 wygląda następująco (Rys.7) [Ortiz de Montellano i Correia, 1995; Meunier i wsp., 2004]: Cykl katalityczny cytochromu P450 jest inicjowany przez związanie substratu, RH, z cząsteczką białka hemowego (1). Powstanie kompleksu substrat-cytochrom przyspiesza redukcję jonu Fe(III) protoporfiryny IX, co następuje z udziałem elektronu przeniesionego z NADPH przez NADPH-reduktazę cytochromu P450 (2). Redukcja jonu Fe(III) do jonu Fe(II) umożliwia szybkie przyłączenie cząsteczki O_2 (3). Dostarczenie drugiego elektronu aktywuje molekułę O_2 . Dochodzi do przegrupowania ładunku, wskutek czego atom żelaza uzyskuje stopień utlenienia +3, a atom tlenu -2 (4). Następnie jeden atom tlenu z cząsteczki O_2 ulega redukcji do cząsteczki H_2O (5). Następuje teraz usunięcie atomu wodoru z substratu. Powstały przejściowy wolny rodnik, R^\cdot , przyłącza pozostały atom związanego tlenu tworząc produkt reakcji zawierający grupę hydroksylową, ROH (6). Końcowym etapem cyklu przemian jest odłączenie cząsteczki produktu (utlenionego metabolitu) i odtworzenie utlenionej formy cytochromu P450. Obecnie uważa się, iż każdy z wymienionych etapów cyklu katalitycznego cytochromów P450 może mieć wpływ na ostateczne tempo przemian substratu do produktu.



Rys.7. Proponowany cykl katalityczny cytochromów P450 (szczegółowe objaśnienia w tekście).
 1 – związanie substratu z cząsteczką enzymu, 2 – przyjęcie elektronu z NADPH i redukcja jonu Fe(III) do jonu Fe(II), 3 – związanie cząsteczki O_2 , 4 – przyjęcie drugiego elektronu i przegrupowanie ładunku (Fe^{3+}, O^{2-}), 5 – redukcja jednego atomu tlenu z cząsteczki O_2 do H_2O , atak O na cząsteczkę substratu, 6 – odłączenie cząsteczki produktu i odtworzenie cząsteczki cytochromu (na podstawie [Meunier i wsp., 2004]).

Większość form cytochromów P450 wykazuje niską specyficzną wobec substratu, katalizując przemianę wielu różnych substancji, także takich, z którymi organizm nie miał kontaktu w rozwoju filogenetycznym (a więc nie miał możliwości ewolucyjnego wykształcenia enzymów o odpowiedniej specyficznosci). W tym ostatnim przypadku niska specyficznosc substratowa cytochromów P450 jest przystosowaniem do metabolizowania szerokiego spektrum ksenobiotyków. Pojedyncze izoformy wykazują też często ścisłą regio- i stereospecyficznosc w stosunku do poszczególnych związków [Gotoh, 1993; Smith i wsp., part 2, 1997]. Zrozumienie strukturalnych podstaw wspomnianej specyficznosci odgrywa ważną rolę w poznawaniu funkcji i mechanizmu działania tych enzymów. Może to być również pomocne w przewidywaniu dróg metabolizmu zarówno leków, w tym leków przeciwnowotworowych, jak i związków toksycznych, a w szczególności substancji kancerogennych.

III.2. Hamowanie aktywności izoenzymów cytochromu P450.

Biologiczny okres półtrwania⁶ wielu leków związany jest z indukcją bądź inaktywacją enzymów P450 uczestniczących w ich biotransformacji. Ze względu na to cytochromy P450 są obiektem zainteresowania farmakologii. Wciąż trwają prace nad poszukiwaniem specyficznych substratów i inhibitorów poszczególnych izoenzymów.

Indukcja i hamowanie działania enzymów metabolizujących przez specyficzne związki o niskiej masie cząsteczkowej oraz jony mają istotne znaczenie, służąc jako główny mechanizm kontroli w układach biologicznych. Obydwa zjawiska są kolejną po polimorfizmie genów enzymów metabolizujących przyczyną zróżnicowanej podatności pacjentów na stosowane leczenie i w znacznym stopniu wpływają na skuteczność prowadzonej terapii. Procesy te są prawdopodobnie najbardziej powszechną przyczyną występowania ważnych klinicznie, farmakokinetycznych interakcji pomiędzy lekami (ang. *drug-drug interactions* – DDIs), ponieważ mogą prowadzić do istotnej zmiany ich stężenia w osoczu, powodując zmiany zarówno efektu terapeutycznego, jak i toksyczności. Wzajemne oddziaływania lek-lek pojawiają się, ponieważ cytochromy P450 zaangażowane w metabolizm leków wykazują szeroką specyficzność substratową i pomimo, że dwa leki są strukturalnie zupełnie do siebie niepodobne, mogą konkurować ze sobą o wiązanie się z enzymem [McKinnon i Evans, 2000].

III.2.1. Mechanizmy inhibicji aktywności cytochromów P450.

Zjawisko hamowania aktywności enzymu można wykorzystywać jako narzędzie badawcze, służące do wyjaśnienia mechanizmu działania enzymu a badania z zastosowaniem specyficznych inhibitorów często pozwalają na zidentyfikowanie reszt kluczowych dla katalizy. Zrozumienie biochemicznych i molekularnych mechanizmów inhibicji aktywności izoenzymów cytochromu P450 jest szczególnie istotne w terapii wielolekowej, gdyż pozwala przewidzieć, czy i jak zmieni się efekt jednego leku podawanego z lekiem będącym inhibitorem enzymu cytochromowego. Należy przy tym pamiętać, że niektóre leki są metabolizowane przez więcej niż jeden izoenzym cytochromu P450, inne (i ich metabolity) mogą zarówno hamować dany izoenzym, jak i być przez niego metabolizowane, a niektóre leki (i ich metabolity) mogą hamować poszczególny izoenzym, ale nie są przez niego metabolizowane.

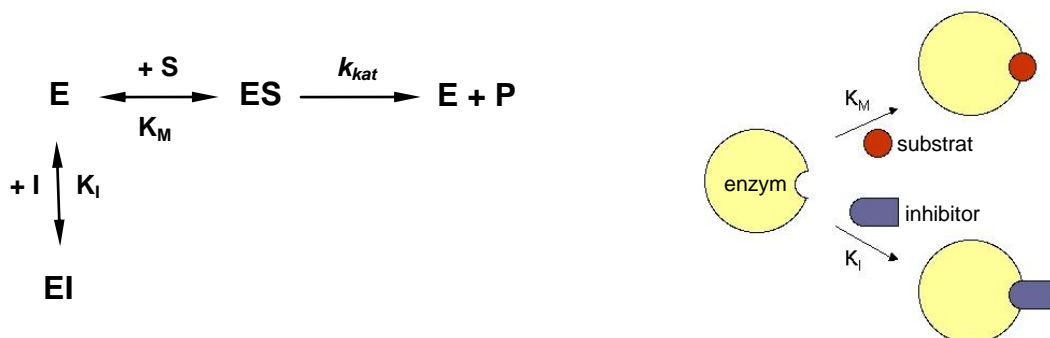
⁶ Biologiczny okres półtrwania (HLT, $t_{1/2}$, $t_{0.5}$, $t_{50\%}$ – ang. *biological half life time*) to czas, w którym stężenie leku we krwi, surowicy lub osoczu zmniejszy się do połowy wartości początkowej, po zakończeniu fazy wchłaniania i dystrybucji. Wyrażony jest w godzinach. Im wyższa wartość $t_{0.5}$, tym lek jest wolniej usuwany z organizmu (wg Kostowski i wsp. *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Wydanie II poprawione. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001, ss. 67 – 70).

Mechanizmy inhibicji aktywności cytochromów P450 przez leki i różne substancje chemiczne, podobnie jak większości enzymów, można podzielić na trzy główne klasy. Wyróżnia się inhibicję odwracalną, quasi-nieodwracalną i nieodwracalną [Halpert, 1995; Lin i Lu, 1998]. Spośród nich najczęściej występującą w przypadku cytochromów P450 i będącą główną przyczyną występowania *in vivo* większości niepożądanych interakcji pomiędzy lekami jest inhibicja odwracalna [Halpert, 1995].

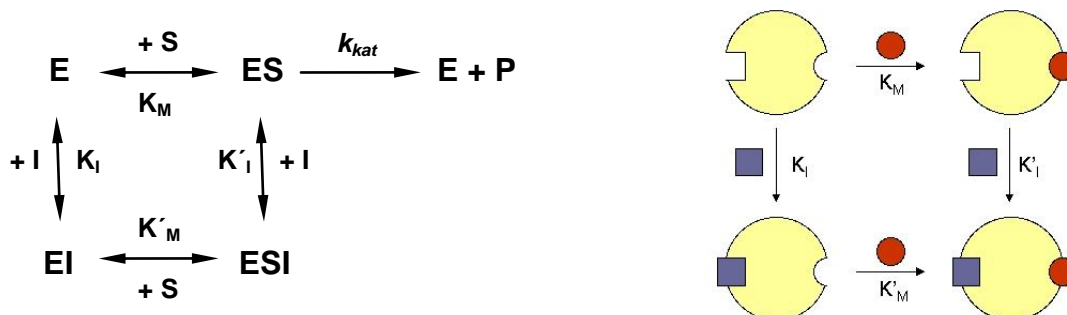
III.2.1.1. Inhibicja odwracalna.

Biorąc pod uwagę kinetykę odwracalnej reakcji enzymatycznej (ang. *reversible inhibition*) może ona być: kompetycyjna, niekompetycyjna i mieszana (Rys.8) [Lin i Lu, 1998].

A. Inhibicja odwracalna kompetycyjna.



B. Inhibicja odwracalna niekompetycyjna.



Rys.8. Równania ilustrujące wzajemne relacje substratu (S), enzymu (E) i inhibitora (I) w inhibicji odwracalnej (K_M – stała Michaelisa-Menten substratu, K_I – stała inhibicji inhibitora, k_{kat} – stała szybkości katalizy, P – produkt) [opracowanie własne na podstawie: Stryer i wsp. *Biochemia. 8 Enzymy: podstawowe pojęcia i kinetyka*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007, ss. 41 – 76].

W **inhibicji kompetycyjnej** (ang. *competitive inhibition*), najprostszym typie inhibicji odwracalnej, cząsteczki inhibitora (I) i substratu (S) współzawodniczą w przyłączaniu się do tego samego miejsca aktywnego cząsteczki cytochromu P450. Związanie przez enzym (E)

cząsteczki inhibitora uniemożliwia zatem związanie substratów (i odwrotnie). Kompleks enzym-inhibitor (EI) pozostaje enzymatycznie nieaktywny. Zazwyczaj inhibitor odwracalny kompetycyjny jest strukturalnie bardzo podobny (lub ma podobny motyw bezpośrednio wiążący się do centrum aktywnego) do prawdziwego substratu dla określonego enzymu. W tym typie inhibicji odwracalnej wartość stałej Michaelisa-Menten substratu (K_M) wzrasta, nie zmienia się natomiast maksymalna szybkość reakcji (V_{max}). Stopień inhibicji zależy tu od stężenia inhibitora, stężenia substratu, K_M i stałej inhibicji inhibitora (K_I). W **inhibicji niekompetycyjnej** (ang. *non-competitive inhibition*) inhibitor może się wiązać do wolnej cząsteczki cytochromu P450, jednak nigdy do miejsca aktywnego enzymu, wobec tego nie konkuruje z substratem, który także może się przyłączyć do powstałego kompleksu. Oba możliwe kompleksy, enzym-inhibitor (EI) i enzym-substrat-inhibitor (ESI) są enzymatycznie nieaktywne. Ponieważ wiązanie inhibitora jest całkowicie niezależne od substratu (ich miejsca wiązania nie zachodzą na siebie) wartość V_{max} obniża się, a wartość K_M pozostaje bez zmian. Stopień inhibicji zależy zatem od stężenia inhibitora i od jego K_I , nie zależy natomiast od stężenia substratu i K_M [Lin i Lu, 1998]. Jednakże, w praktyce, szczególnie w reakcjach dwusubstratowych, obserwuje się bardziej skomplikowany obraz inhibicji. **Inhibicja mieszana** (ang. *mixed inhibition*), przypominająca inhibicję niekompetycyjną, ma miejsce wtedy, kiedy inhibitor wiąże się równocześnie w miejscu aktywnym lub allosterycznym enzymu i do kompleksu enzym-substrat (ES). Związanie inhibitora w miejscu allosterycznym cytochromu P450 powoduje zmianę konformacji białka, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia przyłączenie substratu w centrum aktywnym biocząsteczki. Z kolei kompleks enzym-substrat-inhibitor (ESI) ma tu znikomą aktywność enzymatyczną. W inhibicji mieszanej obserwuje się obniżenie wartości V_{max} , a wzrost wartości K_M . Może ona zostać ograniczona ale nie przewyżczona, przez zwiększanie stężenia substratu [Segel, 1975].

- **Inhibitory cytochromów P450 odwracalne kompetycyjne** – cymetydyna, eliptycyna, pirydyny.

Konkurencja o miejsce wiązania w cytochromie P450 pomiędzy substratem i inhibitorem może zachodzić o grupę hemową lub o inne regiony w centrum aktywnym enzymu. Ponieważ reszta hemowa jest miejscem, w którym zachodzą reakcje utleniania, potencjalnymi inhibitorami mogą być związki z wolną parą elektronową, np. związki heterocykliczne zawierające w swojej strukturze atom azotu. Siła i trwałość wiązania pomiędzy jonem żelaza a parą elektronową inhibitora jest jednym z wielu czynników determinujących aktywność inhibitora. Pierścienie heterocykliczne są elementem struktury wielu związków o właściwościach terapeutycznych. Przykładem jest cymetydyna – antagonistą receptora histaminowego H₂, stosowana w leczeniu wrzodów żołądka. Jej

aktywność biologiczna jest związana z obecnością pierścienia imidazolowego, który wiąże się do receptora H2. Jednakże pierścień imidazolowy tego leku wiąże się również do hemowej grupy prostetycznej cytochromu P450 i wykazuje selektywną inhibicję dla reakcji biotransformacji przeprowadzanych przy udziale izoenzymów CYP3A4 i CYP2D6. W badaniach klinicznych wykazano, że w sytuacji gdy podawane są jednocześnie dwa leki, cymetydyna oraz disopyramid (oba metabolizowane przez te same izoenzymy cytochromu P450), następuje znaczne podwyższenie maksymalnego stężenia disopyramidu w cytoplazmie, co jest efektem hamującego wpływu cymetydyny na metabolizm aktywacyjny disopyramidu [Knodell i wsp., 1991]. W sposób podobny do analogów imidazolu, wiele pochodnych chinoliny oddziałuje z jonem żelaza grupy hemowej i powoduje inhibicję aktywności izoenzymów cytochromu P450. Przykładowo, chinidyna jest silnym inhibitorem odwracalnym dla CYP2D6 [Otton i wsp., 1984], zaś eliptycyna, przeciwnowotworowy alkaloid posiadający również ugrupowanie chinolinowe, hamuje izoenzymy CYP1A1/2 [Auclair, 1987]. Również w przypadku pirydyn, także posiadających atom azotu w swojej cząsteczce, zaobserwowano inhibicję aktywności CYP3A4, głównie wśród związków hamujących proteazę wirusa HIV [Yan i Caldwell, 2001]. Podsumowując, wymienione powyżej chemoterapeutyki są inhibitorami, które posiadają wysokie powinowactwo do miejsca aktywnego wybranych cytochromów P450, ale nie tworzą wiązania kowalencyjnego z grupą prostetyczną czy resztami aminokwasowymi enzymu, dając możliwość kompetycyjnego usunięcia efektu inhibicji.

- **Inhibitory cytochromów P450 odwracalne niekompetycyjne** – omeprazol.

Przykładem inhibicji odwracalnej niekompetycyjnej jest hamowanie katalizowanej przez izoenzym CYP3A4 reakcji biotransformacji dekstrometofanu do 3-metoksymorfinianu [Ko i wsp., 1997]. Inhibitorem jest tutaj omeprazol. Lek ten poprzez wiązanie się do CYP3A4, w innym miejscu niż centrum aktywne, prowadzi do zmiany konformacji funkcjonalnego enzymu. W efekcie substrat nie może się prawidłowo wiązać do enzymu. Jak wspomniałam wcześniej, substrat i inhibitor nie konkurują ze sobą o to samo miejsce wiązania, więc tempo reakcji katalizowanej przez enzym spada niezależnie od stężenia substratu.

III.2.1.2. Inhibicja quasi-nieodwracalna i nieodwracalna.

W przeciwieństwie do inhibicji odwracalnej kompetycyjnej, w której dwa związki współzawodniczą o miejsce aktywne enzymu, inhibicja quasi-nieodwracalna i nieodwracalna spowodowane są najczęściej działaniem reaktywnych metabolitów pośrednich (ang. *reactive intermediates*) powstających w reakcjach katalizowanych przez cytochromy P450. W

odróżnieniu od inhibitorów odwracalnych, które nie pozostawiają trwałych zmian w enzymie, inhibitory działające nieodwracalnie trwale modyfikują swoje docelowe enzymy [Lin i Lu, 1998].

Inhibicja quasi-nieodwracalna (ang. *quasi-irreversible inhibition*) wymaga zajęcia przynajmniej jednego pełnego cyklu katalitycznego cytochromu P450, podczas którego powstają reaktywne metabolity pośrednie. Mają one zdolność tworzenia stabilnych kompleksów ze zredukowaną formą jonu żelaza grupy prostetycznej cytochromu P450 – hemem (ang. *metabolic intermediate complex* – MIC), nie wiążąc się jednocześnie z częścią białkową enzymu. Stabilność adduktu P450-Fe(II)-reaktywny metabolit pośredni jest związana z wytrzymałością wiązania żelazo-heteroatom, na które ma wpływ stan oksydacyjny jonu żelaza znajdującego się w centrum reszty hemowej [Yan i Caldwell, 2001]. Powstały MIC może ulec dysocjacji w warunkach nie fizjologicznych pod wpływem żelazicyjanku potasu (nazwa systematyczna: heksacyjanożelazian (III) potasu, $K_3[Fe(CN)_6]$) lub na drodze dializy. Nie jest to natomiast możliwe w warunkach *in vivo*, w których kompleks ten jest zbyt stabilny i jedynie ponowna synteza enzymu jest sposobem przywrócenia jego pełnej aktywności [Franklin, 1991; Ma i wsp., 2000]. Stąd zresztą pochodzi nazwa inhibicji – quasi-nieodwracalna. W **inhibicji nieodwracalnej** (ang. *irreversible inhibition*) reaktywna forma pośrednia substratu odpowiedniego izoenzymu cytochromu P450 hamuje aktywność enzymu poprzez kowalencyjne związanie się z grupą hemową, białkiem lub z obojgiem z nich. Struktura enzymu zostaje nieodwracalnie zmodyfikowana i to w konsekwencji powoduje jego trwałą inaktywację. W opisywanym przypadku inhibicji dializa *in vitro* nie przywraca aktywności enzymu.

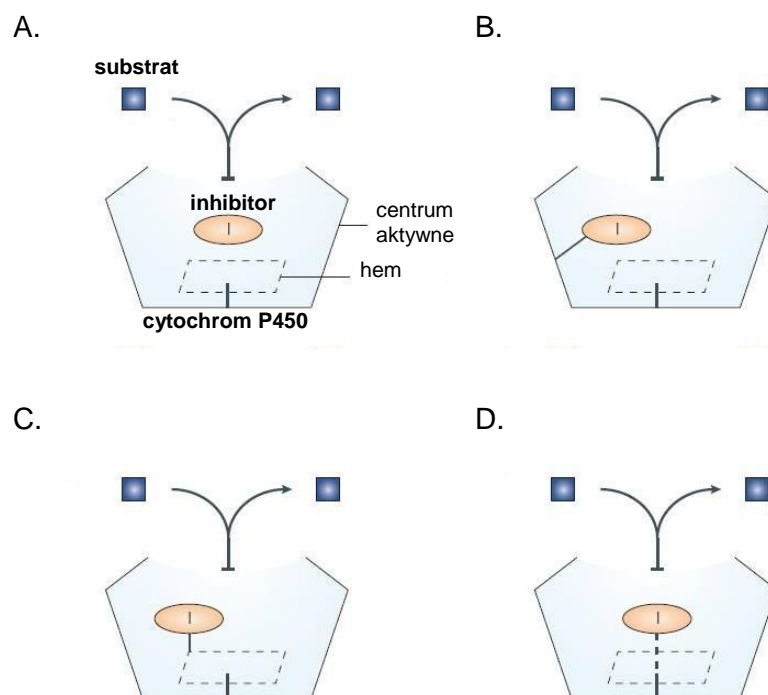
Ze względu na to, iż proces tworzenia reaktywnych metabolitów pośrednich jest bezpośrednio związany z cyklem katalitycznym cytochromu P450 inhibicję quasi-nieodwracalną i nieodwracalną klasyfikuje się jako jeden typ inhibicji, tzw. inhibicję „mechanism-based” (ang. *mechanism-based inactivation* – MBI), której szczegółową charakterystykę zamieściłam w kolejnym rozdziale niniejszej pracy. Substraty, z których powstają reaktywne intermediały hamujące aktywność enzymu określa się w związku z tym jako inhibitory „mechanism-based”.

- **Inhibitory cytochromów P450 „mechanism-based”** – erytromycyna, tio-TEPA.

Inhibicję quasi-nieodwracalną można przedstawić na przykładzie inaktywacji enzymu CYP3A przez erytromycynę. Antybiotyk ten zawiera trzeciorzędową grupę aminową w pierścieniu aminocukrowym. Reakcje biotransformacji, takie jak: N-hydroksylacja, N-demetylacja i N-oksydacja, katalizowane przez CYP3A, generują metabolity nitrozowe,

które silnie wiążą się do grupy hemowej i tworzą stabilny nieaktywny kompleks, którego obecność unieczynnia enzym. Erytromycyna jako silny antybiotyk hamuje szereg reakcji utleniania katalizowanych przez CYP3A, m.in. utlenianie terfenadyny, cyklosporyny i wielu innych leków [Kanamitsu i wsp., 2000]. W podobny do erytromycyny sposób aktywność CYP3A4 hamuje również troleandomycyna [Periti i wsp., 1992; Newton i wsp., 1995].

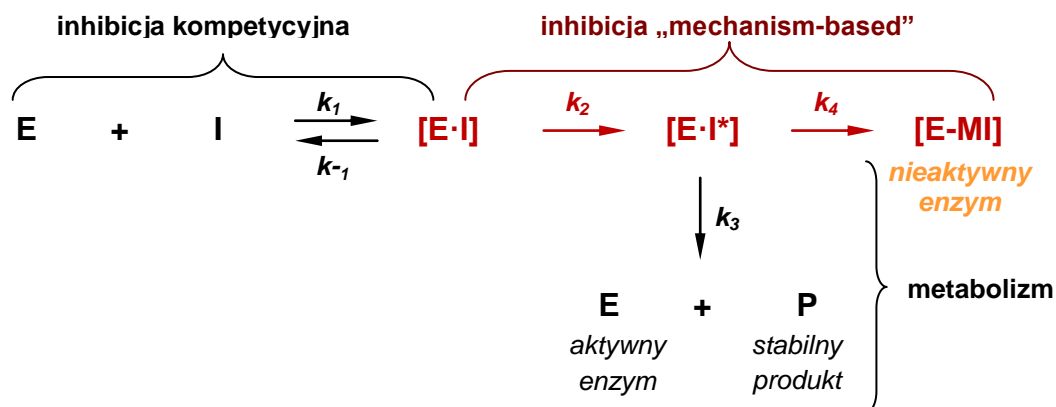
Hamowanie aktywności izoenzymu CYP2B6 przez wielofunkcyjny lek alkilujący, tio-TEPA (trietylenotiofosfamid), jest z kolei przykładem inhibicji nieodwracalnej, w której aktywna (zmetabolizowana) postać związku, tepa (trietylenofosfamid), powoduje alkilację apoproteiny, co jest bezpośrednią przyczyną unieczynnienia enzymu [Richter i wsp., 2005]. Powstanie aktywnego metabolitu pośredniego, czyli właściwego inhibitora nieodwracalnego, zostaje poprzedzone przemianą metaboliczną wyjściowego leku w obecności izoenzymu CYP2B6. Ten typ inhibicji został także odkryty w przypadku mifepristonu, inhibitora CYP3A4 [Kan i wsp., 1999], oraz ziletonu i furafiliny, związków inaktywujących CYP1A2 [Ping i wsp., 2003; Kunze i Trager, 1993].



Rys.9. Zestawienie możliwych mechanizmów hamowania aktywności cytochromów P450: (A) inhibicja odwracalna, w której inhibitor blokuje dostęp substratu (leku) do centrum aktywnego enzymu uniemożliwiając w ten sposób jego przemianę metaboliczną; (B) inhibicja nieodwracalna, w której substrat ulega aktywacji do metabolitu pośredniego (właściwego inhibitora), który wiąże się kowalencyjnie z częścią białkową (apoproteiną) centrum aktywnego enzymu; (C) inhibicja nieodwracalna, w której metabolit pośredni wiąże się kowalencyjnie z grupą prostetyczną enzymu (hemem); (D) inhibicja quasi-nieodwracalna, w której metabolit pośredni tworzy stabilny kompleks z jonem żelaza grupy prostetycznej cytochromu P450 (opracowanie własne na podstawie [Wienkers i Heath, 2005]).

III.2.2. Inhibicja „mechanism-based” (MBI) izoenzymów cytochromu P450.

Jak wspomniałam wcześniej, inhibicja „mechanism-based”, potocznie określana jako inhibicja samobójcza (ang. *suicide inhibition*)⁷, to szczególny przypadek inhibicji aktywności enzymów, obejmujący inhibicję quasi-nieodwracalną i nieodwracalną. Występuje ona dosyć często w przypadku cytochromów P450 i jest, obok inhibicji odwracalnej, powszechną przyczyną pojawiania się niebezpiecznych oddziaływań pomiędzy lekami. Szereg wyników badań prowadzących do określenia precyzyjnego mechanizmu tego typu inhibicji jest wykorzystywanych, m.in. do modyfikacji metod terapii wielolekowej. Pierwsza z podanych nazw inhibicji sugeruje, że zahamowanie aktywności enzymu oparte jest na mechanizmie jego działania, tzn. powstanie właściwego inhibitora „mechanism-based” musi zostać poprzedzone przemianą metaboliczną wyjściowego związku do aktywnego metabolitu pośredniego⁸. W pierwszym etapie procesu inhibicji substrat enzymu działa jako inhibitor odwracalny kompetycyjny, który dopiero w centrum aktywnym enzymu, na skutek przemiany metabolicznej, zostaje przekształcony w inhibitor nieodwracalny „mechanism-based” (Rys.10). Hamuje on aktywność katalityczną enzymu poprzez modyfikację kowalencyjną lub koordynację jonu żelaza grupy prostetycznej. Enzym, biorąc udział w utworzeniu reaktywnego metabolitu pośredniego, uczestniczy we własnej nieodwracalnej („samobójczej”) inaktywacji [Kalgutkar i wsp., 2007].



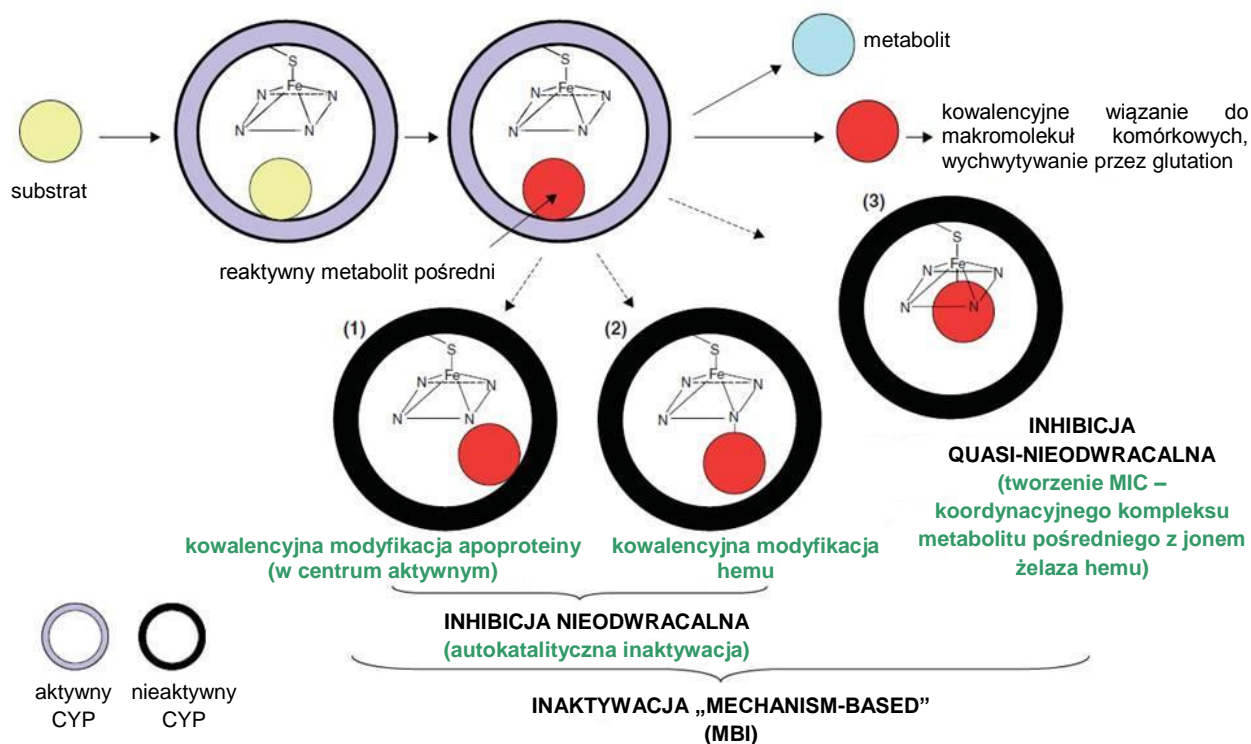
Rys.10. Schemat ilustrujący wzajemne relacje enzymu i inhibitora w inhibicji „mechanism-based” (E – enzym, I – inhibitor odwracalny kompetycyjny, I^* – metabolit pośredni, MI – inhibitor „mechanism-based”, k – stałe szybkości reakcji) (opracowanie własne na podstawie [Kalgutkar i wsp., 2007]).

⁷ Termin inhibicja samobójcza jest często używany w literaturze zamiennie z terminem inhibicja „mechanism-based”, ale w rzeczywistości jest to jeden ze znanych mechanizmów MBI.

⁸ Wg definicji podanej po raz pierwszy przez R. R. Rando [Rando, 1984].

III.2.2.1. Podział i charakterystyczne cechy inhibicji „mechanism-based”.

Ze względu na miejsce i sposób wiązania się reaktywnego metabolitu pośredniego (intermediatu) z enzymem możemy wyróżnić dwa podstawowe typy MBI białek P450, które odzwierciedla Rys.11 [Ortiz de Montellano i Correia, 1995; Polasek i Miners, 2007].



Rys.11. Typy inaktywacji „mechanism-based” (MBI) cytochromu P450 (objaśnienia w tekście; opracowanie własne na podstawie [Polasek i Miners, 2007]).

Podczas autokatalitycznej inaktywacji (ang. *suicide processing*, *suicide inhibition* lub *catalysis-dependent inhibition*) reaktywny metabolit pośredni, powstały na skutek zajęcia przynajmniej jednego pełnego cyklu katalitycznego cytochromu P450, może: (1) wiązać się kowalencyjnie z nukleofilowymi resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym enzymu lub (2) reagować z atomami azotu hemu powodując destrukcję reszty hemowej, często też generując tym pochodne, które tworzą wiązania sieciujące z apoproteiną. W obydwu przypadkach struktura białka zostaje nieodwracalnie zmodyfikowana. Ze względu na trwałą utratę aktywności enzymu wspomniane mechanizmy zostały sklasyfikowane jako inhibicja nieodwracalna [Murray, 1997; Kent i wsp., 2001].

Kolejny typ MBI (3) ma miejsce, gdy reaktywny metabolit pośredni wiąże się koordynacyjnie z jonem żelaza grupy prostetycznej enzymu, tworząc stabilny kompleks (MIC). Hemoproteina pozostaje w tym przypadku nieaktywna, nie podlega jednak destrukcji, a część białkowa enzymu nie ulega modyfikacji. Termin inhibicja quasi-nieodwracalna,

używany w odniesieniu do tego mechanizmu, wskazuje na możliwość przywrócenia aktywności cytochromu P450 w warunkach *in vitro*. *In vivo* kompleksy reaktywnych intermedatów z enzymem są jednak bardzo stabilne [Murray, 1997; Ma i wsp., 2000]. Warto podkreślić fakt, iż przedstawione trzy mechanizmy hamowania aktywności izoenzymów cytochromu P450 są uznawane za MBI tylko pod warunkiem, że reaktywny metabolit pośredni inaktywuje enzym bez opuszczania jego miejsca aktywnego [Kent i wsp., 2001]. Znamioną cechą MBI jest współistnienie kilku charakterystycznych zależności [Polasek i Miners, 2007; Hollenberg i wsp., 2008]. Eksperymentalnie można wykazać, że mamy do czynienia z MBI, gdy jednocześnie:

- Obserwujemy **nieodwracalność inhibicji** – usunięcie nadmiaru inaktywatora z roztworu na skutek wielokrotnego rozcieńczenia mieszaniny reakcyjnej, na drodze ultrafiltracji lub dializy nie powinno zmienić resztkowej aktywności enzymu;
- Stwierdzamy, że stopień zahamowania aktywności enzymu zależy od:
 - **czasu inkubacji enzymu z inhibitorem** (ang. *time-dependent inhibition*) – wykres zależności logarytmu naturalnego resztkowej aktywności enzymu po inkubacji do czasu inkubacji powinien być linią prostą;
 - **stężenia inhibitora** (ang. *concentration-dependent inhibition*) – stopień inaktywacji enzymu powinien wykazywać kinetykę nasycenia w odniesieniu do stężenia inaktywatora;
 - **obecności typowych kofaktorów reakcji enzymatycznej** (w przypadku cytochromów P450 są to: NADPH (ang. *NADPH-dependent inhibition*), O₂ i NADPH-reduktaza cytochromu P450) – jedynie w tych warunkach możliwy jest metabolizm inaktywatora do reaktywnego produktu pośredniego, który nieodwracalnie unieczynnia enzym;
 - **obecności standardowego substratu enzymu** – substrat enzymu, konkurując z potencjalnym inhibitorem „mechanism-based” o miejsce w centrum aktywnym enzymu, powinien chronić enzym przed inaktywacją, a zatem obniżyć stopień zahamowania jego aktywności (ang. *substrate protection against inactivation*);
 - **obecności tzw. „wychwytywaczy” wolnych rodników** (ang. *scavengers of reactive oxygen species*) – obecność niektórych enzymów, np. katalazy lub dysmutazy ponadtlenkowej w mieszaninie reakcyjnej nie powoduje osłabienia hamowania aktywności enzymu;
- Wykażemy, że **stechiometria przyłączenia inhibitora do zinaktywowanej cząsteczki enzymu wynosi 1:1**.

W idealnej sytuacji wszystkie te kryteria powinny zostać spełnione aby uznać inhibicję za „mechanism-based”, nie w każdych warunkach jest to jednak osiągalne. W literaturze można

znaleźć przykłady inhibitorów „mechanism-based”, np. izoenzymów CYP2E1 i CYP2B4, których działanie jest tylko częściowo nieodwracalne. W tych przypadkach „odwracalność” MBI w głównej mierze zależy od rozmiaru i natury chemicznej zarówno grup funkcyjnych cząsteczki inaktywatora, jak również jego reaktywnej formy pośredniej. Właściwość taką posiadają, m.in. *tert*-butyloalkiny [Blobaum i wsp., 2004, 2005, 2006].

III.2.2.2. Metody wykrywania inhibicji „mechanism-based”.

Poniżej przedstawiam krótką charakterystykę wybranych technik doświadczalnych (m.in. chromatograficznych i spektrofotometrycznych) służących identyfikacji oraz określeniu właściwego mechanizmu MBI. Wybrane z nich zastosowałam w niniejszej pracy badając inhibicję aktywności cytochromów P450.

III.2.2.2.1. Określenie charakteru inhibicji.

Pierwszy etap badań mechanizmu inhibicji wymaga sprawdzenia czy obserwowane hamowanie aktywności enzymu zachodzi w sposób odwracalny czy nieodwracalny. Jednym ze sposobów rozróżnienia pomiędzy tymi typami inhibicji jest tzw. metoda rozcieńczenia, w której mieszaninę inhibitora, enzymu i kofaktora (w przypadku cytochromów P450 jest nim NADPH), po określonym czasie inkubacji, rozcieńcza się wielokrotnie (np. dziesięciokrotnie) roztworem standardowego substratu danego enzymu i NADPH. W przypadku inhibicji odwracalnej inhibitor jest słabo związany z enzymem i na skutek zmiany warunków równowagi spowodowanej rozcieńczeniem zostaje uwolniony do roztworu. Natomiast inhibitor nieodwracalny, związany z enzymem kowalencyjnie, w tych samych warunkach nie przechodzi do roztworu i nadal hamuje aktywność enzymu.

Alternatywnym do metody rozcieńczenia sposobem wykazania charakteru hamowania aktywności enzymu jest dializa. W większości przypadków pozwala ona na efektywne usunięcie potencjalnych inhibitorów odwracalnych, które mogą uczestniczyć w procesie inhibicji, z mieszaniny reakcyjnej. Po dodaniu standardowego substratu cytochromu P450 sprawdza się następnie czy jest on nadal metabolizowany przez enzym. Obniżenie stopnia przemiany substratu to sygnał, że reaktywny metabolit pośredni przyłączył się do enzymu nieodwracalnie [Richter i wsp., 2005]. W przypadku gdy aktywność cytochromu P450 jest hamowana na skutek powstania MIC istnieje, w odpowiednich warunkach eksperymentalnych, możliwość przywrócenia funkcji katalitycznej enzymu. W tym celu wykorzystuje się, m.in. właściwości utleniające żelazicyjanku potasu, $K_3[Fe(CN)_6]$. Obecność tego odczynnika powoduje przejście jonu Fe(II) hemu, przy którym MIC jest stabilny, w formę utlenioną, Fe(III), przy której kompleks ulega dysocjacji. Zbadano, iż najbardziej wrażliwe na

działanie $K_3[Fe(CN)_6]$ są kompleksy tworzone przez pochodne nitrozowe [Franklin, 1991]. Rozpad kompleksu P450-Fe(II)-reaktywny metabolit pośredni może również nastąpić *in vitro* na skutek rozcieńczenia mieszaniny reakcyjnej podczas dializy, co powoduje zaburzenie równowagi dynamicznej pomiędzy stałą tworzenia (trwałości) a stałą rozpadu (nie trwałości) kompleksu [Ma i wsp., 2000]. Obserwacja powyższych efektów świadczy o charakterze quasi-nieodwracalnym inhibicji.

III.2.2.2.2. Badania wpływu stężenia inhibitora oraz czasu inkubacji enzymu z inhibitorem.

Dla poznania wpływu stężenia inhibitora oraz czasu inkubacji na proces hamowania aktywności enzymu należy przeprowadzić szereg reakcji, w których zmienia się albo stężenie inhibitora albo czas inkubacji inhibitora z enzymem. Stwierdzenie zależności liniowej procentowej aktywności enzymu od tych dwóch czynników jest pierwszą wskazówką istnienia MBI [Hollenberg i wsp., 2008].

III.2.2.2.3. Określenie wpływu obecności NADPH.

Podstawowym warunkiem wystąpienia MBI jest zajście co najmniej jednego pełnego cyklu katalitycznego cytochromu P450, co prowadzi do utworzenia reaktywnego metabolitu pośredniego spełniającego funkcję właściwego inhibitora aktywności enzymu. Proces ten wymaga obecności w mieszaninie reakcyjnej egzogenego kofaktora reakcji enzymatycznej, NADPH, który z enzymami cytochromowymi tworzy układ utleniająco-redukcyjny. Hamowanie aktywności enzymu obserwuje się gdy w środowisku reakcji obecny jest NADPH, gdyż możliwe jest wtedy przekształcenie wyjściowego związku w aktywny metabolit, który nieodwracalnie wiąże się z enzymem. Brak kofaktora reakcji nie wywołuje natomiast efektu inhibicji [Hollenberg i wsp., 2008].

III.2.2.2.4. Przebieg inhibicji w obecności standardowego substratu enzymu lub inhibitora odwracalnego kompetycyjnego.

Podczas MBI dochodzi do utworzenia w centrum aktywnym cytochromu P450 reaktywnych metabolitów pośrednich odpowiedzialnych za inaktywację enzymu. W celu potwierdzenia, iż centrum aktywne enzymu uczestniczy w aktywacji wyjściowego związku (inhibitora) do reaktywnego intermediatu przeprowadza się następujące doświadczenie. Mieszaninę enzymu, inhibitora (stałe stężenie), NADPH i standardowego substratu danego enzymu (kolejne wielokrotności stężenia inhibitora) poddaje się inkubacji, a następnie

rozcieńcza się ją kilkakrotnie mieszaniną substratu enzymu i NADPH. Podwyższanie wartości szczytkowej aktywności enzymu dla reakcji, w których wzrasta stosunek stężenia standardowego substratu enzymu do stężenia inhibitora, w tej samej mieszaninie inkubacyjnej, świadczy o współzawodnictwie substratu z inhibitorem o miejsce wiązania w centrum aktywnym białka, co tym samym obniża poziom reaktywnych metabolitów pośrednich inhibitora zdolnych do trwałej inaktywacji enzymu. Na tej podstawie można powiedzieć, iż obecność typowego substratu chroni enzym przed utratą aktywności. W doświadczeniu tym standardowy substrat może zostać zastąpiony odpowiednim inhibitorem odwracalnym kompetycyjnym enzymu

III.2.2.2.5. Przebieg inhibicji w obecności tzw. „wychwytywaczy” wolnych rodników tlenowych i „pułapek” nukleofilowych.

W cykl katalityczny cytochromu P450 wpisany jest proces wytwarzania reaktywnych form tlenu (np. nadtlenu wodoru, anionu ponadtlenkowego), które, szybko reagując z centrum aktywnym enzymu, mogą odpowiadać za hamowanie jego aktywności. Z drugiej strony, aktywność cytochromu P450 może zostać obniżona przez związanie reaktywnych intermediatów metabolizowanego związku w centrum aktywnym enzymu. Aby móc potwierdzić lub wykluczyć pierwszą z wymienionych możliwości do mieszaniny reakcyjnej dodaje się tzw. „wychwytywacze” wolnych rodników tlenowych (ang. *scavengers of reactive oxygen species*), np. dysmutazę ponadtlenkową czy katalazę. W przypadku MBI dodatek „wychwytywaczy” nie przeciwdziała jednak inhibicji, co świadczy o mechanizmie inhibicji, w którym nie uczestniczą reaktywne formy tlenu. Z kolei elektrofilowe cząsteczki reaktywnych metabolitów pośrednich znajdujących się w mieszaninie mogą zostać związane przez tzw. „pułapki” nukleofilowe (ang. *nucleophilic trapping agents*), do których należy glutation (GSH). Jeśli występuje MBI obecność GSH w mieszaninie reakcyjnej nie zmienia stopnia hamowania aktywności enzymu, gdyż odpowiedzialny za jego inaktywację reaktywny intermediat, blokując centrum aktywne białka, staje się niedostępny dla GSH obecnego w roztworze [Richter i wsp., 2005; Duong-Ha i wsp., 2001].

III.2.2.2.6. Metoda oparta na stechiometrii wiązania inhibitora z enzymem.

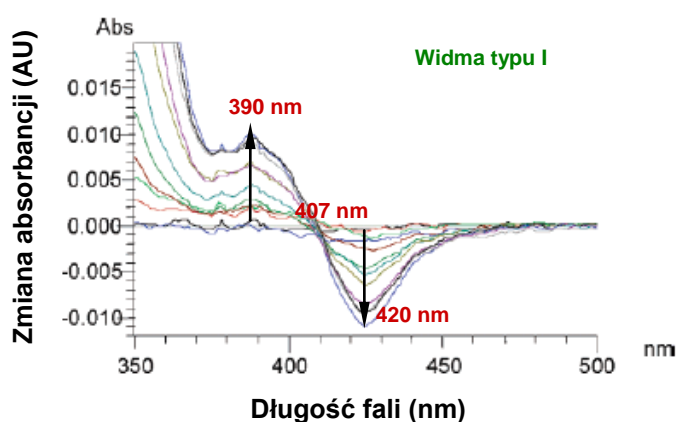
Jedną z charakterystycznych cech MBI jest odpowiednia, 1:1, stechiometria wiązania inhibitora z enzymem. W celu sprawdzenia tego warunku stosuje się znakowany radioaktywnie inhibitor. Ilość reaktywnego metabolitu pośredniego, wiążącego się z enzymem, określa się następnie przez strącanie białek enzymatycznych z mieszaniny reakcyjnej w obecności lub nieobecności NADPH. Porównanie radioaktywności obecnej w

próbie kontrolnej (bez NADPH) i w próbie z inhibitorem oraz NADPH pozwala stwierdzić stechiometrię wiązania inhibitora z enzymem [Lin i wsp., 2002].

III.2.2.2.7. Badanie zmian w widmie UV-vis cytochromu P450.

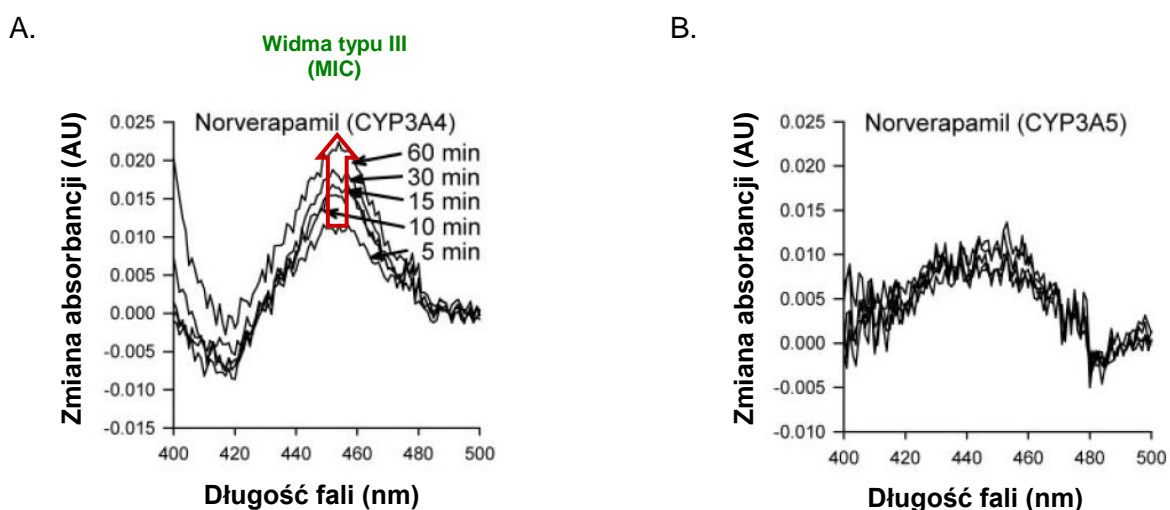
Widmo widzialne wolnej cząsteczki cytochromu P450, niezwiązanej z żadnym substratem, wykazuje maksimum absorpcji przy około 420 nm. Jon Fe(III) grupy prostetycznej enzymu znajduje się wówczas w stanie niskospinowym, który jest dodatkowo stabilizowany przez, będącą szóstym ligandem osiowym, cząsteczkę wody [McMurry i Groves, 1986]. Związanie substratu w centrum aktywnym enzymu powoduje wyraźne zmiany w widmie UV-vis cytochromu P450, których charakter pozwala określić naturę oddziaływania pomiędzy ligandem a enzymem. Wobec tego, zastosowanie absorpcyjnej analizy spektrofotometrycznej umożliwi zbadanie czy obserwowana MBI zachodzi poprzez kowalencyjne związanie inhibitora do części białkowej lub grupy prostetycznej enzymu (autokatalityczna inaktywacja czyli inhibicja samobójcza, szlak 1 i 2 na Rys.11), bądź też poprzez powstawanie koordynacyjnego kompleksu reaktywnego metabolitu pośredniego z jodem żelaza hemu (MIC, szlak 3 na Rys.11).

Pierwszy efekt stwierdza się, gdy w widmie widzialnym cytochromu P450 pojawi się charakterystyczny pik przy długości fali 390 nm oraz jednocześnie wystąpi gwałtowne obniżenie absorpcji przy 420 nm, a punkt izozbestyczny wystąpi przy 407 nm. Te specyficzne zmiany spektralne, zarejestrowane jako widmo różnicowe, tworzą tzw. widmo typu I, które przedstawiłam na Rys.12 [Hutzler i wsp., 2004]. Obserwowane zmiany w widmie UV-vis cytochromu P450 są skutkiem związania substratu w miejscu aktywnym enzymu, co prowadzi do usunięcia cząsteczki wody i utworzenia pięcioskoordynowanego wysokospinowego jonu Fe(III).

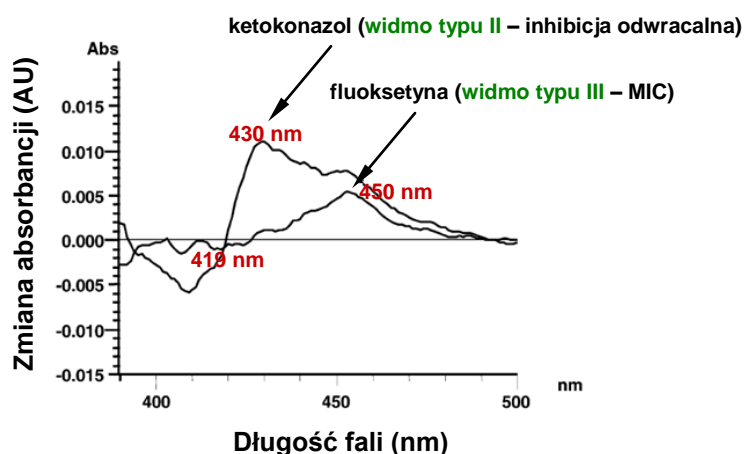


Rys.12. Widma różnicowe typu I CYP2D6 z ETPP (na podstawie [Hutzler i wsp., 2004]).

W przypadku tworzenia MIC zaobserwować można charakterystyczny wzrost absorbancji o maksimum przy około 455 nm (widmo typu III, Rys.13A). W kompleksie tym reaktywny metabolit pośredni wiąże się z jonem Fe(II) hemu, który w tej formie nie ma możliwości dalszego przyłączenia tlenu węgla (II) [Franklin, 1991]. W celach porównawczych przeprowadza się także analizę widma UV-vis cytochromu P450 stosując inhibitor odwracalny kompetycyjny danego izoenzymu lub izoenzym, którego aktywności badany inhibitor nie hamuje. Nie obserwujemy wówczas charakterystycznego dla MIC wzrostu absorbancji przy 455 nm (Rys.13B) [Wang i wsp., 2005; McConll i wsp., 2004].



Rys.13. Porównanie widm różnicowych CYP3A4 i CYP3A5 z norverapamilem, inhibitorem „mechanism-based” tworzącym MIC z CYP3A4, nie wpływającym na aktywność CYP3A5 (na podstawie [Wang i wsp., 2005]).



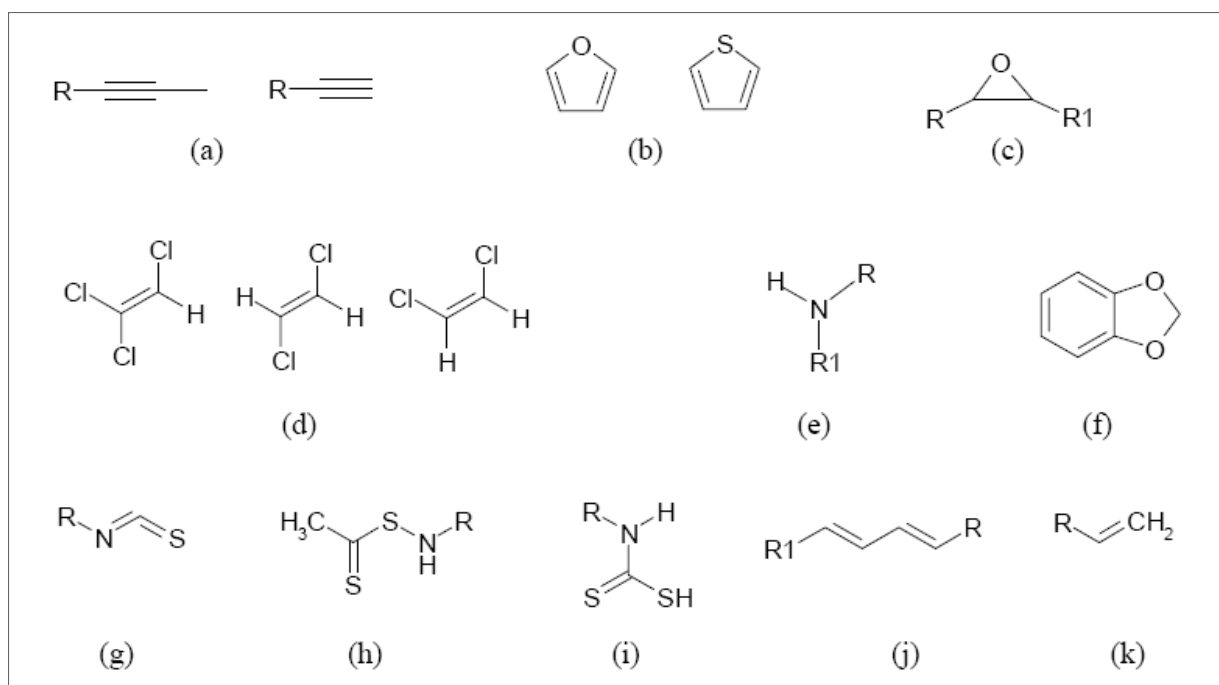
Rys.14. Porównanie widm różnicowych CYP3A4 z fluoksetyną (widmo typu III – MIC) oraz CYP3A4 z ketokonazolem (widmo typu II – inhibicja odwracalna) (na podstawie [Hutzler i wsp., 2006]).

Badania spektrofotometryczne pozwalają również na rozróżnienie inhibitorów wiążących się koordynacyjnie z jonem żelaza hemu w sposób odwracalny lub na drodze MBI. W

pierwszym przypadku, jak dla ketokonazolu, obserwuje się tzw. widmo typu II, które charakteryzuje się wzrostem absorbancji przy 430 nm i obniżeniem jej wartości przy 390 nm, z punktem izobestycznym około 419 nm (Rys.14). Ta zmiana spektralna związana jest ze zwiększeniem udziału stanu niskospinowego jonu Fe(III), który został spowodowany zastąpieniem cząsteczki wody w pozycji szóstego ligandu osiowego cząsteczką inhibitora. Do ligandów typu II należą, m.in. związki zawierające w swojej strukturze anilinę, pierścień imidazolowy lub triazolowy [Locuson i wsp., 2007]. W drugim przypadku, jak dla fluoksetyny, typowy MIC daje maksimum absorbancji przy 450 nm (Rys.14) [Hutzler i wsp., 2006].

III.2.3. Inhibitory „mechanism-based” cytochromów P450.

III.2.3.1. Uwarunkowania strukturalne inhibitorów „mechanism-based”.



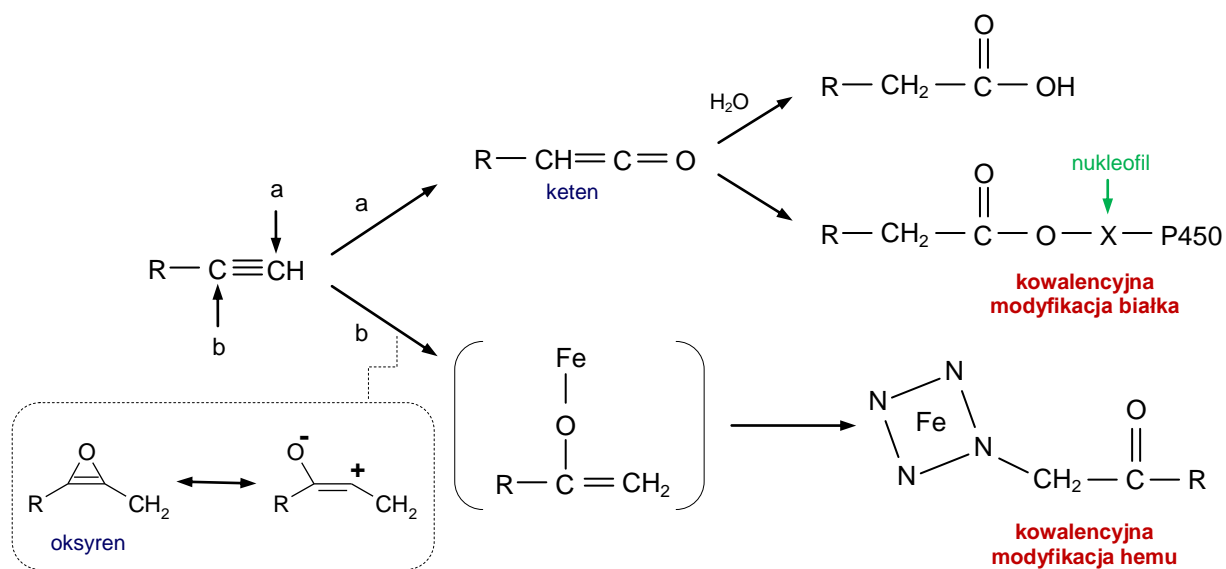
Rys.15. Przykłady grup funkcyjnych obecnych w cząsteczkach inhibitorów „mechanism-based” cytochromów P450 (a) alkiny wewnętrzne i terminalne (b) furany i tiofeny (c) epoksydy (d) di- i trichloroetyleny (e) aminy drugorzędowe (f) benzodioksole (g) izocyjaniany (h) tioamidy (i) ditiokarbamaty (j) związki zawierające układ sprzężonych wiązań podwójnych (k) związki zawierające terminalne wiązanie podwójne [Kalgutkar i wsp., 2007].

W ciągu ostatnich 20 – 30 lat zidentyfikowano wiele inhibitorów „mechanism-based” różnych izoenzymów cytochromu P450. Związki te zawierają w swojej strukturze specyficzne grupy funkcyjne, które czynią je podatnymi na metabolizm wobec cytochromów P450 w taki sposób, że powstają reaktywne, najczęściej elektrofilowe, metabolity pośrednie (Rys.15). Co więcej, inhibitory posiadające te same grupy funkcyjne mogą inaktywować enzym według odmiennych mechanizmów (rozdział III.2.2.). Miejsce wiązania się aktywnego intermediatu z

cząsteczką cytochromu P450 zależy z jednej strony od reaktywności i trwałości samego metabolitu pośredniego, z drugiej zaś strony od struktury miejsca aktywnego enzymu, w którym taka pochodna została wygenerowana. Reaktywny intermediat może więc reagować z cząsteczką wody i opuścić miejsce aktywne enzymu jako nietoksyczny lub mniej toksyczny produkt. W innym przypadku może alkilować lub arylować resztę hemową, co powoduje destrukcję hemu lub reagować z nukleofilowymi resztami aminokwasowymi znajdującymi się w sąsiedztwie centrum aktywnego cytochromu P450. Wszystkie wymienione sytuacje prowadzą do nieodwracalnego zahamowania aktywności enzymu [Hollenberg i wsp., 2008]. Spośród grup związków hamujących aktywność izoenzymów cytochromu P450 na drodze autokatalitycznej inaktywacji (nieodwracalnie) należy wymienić alkiiny, alkeny, furany i tiofeny. Obecność amin drugo- i trzeciorzędowych oraz benzo-1,3-dioksolu jest natomiast typowa w strukturze chemicznej inhibitorów quasi-nieodwracalnych, które inaktywują enzym tworząc MIC.

□ Alkiiny (acetyleny).

Do tej grupy związków należą liczne inhibitory „mechanism-based” izoenzymów cytochromu P450, aczkolwiek z powodu wysokiej reaktywności ich metabolitów pośrednich dokładny mechanizm hamowania aktywności enzymów nie został jeszcze poznany.

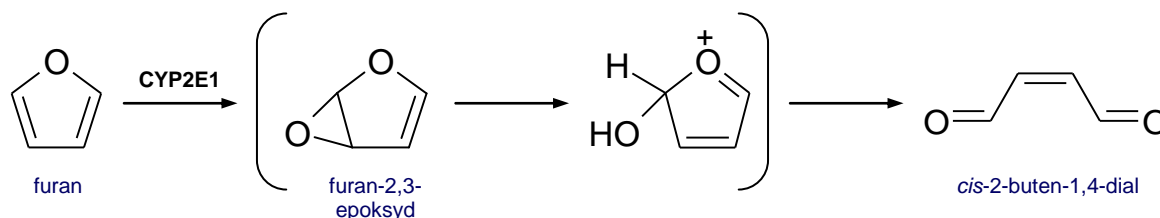


Rys.16. Proponowane mechanizmy nieodwracalnej addukcji alkinów do apoproteiny i hemu cytochromu P450 (schemat zaczerpnięty z pracy [Blobaum, 2006]).

Transfer atomu tlenu na terminalny atom węgla cząsteczki alkinu generuje pochodną, która ulega przekształceniu w reaktywny keten. Intermediat ten może ulec hydrolizie z wytworzeniem stabilnego produktu metabolizmu, kwasu karboksylowego albo reagować z resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym enzymu, co prowadzi do inaktywacji białka (szlak a). Wprowadzenie atomu tlenu na wewnętrzny atom węgla cząsteczki alkinu prowadzi, poprzez cząsteczkę oksyrenu, do powstania reaktywnego metabolitu pośredniego, który powoduje kowalencyjną modyfikację hemu (szlak b) (na podstawie [Ortiz de Montellano, 1985, 1991]).

W przypadku alkinów terminalnych utlenianych na zewnętrznym atomie węgla przyjmuje się, iż proces inaktywacji zachodzi za pośrednictwem reaktywnego ketenu, który stanowi miejsce ataku nukleofilowych atomów reszt aminokwasowych obecnych w centrum aktywnym enzymu. Wprowadzenie atomu tlenu na wewnętrzny atom węgla alkinów wewnętrznych lub terminalnych pociąga natomiast za sobą pojawienie się pochodnej oksyrenu, która powoduje alkilację hemu na atomach azotu pierścienia porfiryнового (Rys.16) [Ortiz de Montellano, 1985, 1991; Foroozesh i wsp., 1997]. Wśród leków zawierających nienasycone wiązanie potrójne węgiel-węgiel jako nieodwracalne inhibitory „mechanism-based” izoenzymu CYP3A4 zostały zidentyfikowane, m.in. 17 α -etynyloestradiol [Lin i wsp., 2002], gestoden [Guengerich, 1990] i mifepriston [He i wsp., 1999]. W grupie pochodnych alkinów spotykane są ponadto inhibitory „mechanism-based”, które powodują w pewnym stopniu odwracalną inaktywację białek P450 [Blobaum i wsp., 2005, 2006]. Zbadano, iż architektura miejsca aktywnego enzymu oraz lokalizacja i odległość kluczowych dla procesu inhibicji reszt aminokwasowych od cząsteczki inhibitora może być wyznacznikiem „odwracalności” bądź nieodwracalności MBI. Istotne znaczenie wydaje się też mieć rozmiar i chemiczny charakter samego inaktywatora. Poznanie enzymatycznych i chemicznych wymagań obserwowanej „odwracalności” MBI przyczyniłoby się do lepszego zrozumienia procesu inaktywacji izoenzymów cytochromu P450 w układach biologicznych.

□ Furany.

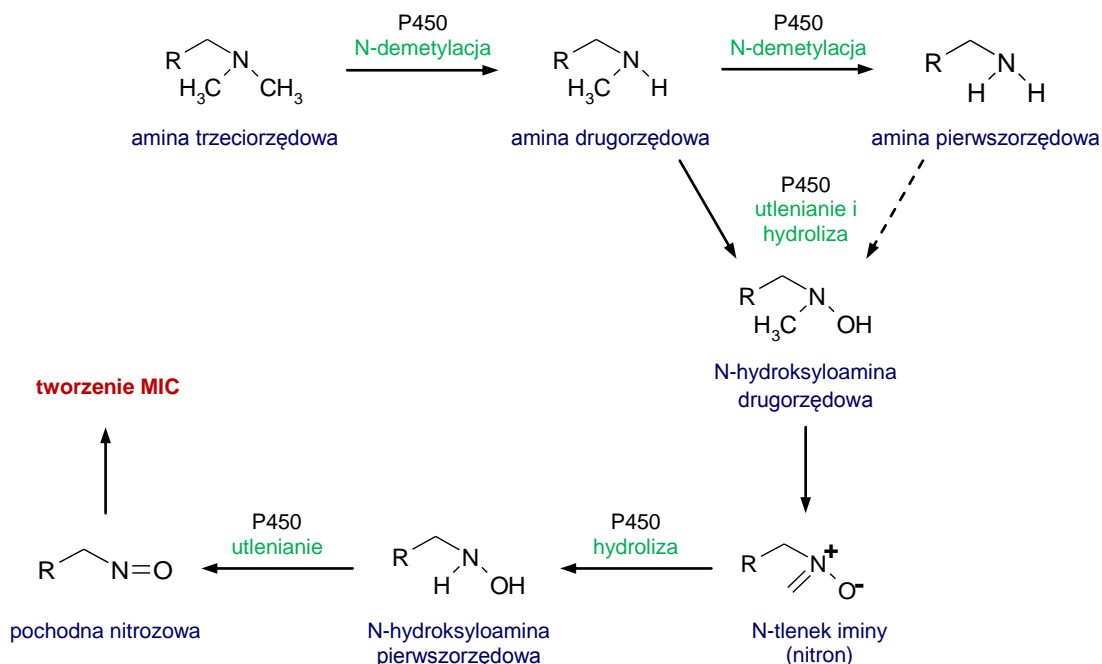


Rys. 17. Schemat katalizowanej przez CYP2E1 reakcji bioaktywacji furanu [Kalgutkar i wsp., 2007].

Pierścień furanu spotykany jest w cząsteczkach wielu leków i produktów naturalnych (furanokumaryn). Prawdopodobnie, przekształcenia w obrębie tej struktury prowadzą do metabolitów, które są odpowiedzialne za ich wysoką toksyczność (hepatotoksyczność i kancerogenność) oraz podatność na różnego rodzaju niepożądane interakcje lek-lek. Ze względu na obecność bogatego w elektrony ugrupowania aromatycznego pochodne furanu łatwo ulegają procesowi utlenienia z utworzeniem elektrofilowego metabolitu pośredniego – furan-2,3-epoksydu. Dalsze przemiany metaboliczne mogą prowadzić do otwarcia pierścienia i powstania ostatecznego produktu, jakim jest cis-2-buten-1,4-dial [Chen i wsp., 1997; Byrns i wsp., 2002]. Obydwa produkty metabolizmu furanu mają zdolność alkilacji

reszt aminokwasowych na heteroatomach. Cytochromy P450 ulegają zatem inaktywacji poprzez modyfikację ich części białkowej. W ten sposób hamowana jest, m.in. aktywność CYP1A2 przez furafilinę [Kunze i Trager, 1993], CYP2A6 przez mentofuran [Khojasteb-Bakht i wsp., 1998] oraz CYP3A4 przez L-754 394, inhibitor proteazy wirusa HIV [Lightning i wsp., 2000].

□ Alkiloaminy.



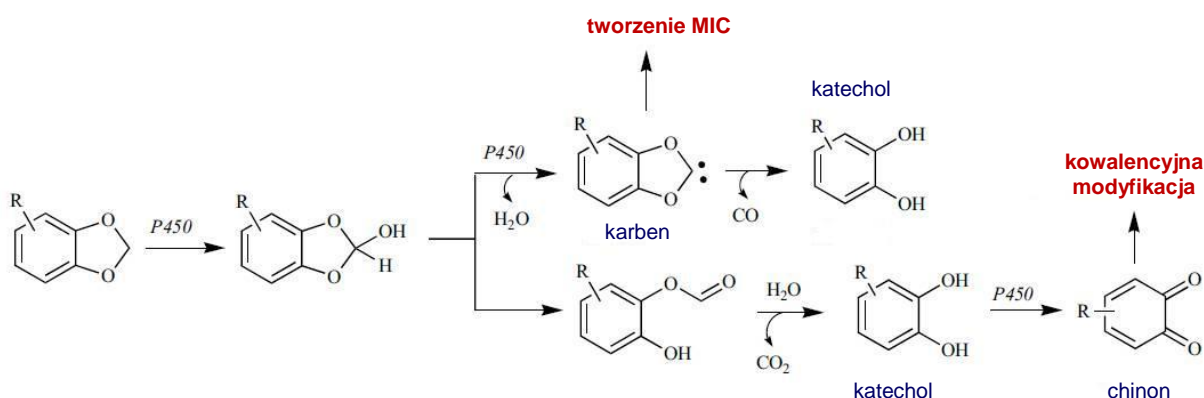
Rys.18. Schemat katalizowanych przez cytochromy P450 reakcji utleniania dialkiloaminoalkilopodstawionych związków do pochodnej nitrozowej tworzącej kompleks z jonem żelaza centrum porfiryнового białek P450 (opracowanie własne na podstawie [Riley i wsp., 2007]). Prekursorem analogu nitrozowego mogą być aminy pierwszo- lub drugorzędowe. W przypadku amin trzeciorzędowych pierwszym etapem przemian jest katalizowana przez cytochrom P450 reakcja N-dealkilacji, po której następuje utlenianie i hydroliza do N-hydroksyloaminy drugorzędowej. Produkt ten jest dalej przekształcany do N-tlenku iminy (nitronu), który ulega hydrolizie do N-hydroksyloaminy pierwszorzędowej. Podczas dwuelektronowego utleniania cytochrom P450 przekształca N-hydroksyloaminę pierwszorzędową w reaktywną pochodną nitrozową, która tworzy stabilny kompleks z jonem Fe(II) hemu cytochromu P450 [Murray, 1997].

Ugrupowanie alkiloaminowe jest elementem struktury cząsteczek wielu klas związków terapeutycznych (m.in. leków przeciwhistaminowych, leków przeciwdepresyjnych, antybiotyków makrolidowych) i związków naturalnych. Efektywność oraz skuteczność alkiloamin jako inhibitorów „mechanism-based” różnych cytochromów P450 jest natomiast bardzo zróżnicowana. Proponuje się, że aminy drugo- i trzeciorzędowe w obecności izoenzymów cytochromu P450 ulegają kilku kolejnym reakcjom dealkilacji, utleniania i hydrolizy (Rys.18). Kończącym produktem tych przemian może być pochodna nitrozowa, która poprzez tworzenie kompleksu z jonem żelaza hemu cytochromu P450 (MIC) może

odpowiadać za zahamowanie aktywności enzymu [Murray, 1997; Murray i Murray, 2003]. Jak dotąd, nie wykazano jednak jej obecności w mieszaninie reakcyjnej. Tworzenie kompleksu P450-Fe(II)-reaktywny metabolit pośredni w obecności NADPH zachodzi bardzo szybko, podczas gdy proces nieenzymatyczny przebiega powoli. Istnieje także pewna specyficzność w kompleksowaniu metabolitu pośredniego przez niektóre białka P450: nie wszystkie izoenzymy cytochromu P450 reagują z reaktywnym intermedialem z jednakową wydajnością. Przykłady związków zawierających ugrupowanie alkiloaminowe, których produkty pośrednie zdolne są do tworzenia koordynacyjnych kompleksów z jonem żelaza grupy prostetycznej cytochromu P450, szczególnie CYP3A4, to werapamil, diltiazem [Yeo i Yeo, 2001], troleandomycyna i erytromycyna [Periti i wsp., 1992; Yamazaki i Shimada, 1998].

□ Benzo-1,3-dioksole (metylenodioksyfenyle).

Związki zawierające ugrupowanie benzo-1,3-dioksolu często hamują aktywność cytochromów P450 poprzez tworzenie MIC z enzymem. Przykładem takich inhibitorów izoenzymów CYP3A4 i CYP2D6 są odpowiednio: paroksetyna, selektywny inhibitor zwrotnego wychwyty serotoniny, oraz tadalafil, inhibitor fosfodiesterazy-5 [Ring i wsp., 2005; Bertelsen i wsp., 2003]. Mechanizm inaktywacji białek P450 przez pochodne benzo-1,3-dioksolu nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony, istnieją wszakże przesłanki, iż to reaktywny i elektrofilowy karben, powstający w wyniku usunięcia atomu wodoru z metylenowego atomu węgla lub eliminacji cząsteczki wody z pochodnej hydroksymetylenowej, tworzy stabilny kompleks z atomem żelaza hemu białka cytochromowego (Rys.19). Podobnie, jak w przypadku alkiloamin, kompleks ten wykazuje charakterystyczne maksimum absorpcji w widmie UV-vis przy około 455 nm.



Rys.19. Schemat reakcji prowadzących do inaktywacji cytochromu P450 przez związki zawierające benzo-1,3-dioksole [Kalgutkar i wsp., 2007].

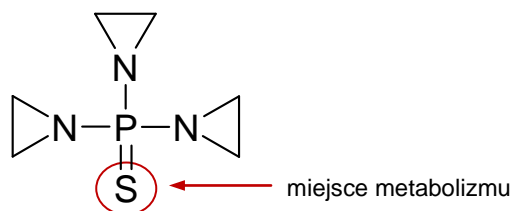
Drugi szlak przemian metabolicznych pochodnych benzo-1,3-dioksolu prowadzi do powstania, poprzez katechol, *orto*-chinonu, który ze względu na właściwości elektrofilowe może reagować z nukleofilowymi resztami aminokwasowymi makromolekuł komórkowych, np. białek P450. Tę alternatywną drogę inaktywacji enzymu wykorzystują, m.in. saflor i 3,4-metylenodiodksymetamfetamina (MDMA, ekstaza) [Bolton i wsp., 1994; Wu i wsp., 1997].

III.2.3.2. Przykłady leków przeciwnowotworowych indukujących inhibicję „mechanism-based” cytochromów P450.

Pogłębiająca się wiedza na temat rodziny cytochromów P450 zaowocowała licznymi publikacjami dotyczącymi hamowania ich aktywności przez liczne chemoterapeutyki, także przeciwnowotworowe. Niektóre z nich okazały się inhibitorami „mechanism-based” wybranych izoenzymów cytochromu P450.

□ Tio-TEPA.

Przykładem inhibitora „mechanism-based” izoenzymu **CYP2B6** jest pochodna azyrydyny o działaniu przeciwnowotworowym, tio-TEPA (thiotepum, trietylenotiofosfamid). Związek ten powoduje zmniejszenie wysięków w przypadku nowotworów piersi, jajnika, pęcherza moczowego i szpiku kostnego.



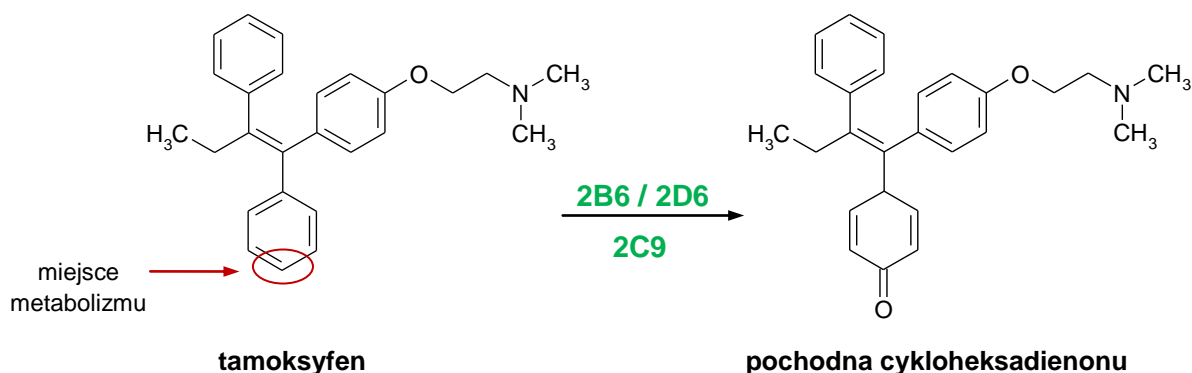
Rys.20. Struktura chemiczna tio-TEPA.

Czynną farmakologicznie postacią leku jest TEPA (trietylenofosfamid). W organizmie człowieka 80% tego metabolitu powstaje na drodze reakcji enzymatycznej katalizowanej przez izoenzymy CYP2B6 i CYP3A4 [Maanen i wsp., 2000]. Tio-TEPA jest najczęściej stosowany w terapii wielolekowej w kombinacji z dwoma innymi chemoterapeutykami o działaniu alkilującym, cyklofosfamidem i cisplatyną. Cyklofosfamid w organizmie jest utleniany przez oksygenazy wątrobowe do aktywnego 4-hydroksycyklofosfamidenu pozostającego w równowadze ze związkiem o strukturze aldehydowej. Badania wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych wykazały, że w obecności tio-TEPA następuje hamowanie przemiany cyklofosfamidenu do aktywnego metabolitu [Jacobson i wsp., 2002]. Tio-TEPA okazał się specyficznym inhibitorem ludzkiego izoenzymu CYP2B6. Inhibicja ta

jest nieodwracalna, gdyż utrata aktywności enzymu była obserwowana nawet po usunięciu inhibitora z mieszaniny reakcyjnej. Następnie wykazano zależność inhibicji od stężenia tio-TEPA, od czasu inkubacji związku z enzymem i od obecności NADPH w środowisku reakcji, czyli charakterystyczne cechy inhibicji „mechanism-based”. Prawdopodobny mechanizm inhibicji CYP2B6 przez tio-TEPA polega na nieodwracalnej destrukcji hemu przez czynny metabolit, TEPA [Richter i wsp., 2005; Jacobson i wsp., 2002]. Tio-TEPA, jako efektywny inhibitor „mechanism-based” cytochromu P450 2B6, nieustannie pozostaje przedmiotem wielu badań klinicznych.

□ Tamoksyfen.

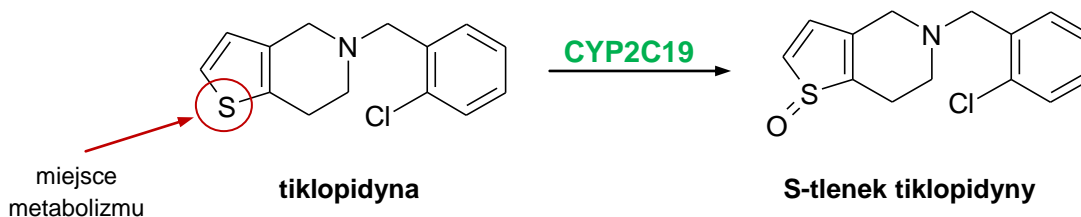
Tamoksyfen (tamoxifen) to syntetyczny lek o działaniu antyestrogenowym, stosowany głównie w terapii nieoperacyjnego raka sutka. Stanowi on poza tym czynnik prewencyjny dla kobiet wykazujących zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór piersi. Formą farmakologicznie czynną tamoksyfenu jest jego pochodna 4-hidroksy. Spośród wielu różnych białek P450, ważnych w procesie aktywacji tego proleku, reakcję 4-hydroksylacji katalizują CYP3A5 oraz CYP3A7. Z kolei izoenzymy **CYP2B6**, **CYP2D6** i **CYP2C9** przekształcają tamoksyfen do reaktywnego cykloheksadienonu, który następnie wiąże się kowalencyjnie z apoproteiną hamując nieodwracalnie aktywność tych enzymów [Sridar i wsp., 2002; Notley i wsp., 2005].



Rys.21. Struktura chemiczna tamoksyfenu i reaktywnego metabolitu pośredniego.

□ Tiklopidyna.

Tiklopidyna jest lekiem o bardzo wybiórczym działaniu hamującym agregację płytek krwi. Badania z użyciem ludzkich rekombinantowych enzymów cytochromu P450 wykazały, że związek ten jest selektywnym inhibitorem „mechanism-based” izoenzymu **CYP2C19**.



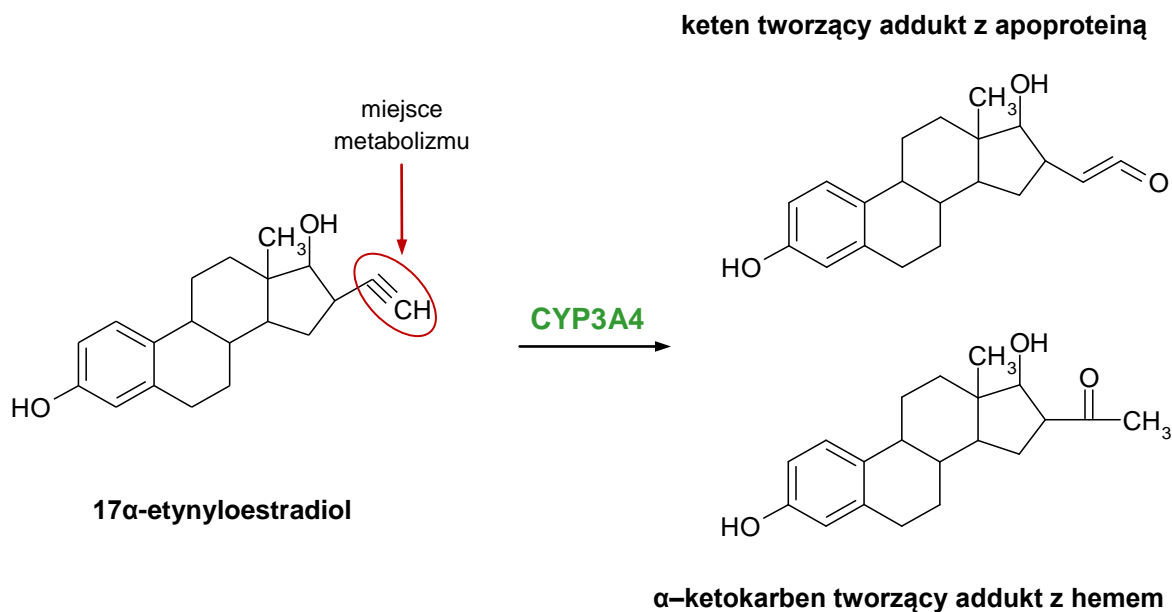
Rys.22. Struktura chemiczna ticlopidyny i reaktywnego metabolitu pośredniego.

Utlenienie ticlopidyny w pierścieniu tiofenowym przez CYP2C19 prowadzi do utworzenia reaktywnego metabolitu, S-tlenku ticlopidyny (Rys.22). Badania spektroskopowe pozwoliły stwierdzić, że wiąże się on nieodwracalnie z częścią białkową enzymu. Jednocześnie obserwuje się znaczące zahamowanie aktywności enzymu zależne od czasu inkubacji, stężenia ticlopidyny i obecności NADPH. Spełnione są więc kryteria chemiczne i kinetyczne MBI. Jednakże, gdy jednocześnie doda się do mieszaniny reakcyjnej naturalny substrat CYP2C19, omeprazol, stopień inaktywacji enzymu obniża się. Efekt ten świadczy o tym, że zanim nastąpił cykl katalityczny cytochromu P450, następowała na drodze kompetycji konkurencja potencjalnego inhibitora z substratem o miejsce wiązania się w centrum aktywnego enzymu. Obecność glutationu nie zmieniła natomiast stopnia zahamowania aktywności enzymu [Duong-Ha i wsp., 2001].

□ 17 α -Etynyloestradiol (EE).

Ponad 50% wszystkich leków dostępnych na rynku jest metabolizowanych przez enzymy z podrodziny CYP3A cytochromów P450, której najważniejszym przedstawicielem jest izoenzym CYP3A4 [Rendic i Di Carlo, 1997]. Uczestniczy on w biotransformacji większości leków, których szlak metaboliczny jest znany. CYP3A4 jest enzymem o szerokim spektrum specyficzności substratowej. Substraty tego enzymu mogą być zarówno induktorami, jak i inaktywatorami jego aktywności.

Jednym z inhibitorów „mechanism-based” enzymu **CYP3A4** jest 17 α -etynyloestradiol (EE), główny składnik wielu doustnych środków antykoncepcyjnych. Związek ten powoduje nieodwracalną inaktywację enzymu na dwa sposoby. Za modyfikację apoproteiny odpowiedzialny jest reaktywny keten, zaś za destrukcję hemu α -ketokarben (Rys.23). Dowodów na mechanizm MBI dostarczyły, m.in. analiza SDS-PAGE, metoda oparta na określeniu stechiometrii wiązania inhibitora z enzymem (wynik 1:1) oraz techniki spektrofotometryczne [Lin i wsp., 2002].



Rys.23. Struktura chemiczna 17α-etynyloestradiolu (EE) i reaktywnych metabolitów pośrednich.

III.2.4. Kliniczne znaczenie inhibicji „mechanism-based” cytochromów P450.

Inhibicja, jak również indukcja i aktywacja enzymów metabolizujących to procesy będące główną przyczyną występowania ważnych klinicznie, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych oddziaływań pomiędzy lekami (DDIs). W praktyce klinicznej niektóre leki korzystniej jest podawać razem w celu spotęgowania ich działania, jednakże pewne interakcje pomiędzy nimi mogą być niezamierzone i szkodliwe. Stąd, niezmiernie ważnym zagadnieniem pozostaje przewidywanie DDIs w trakcie prowadzenia prac badawczo-wdrożeniowych nowych leków.

Izoenzymy cytochromu P450, zlokalizowane głównie w komórkach wątroby i jelita cienkiego, to ważna grupa enzymów metabolizujących, dla których dokładnie poznano mechanizmy hamowania ich aktywności. Ze względu na kluczową rolę cytochromów P450 w metabolizmie leków inaktywacja ich aktywności katalitycznej nierzadko prowadzi do niekorzystnych reakcji leków i złożonych DDIs. Niebezpieczne dla organizmu DDIs są częściej spowodowane działaniem inhibitorów nieodwracalnych „mechanism-based”, niż inhibitorów odwracalnych cytochromów P450, ponieważ aktywność nieodwracalnie zainaktywowanego enzymu może przywrócić tylko enzym zsyntetyzowany *de novo* [Zhou i Zhou, 2009]. Kliniczne następstwa inhibicji „mechanism-based” (MBI) poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 zależą, m.in. od aktywności farmakologicznej zarówno samych leków, jak i ich metabolitów. Gdy dany lek jest bardziej aktywny od swojego metabolitu, zahamowanie jego metabolizmu spowoduje wzrost stężenia w cytoplazmie, zatem wzrośnie nie tylko wywoływany przez niego efekt terapeutyczny, ale również

toksyczny. W sytuacji odwrotnej, gdy aktywniejszy jest metabolit albo lek jest prolekiem, w wyniku inaktywacji jego metabolizmu obniży się jego skuteczność. Obserwowane DDIs są zatem konsekwencją zmian zachodzących w metabolizmie leku. Jednym z wyzwań współczesnej medycyny jest więc identyfikacja leków wywołujących MBI cytochromów P450.

Znaczna część poznanych dotychczas wzajemnych oddziaływań lek-lek spowodowana jest działaniem inhibitorów „mechanism-based” izoenzymu CYP3A4, wykazującego największe zaangażowanie w metabolizmie powszechnie stosowanych chemoterapeutyków [Zhou i wsp., 2007]. Poniżej przedstawiam kilka przykładów. 17 α -Etynyloestradiol to znany inhibitor „mechanism-based” izoenzymu CYP3A4, jak również inhibitor odwracalny CYP2C19. Podawanie tego syntetycznego estrogeny wspólnie z selegiliną, lekiem przeciwdepresyjnym będącym selektywnym inhibitorem odwracalnym monoaminooksydazy B (MAO-B) oraz substratem CYP2B6 i CYP2C19, powoduje zwiększenie skuteczności ostatniego z nich [Laine i wsp., 1999]. Odnotowano także przypadki, w których terapia stosowanym w chorobach serca werapamilem, inhibitorem nieodwracalnym CYP3A4, w połączeniu ze zmniejszającą stężenie lipidów we krwi simwastatyną, substratem izoenzymu CYP3A4, była przyczyną ostrej miopatii mięśni szkieletowych [Neuvonen i wsp., 2006]. Niebezpieczne dla organizmu interakcje zaobserwowano także, m.in. podczas jednoczesnego podawania antybiotyków makrolidowych, np. erytromycyny i klarytromycyny, z lekami metabolizowanymi przez CYP3A4: terfenadyną, astemizolem czy pimozydem [Honig i wsp., 1992; Dresser i wsp., 2000]. Erytromycyna i klarytromycyna hamując nieodwracalnie aktywność CYP3A4 obniżały tempo metabolizmu innych leków, zwiększając tym samym ich stężenie w surowicy. Prowadziło to do wystąpienia u pacjentów niemierności pracy serca z objawami, takimi jak częstoskurcz komorowy, migotanie komór i zaburzeń rytmu serca typu *Torsade de pointes*⁹.

Podsumowując, wzajemne interakcje leków mogą obniżyć skuteczność stosowanych chemoterapeutyków, wywołać niespodziewane działania niepożądane lub zwiększyć efektywność poszczególnych leków. W związku z tym, obserwacja inhibicji aktywności izoenzymów cytochromu P450 *in vitro* na podstawie badań ich form rekombinantowych, jest bardzo użyteczna w identyfikacji potencjalnych oddziaływań pomiędzy lekami, również w przypadku przeciwnowotworowego związku C-1311. Należy jednak podkreślić, że interakcje te nie muszą koniecznie zachodzić w warunkach *in vivo* ponieważ istnieją międzypersonalne różnice w sposobie biotransformacji leków, na które mają wpływ warunki środowiskowe, wiek, płeć a przede wszystkim polimorfizm genetyczny.

⁹ *Torsade de pointes* – wielokształtny częstoskurcz komorowy prowadzący zwykle do śmierci, jeśli nie zostaną podjęte zaawansowane czynności reanimacyjne. Termin wprowadził F. Dessertenne w 1966 roku [Dessertenne, 1966].

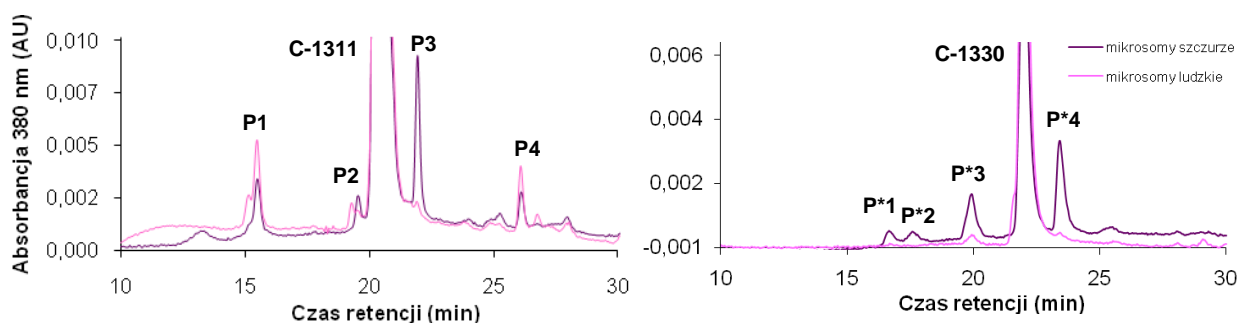
IV. OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ.

Wstęp – metabolizm C-1311 i C-1330 wobec enzymów mikrosomalnych.

W ramach prac zespołu naukowego Profesora Konopy nad mechanizmem działania pochodnych imidazokrydonu, zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym, prowadzone są badania nad ich metaboliczną transformacją w różnych układach enzymatycznych. Przeprowadzone dotychczas badania pozwoliły m.in. poznać przebieg metabolizmu związku C-1311 wobec peroksydaz oraz szczurzych i ludzkich enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, a także wyizolować i określić struktury chemiczne wybranych metabolitów [Mazerska i wsp., 2003; Wiśniewska i wsp., 2007].

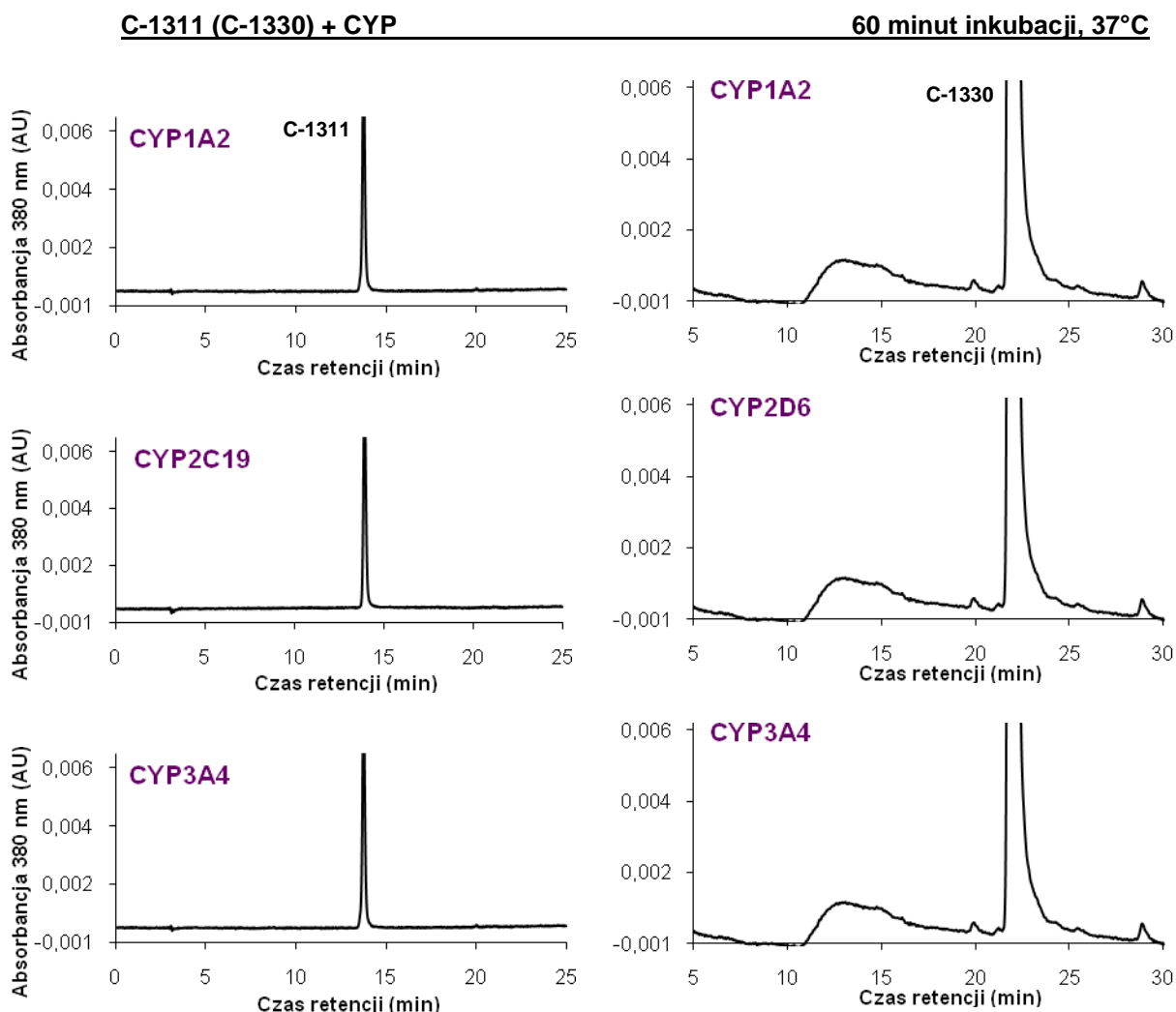
Mikrosomy są to zamknięte pęcherzyki błony retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby zawierające szereg enzymów pierwszej i drugiej fazy metabolizmu, w tym kompleks enzymatyczny monooksygenazy obejmujący cytochrom P450 i jego NADPH-zależną reduktazę [Okita i Masters, 1998]. Ze względu na istnienie różnic w wydajności procesu biotransformacji między człowiekiem a różnymi gatunkami zwierząt porównano reaktywność C-1311 i jego 8-metoksyowego analogu, związku C-1330, wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i człowieka, co ilustruje Rys.24. Obserwowane różnice w zdolności badanych pochodnych imidazokrydonu do transformacji dotyczyły głównie stężenia, a nie liczby powstających metabolitów. Stąd enzymy metabolizujące zawarte w mikrosomach szczurzych przyjęto w prezentowanej pracy jako model do badania i przewidywania przemian metabolicznych związków w organizmie człowieka, chociaż w wielu wypadkach zastosowano enzymy rekombinantowe pochodzenia ludzkiego.

C-1311 (C-1330) + frakcja mikrosomalna komórek wątroby 60 minut inkubacji, 37°C



Rys.24. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1311 (C-1330), 2 mM NADPH i 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby [chromatograf HPLC Waters Millennium].

Spośród licznych enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby najbardziej zaangażowane w reakcje biotransformacji substancji obcych są izoenzymy cytochromu P450. Około 95% leków przyjmowanych obecnie przez pacjentów jest metabolizowanych przez tę grupę enzymów [Kashuba i Bertino, 2001]. Kolejnym krokiem badań nad metabolizmem pochodnych imidazoakrydonu była więc próba określenia, które izoenzymy cytochromu P450 biorą udział w ich transformacjach metabolicznych. W tym celu związki inkubowałam w obecności, otrzymanych w komórkach *Escherichia coli*, wybranych rekombinantowych ludzkich białek P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4. Nie zaobserwowałam jednakże istotnej reaktywności C-1311 i C-1330 wobec żadnego z zastosowanych izoenzymów cytochromu P450, niezależnie od aktywności towarzyszącej im NADPH-reduktazy cytochromu P450 (Rys.25).



Rys.25. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1311 (C-1330), 1 mM NADPH i 0,2 μ M wybranych rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450 [chromatograf HPLC Waters Breeze (analiza przemian C-1311) i Millennium (analiza przemian C-1330)].

Biorąc pod uwagę wspomnianą wcześniej reaktywność obu związków obserwowaną po inkubacji z mieszaniną enzymów mikrosomalnych wynik przeprowadzonych badań był zaskakujący. W konsekwencji doprowadził on do sformułowania kilku możliwych hipotez roboczych:

- Można przypuszczać, że C-1311 i C-1330, ze względu na swoją strukturę chemiczną, nie stanowią substratu dla żadnego z badanych izoenzymów cytochromu P450. Jest zatem możliwe, że inne, niż cytochromy P450, enzymy metabolizujące, obecne w mieszaninie białek mikrosomalnych komórek wątroby, pełnią ważną rolę w metabolizmie badanych pochodnych imidazoakrydonu.
- Istnieje prawdopodobieństwo, że metabolizm zachodzący poza komórkami wątroby może odgrywać istotną rolę w biotransformacji obu związków.
- Można sądzić, iż badane związki, w postaci natywnej, a prawdopodobnie w formie zmetabolizowanej (aktywnej), mogą wiązać się z cząsteczką niektórych enzymów cytochromowych i hamować ich aktywność katalityczną.

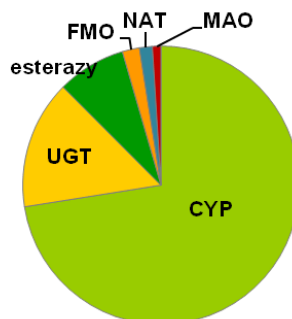
Przedstawione założenia zweryfikowałam w trakcie badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy.

IV.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec różnych enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Podjmując próbę weryfikacji pierwszej z postawionych hipotez dążyłam do określenia, które, poza cytochromami P450, grupy enzymów metabolizujących pierwszej i drugiej fazy metabolizmu biorą udział w transformacjach C-1311 i C-1330 obserwowanych wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Swoją uwagę skupiałam głównie na monooksygenazie flawinowej (ang. *flavin monooxygenase* – FMO) i transferazie glukuronianowej (ang. *UDP-glucuronosyltransferase* – UGT), które, podobnie jak cytochromy P450, stanowią ważny składnik frakcji mikrosomalnej komórek wątroby (Rys.26). Badania dla analogu strukturalnego C-1311, związku C-1330, posiadającego grupę metoksyłową zamiast hydroksyłowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, miały na celu ustalenie potencjalnych właściwości substratowych tej grupy związków wobec różnych enzymów metabolizujących. Określenie różnic w metabolizmie C-1311 i C-1330 mogłoby też pomóc w wyjaśnieniu ich odmiennej aktywności biologicznej.

Analizę przebiegu reakcji metabolicznej biotransformacji badanych związków prowadziłam techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z udziałem detektora wielodiodowego (RP-HPLC-DAD). Analizy chromatograficznej składu mieszanin reakcyjnych dokonywałam bezpośrednio po zmieszaniu wszystkich składników

mieszaniny reakcyjnej (start reakcji) oraz po odpowiednich czasach inkubacji. W celu określenia struktur chemicznych produktów metabolizmu badanych związków powstających wobec wybranych układów enzymatycznych zastosowałam sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas (HPLC/ESI-MS).



Rys.26. Udział głównych enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby w metabolizmie ksenobiotyków w organizmie człowieka; NAT – N-acetylotransferaza, MAO – monoaminooksydaza (opracowanie własne na podstawie [Guengerich, 2006]).

IV.1.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów monooksygenazy flawinowej, FMO.

Obserwacji przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec monooksygenaz flawinowych dokonałam kolejno dla reakcji pochodnych imidazoakrydonu wobec trzech różnych rekombinantowych ludzkich izoenzymów FMO, otrzymanych w systemie ekspresji bakulowirus-komórki owadzie, a mianowicie: FMO1, FMO3 i FMO5.

IV.1.1.1. Ogólne informacje o monooksygenazach flawinowych.

Monooksygenazy flawinowe (EC 1.14.13.8), FMO, należą do dużej grupy białek enzymatycznych określanych jako flawoenzymy, które są biokatalizatorami biorącymi udział w szeregu różnorodnych procesów biologicznych, takich jak: produkcja energii, biosynteza, utlenianie, redukcja, reakcje nie redoksove, biodegradacja, detoksykacja, zwijanie białek, naprawa DNA czy apoptoza. Flawoenzymy działają selektywnie i bardzo wydajnie. Ich kofaktorami są mononukleotyd flawinowy (FMN), bądź dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), najczęściej niekowalencyjnie związany z białkiem [Joosten i van Berkel, 2007].

Izoenzymy FMO są ważnym elementem w metabolizmie i detoksykacji ksenobiotyków, a zwłaszcza ważnych klinicznie leków o właściwościach lipofilowych. Utleniają one przede wszystkim nukleofilowe związki zawierające w swojej strukturze heteroatom, głównie atom azotu i siarki. W wyniku przemian katalizowanych przez FMO powstają metabolity zawierające polarne grupy funkcyjne, najczęściej lepiej rozpuszczalne w wodzie [Cashman,

2005; Eswaramoorthy i wsp., 2006]. Substratami dla FMO są, m.in.: S-nikotyna, cymetydyna, klozapina [Cashman, 2005], ranitydyna [Chung i wsp., 2000], tamoksyfen [Krueger i wsp., 2006], trimetyloamina (TMA) [Lang i wsp., 1998]. Cenną właściwością FMO jest to, że jej aktywność, w przeciwieństwie do aktywności cytochromów P450, nie jest indukowana, ani zwykle nie ulega hamowaniu przez leki, dzięki czemu niekorzystne farmakokinetycznie oddziaływania lek-lek są w przypadku związków metabolizowanych przez ten enzym minimalizowane [Cashman, 2005].

U ssaków występuje zazwyczaj rodzina pięciu genów kodujących monooksygenazy flawinowe. Geny człowieka nazwano *Fmo1-5* a produkty ich ekspresji (białka) oznaczono odpowiednio od FMO1 do FMO5 oraz dodatkowo zidentyfikowano sześć pseudogenów (*Fmo6P-11P*) [Cashman, 2004]. Najważniejsze u ludzi wydają się być izoformy FMO1 oraz FMO3. FMO1 obecna jest w nerkach i wątrobie płodowej, ale nie jest spotykana w wątrobie osób dorosłych. Z kolei wytwarzanie FMO3 u ludzi jest indukowane zaraz po urodzeniu, przy czym znacznie więcej tego enzymu występuje w wątrobie osobników dorosłych [Yeung, 2007]. Za wyjątkiem FMO5, której gen kodujący osiąga poziom ekspresji porównywalny do *Fmo3*, nie zidentyfikowano znaczących ilości innych izoform FMO w ludzkiej wątrobie [Cashman, 2004].

IV.1.1.2. Opracowanie warunków reakcji związku C-1311 z FMO.

Opierając się na danych literaturowych innych autorów [Lang i wsp., 1998; Chung i wsp., 2000; Krueger i wsp., 2006], jak również korzystając z wcześniej opracowanych warunków reakcji C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby i rekombinantowymi izoenzymami cytochromu P450 [Chrapkowska i wsp., 2005; Wiśniewska i wsp., 2007], w początkowym etapie badań określiłam optymalne warunki reakcji C-1311 z FMO, stosując izoenzym FMO1, charakteryzujący się pośrednią aktywnością spośród trzech wybranych do badań izoenzymów FMO.

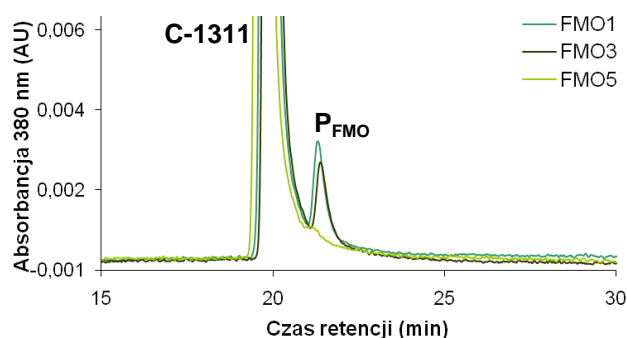
Wstępne reakcje biotransformacji prowadziłam stosując stałe stężenie C-1311 (0,1 mM) a zmieniając stężenie enzymu i NADPH. Przy stężeniu FMO1 0,2 mg/ml a NADPH 0,065 mM na obrazie chromatograficznym zaobserwowałam po 30 minutach inkubacji jeden pik metabolitu o niewielkiej intensywności. Dla uzyskania wyraźniejszego pik metabolitu w kolejnym doświadczeniu zastosowałam 2,5 razy większe stężenie enzymu. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność izoenzymu FMO5 wobec standardowego substratu jest ponad czterokrotnie niższa niż FMO1 (informacja producenta – BD Biosciences, USA), dla porównania wyników z otrzymanymi dla FMO5, w przypadku FMO1 podwyższyłam stężenie enzymu jeszcze dwukrotnie. Zdecydowałam się również zwiększyć stężenie kofaktora aby mieć pewność, że w żadnej reakcji nie jest on czynnikiem limitującym jej przebieg.

Ostatecznie, badania przeprowadziłam przy następującym składzie mieszaniny reakcyjnej: C-1311 – 0,1 mM, FMO1/3/5 – 1 mg/ml, NADPH – 0,3 mM.

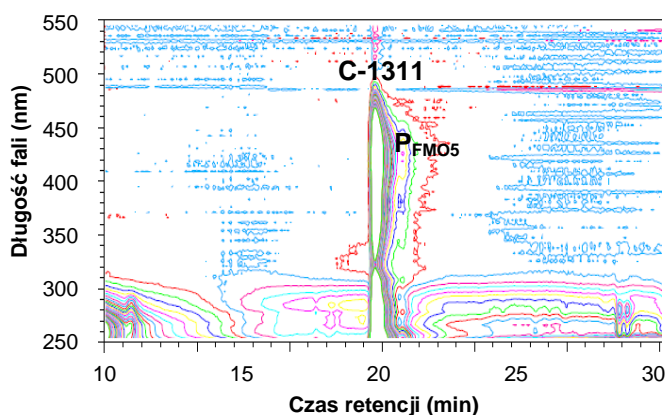
IV.1.1.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 wobec FMO.

Jak przedstawia chromatogram na Rys.27A., FMO1 i FMO3 przekształciły C-1311 do jednego produktu (P_{FMO}), o czasie retencji zbliżonym do czasu retencji substratu. W wybranych warunkach reakcyjnych intensywności uzyskanych pików metabolitu były stosunkowo wysokie. Również reakcja C-1311 wobec FMO5 wskazała obecność pojedynczego, choć znikomej intensywności, pików produktu (Rys.27B). Czterokrotne podwyższenie stężenia FMO5 nie spowodowało wzrostu intensywności tego pików a modyfikacje składu fazy ruchomej podjęte by rozdzielić pik metabolitu od pików substratu nie przyniosły oczekiwanego efektu.

A. C-1311 + FMO1/3/5 90 minut inkubacji, 37°C



B. C-1311 + FMO5 90 minut inkubacji, 37°C



Rys.27. (A) Liniowy i (B) poziomicowy obraz chromatograficzny składu mieszanin reakcyjnych po 90 minutach inkubacji (37°C) 0,1 mM C-1311, 0,3 mM NADPH i 1 mg/ml FMO1/3/5 [chromatograf HPLC Waters Millennium].

Podsumowując ten etap badań, można stwierdzić, że pochodna imidzoakrydonu C-1311 ulega transformacji metabolicznej głównie wobec dwóch stosowanych

rekombinantowych izoenzymów FMO, FMO1 i FMO3. Co więcej, identyczność czasów retencji oraz widm UV-vis każdego z powstałych produktów wskazują, że można je zidentyfikować jako jeden metabolit (P_{FMO}).

Dla porównania aktywności FMO1 i FMO3 wobec badanych pochodnych imidazoakrydonu wyznaczałam stopień przemiany substratu (y), na podstawie pola powierzchni pod jego pikiem, i ilustrowałam za pomocą wykresu słupkowego. Korzystałam z następującej zależności:

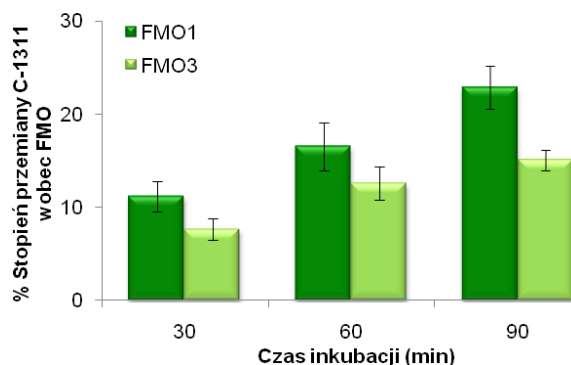
$$y = 100 \cdot (1 - a/b) [\%] \quad (\text{wzór 1})$$

gdzie:

a – pole powierzchni pod pikiem substratu po odpowiednim czasie trwania reakcji [$\mu V \cdot s$],

b – pole powierzchni pod pikiem substratu na starcie reakcji [$\mu V \cdot s$].

Z informacji podanych przez producenta (BD Biosciences, USA) wynika, że aktywność izoenzymu FMO3 wobec standardowego substratu jest niemal dwukrotnie wyższa niż aktywność izoenzymu FMO1. Wyniki badań przeprowadzonych dla związku C-1311 odwracają tę zależność (Rys.28). Dla 90 minut inkubacji stopień przereagowania substratu w mieszaninie reakcyjnej zawierającej FMO1 wyniósł około 23% a FMO3 około 15%, co daje w przybliżeniu stosunek równy 1,5. W obu przypadkach procentowy stopień przemiany C-1311 wobec monooksygenaz flawinowych wzrastał liniowo z czasem reakcji.



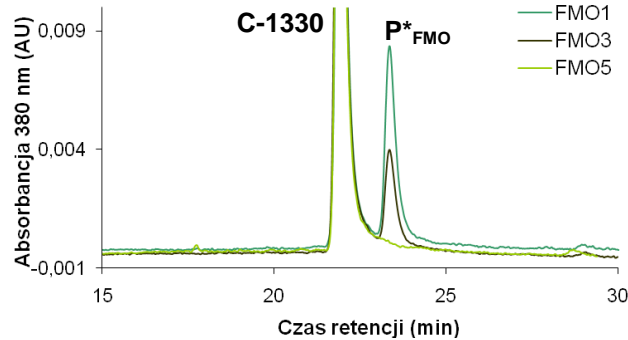
Rys.28. Porównanie stopnia przereagowania związku C-1311 wobec FMO1 i FMO3 w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.1.1.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 wobec FMO.

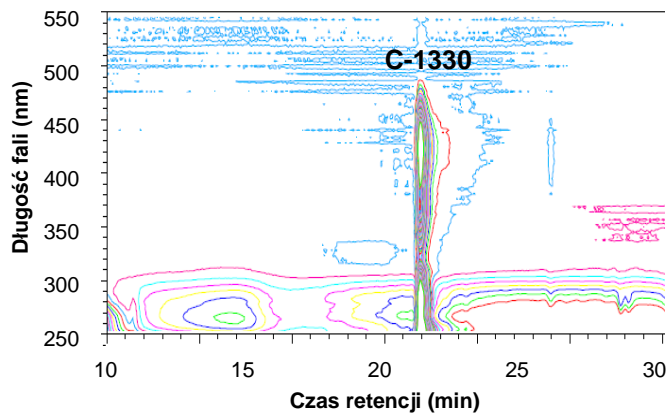
Obraz chromatograficzny przemian C-1330, zarówno wobec FMO1, jak i FMO3, przedstawia pik substratu oraz wyraźny pik metabolitu (P_{FMO}^*), którego czas retencji jest o około 2 minuty dłuższy niż czas retencji pików substratu (Rys.29A). Porównując czasy retencji oraz widma UV-vis otrzymanych produktów można przypuszczać, że mamy do czynienia z tym samym metabolitem C-1330. Różnica dotyczy tylko intensywności pików – produktu

powstającego z udziałem FMO1 było więcej. Stosując identyczne jak w przypadku FMO1 i FMO3 warunki reakcji nie zaobserwowałam natomiast wyraźnej przemiany C-1330 w obecności FMO5 (Rys.29B).

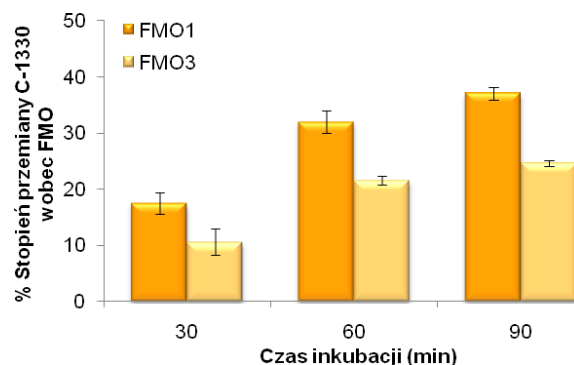
A. **C-1330 + FMO1/3/5** **90 minut inkubacji, 37°C**



B. **C-1330 + FMO5** **90 minut inkubacji, 37°C**



Rys.29. (A) Liniowy i (B) poziomicowy obraz chromatograficzny składu mieszanin reakcyjnych po 90 minutach inkubacji (37°C) 0,1 mM C-1330, 0,3 mM NADPH i 1 mg/ml FMO1/3/5 [chromatograf HPLC Waters Millennium].

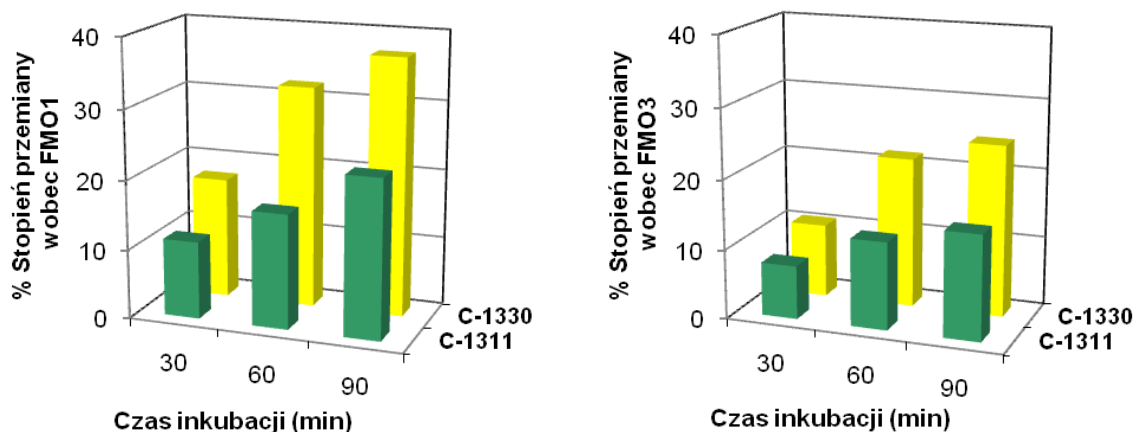


Rys.30. Porównanie stopnia przereagowania związku C-1330 wobec FMO1 i FMO3 w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Podobnie jak dla związku C-1311, procentowy stopień przemiany C-1330 wobec FMO1 był wyższy niż wobec FMO3 (odpowiednio około 37% i 25% po 90 minutach inkubacji) i wzrastał stopniowo wraz z postępem reakcji. Ponad dwukrotny wzrost stopnia przereagowania substratu nastąpił pomiędzy 30 a 60 minutą inkubacji. Po 60 i 90 minutach trwania reakcji wzrost ten był już łagodniejszy. Przedstawione relacje ilustruje wykres słupkowy na Rys.30.

Porównanie stopnia przemiany C-1311 i C-1330 wobec izoenzymów FMO.

Wyniki opisanych powyżej badań dostarczyły informacji, że stopień przereagowania C-1330 dla każdego czasu inkubacji był w przybliżeniu dwukrotnie wyższy niż miało to miejsce dla C-1311 (Rys.31). Oba związki okazały się być lepszymi substratami dla FMO1 niż FMO3. Z kolei przemiany związku C-1311 wobec FMO5 były znacznie mniej intensywne niż z udziałem pozostałych badanych izoenzymów FMO, a transformacje C-1330 nie zachodziły w ogóle.



Rys.31. Porównanie stopnia przereagowania związków C-1311 i C-1330 wobec FMO1 i FMO3 w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.

IV.1.1.5. Identyfikacja produktu reakcji C-1311 i C-1330 z FMO.

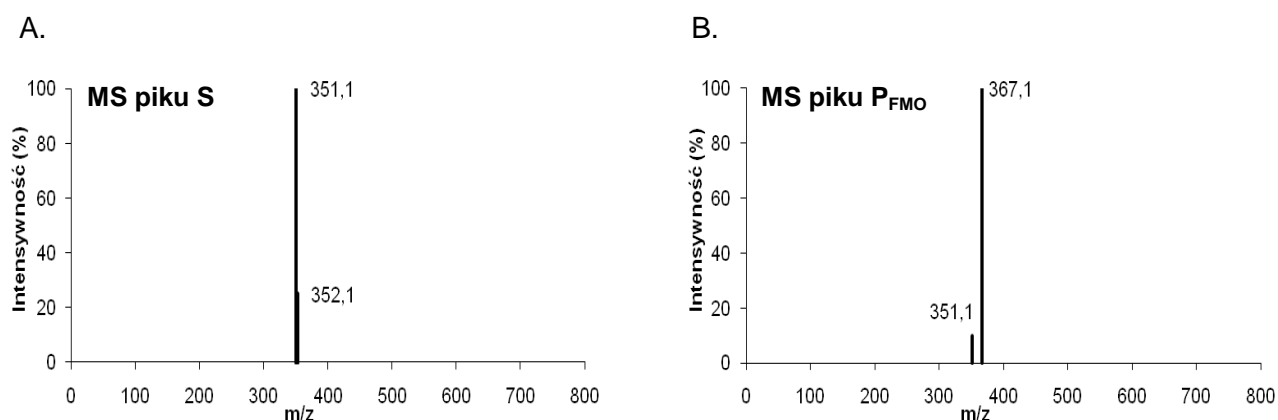
W kolejnym etapie pracy podjęłam próbę określenia struktury chemicznej produktu metabolicznej transformacji badanych pochodnych imidzoakrydonu powstających pod wpływem FMO. W tym celu zarejestrowałam widmo masowe (MS) głównego pikę produktu powstającego podczas podziału metodą chromatografii cieczowej standardowych mieszanin reakcyjnych stosując technikę ESI-MS. Dla każdego z badanych związków analizę rozpocząłam od pikę odpowiadającego substratowi. Badania produktów reakcji C-1311 i C-1330 wobec FMO zostały przeprowadzone w Laboratorium Chromatografii Cieczowej

Katedry Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Kot-Wasik.

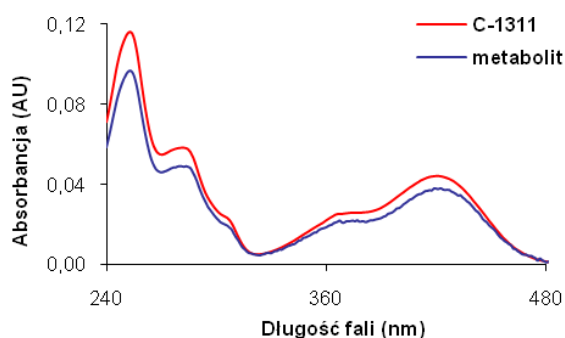
□ Produkt reakcji C-1311 z FMO.

Opierając się na wcześniejszym wniosku, iż podczas przemian metabolicznych C-1311 wobec wszystkich badanych izoenzymów FMO powstaje jeden, ten sam produkt, zbadalam widma masowe pików uzyskanych podczas reakcji C-1311 tylko z FMO1, gdyż izoenzym ten powodował najwyższy stopień przereagowania badanego związku.

Widmo MS pików odpowiadającego substratowi (S) wykazało obecność dwóch głównych jonów masowych o wartościach m/z 351,1 i 352,1 (Rys.32A), charakterystycznych dla struktury C-1311 ($[M_S + 1]$ i $[M_S + 2]$). W widmie MS pików produktu powstałego wobec FMO1 jon masowy o najwyższej intensywności posiada wartość m/z 367,1 (Rys.32B). Wynik ten pozwala sądzić, że prawdopodobnie mamy do czynienia z cząsteczką o masie: $[M_S + 16 + 1] = [M_S + M_O + 1]$, wskazującą na obecność dodatkowego atomu tlenu. Ponadto, pik produktu P_{FMO} zawiera również pewną ilość nierozdzielonego chromatograficznie substratu, o czym świadczy jon masowy o wartości m/z 351,1 ($[M_S + 1]$).

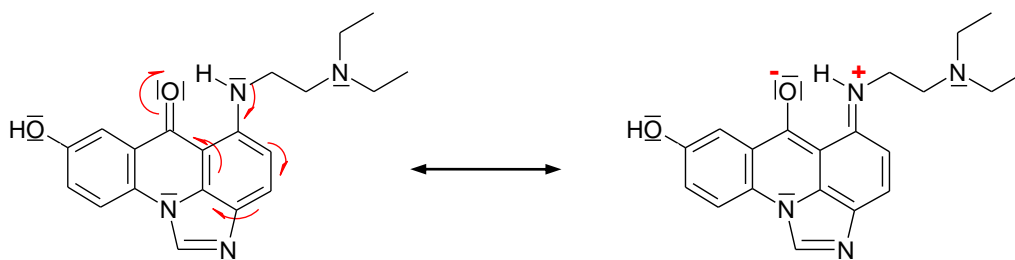


Rys.32. Widma masowe: (A) pików substratu, C-1311 (czas retencji około 20 minut, Rys.27) i (B) pików produktu P_{FMO} (czas retencji około 21 minut, Rys.27).

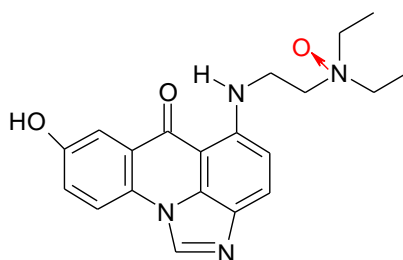


Rys.33. Porównanie widm UV-vis związku C-1311 i produktu P_{FMO} jego reakcji z FMO.

Szczególną cechą produktu P_{FMO} jest niemal identyczne z substratem widmo absorpcyjne, co wskazuje na to, iż metabolit zawiera w swojej strukturze zachowany układ chromoforowy wyjściowego związku (Rys.33). Sugeruje to, że przyłączenie dodatkowego atomu tlenu do cząsteczki C-1311 musiało nastąpić w reszcie diaminoalkilowej. Jedną z właściwości FMO jest utlenianie substratu na heteroatomach, zatem możliwymi miejscami takiej modyfikacji pochodnej imidzoakrydonu mogą być dwa atomy azotu łańcucha bocznego. Każdy z nich dysponuje wolną parą elektronową i teoretycznie może wiązaniem koordynacyjnym przyłączyć atom tlenu. Atomy azotu nie są jednak równocenne. Ten bezpośrednio połączony z układem pierścieniowym cząsteczki C-1311, może stabilizować swoją parę elektronów poprzez struktury rezonansowe. W związku z tym bardziej podatny na procesy utlenienia jest drugi atom azotu łańcucha bocznego, który nie ma możliwości stabilizacji swojej wolnej pary elektronowej na drodze rezonansu z elektronami pierścienia heterocyklicznego (Rys.34). Biorąc pod uwagę powyższe rozważania zaproponowałam strukturę chemiczną produktu P_{FMO} jako N-tlenku w łańcuchu bocznym, którą przedstawiłam na Rys.35.



Rys.34. Schemat ilustrujący stabilizację rezonansową wolnej pary elektronowej na atomie azotu sąsiadującym z układem pierścieniowym cząsteczki C-1311.

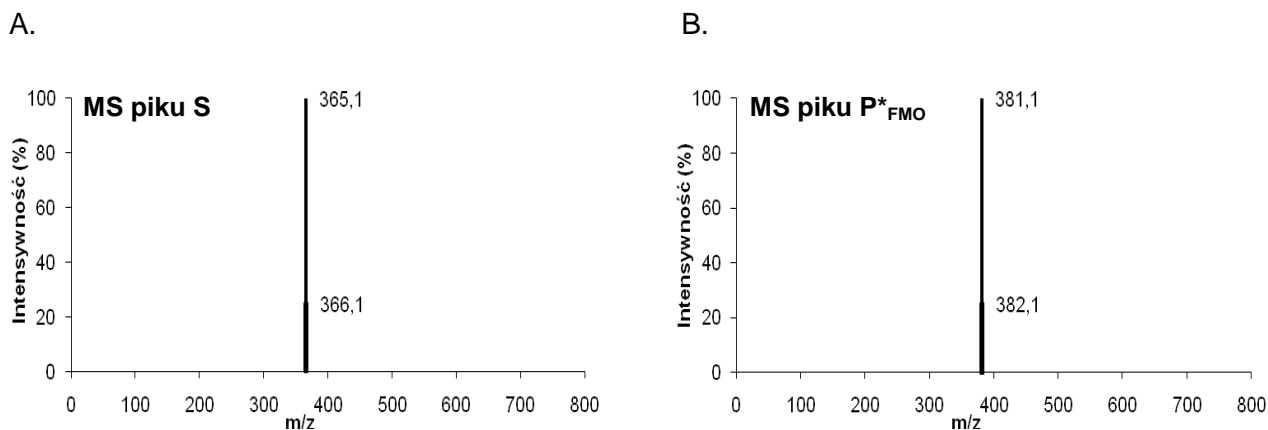


Rys.35. Proponowana struktura produktu P_{FMO} , $m/z = 367, 1$.

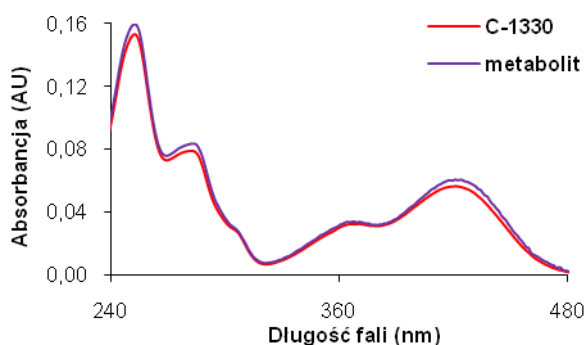
□ Produkt reakcji C-1330 z FMO.

Analogicznie jak dla związku C-1311 zbadalam też widma masowe pików chromatograficznych otrzymanych podczas reakcji C-1330 z FMO1. W tym układzie reakcyjnym intensywność pików metabolitów była bowiem najwyższa w porównaniu z powstałymi w reakcji z pozostałymi badanymi izoenzymami FMO.

Jony masowe widoczne na widmie MS pików odpowiadającego substratowi (S) to wyłącznie dwa charakterystyczne dla związku C-1330 jony masowe o wartościach m/z 365,1 ($[M_S + 1]$) i 366,1 ($[M_S + 2]$) (Rys.36A). W widmie MS zebrany dla pików produktu P^*_{FMO} także zaobserwowałam dwa jony masowe (Rys.36B). Wartości m/z 381,1 ($[M_S + 16 + 1]$) oraz 382,1 ($[M_S + 16 + 2]$), świadczą, że analizowany pik zawiera związek, którego masa molowa jest o 16 większa od masy molowej substratu. Wskazuje to, podobnie jak w przypadku C-1311, na przyłączenie atomu tlenu do cząsteczki C-1330.

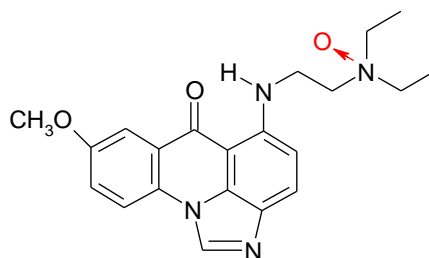


Rys.36. Widma masowe: (A) pików substratu, C-1330 (czas retencji około 22 minut, Rys.29) i (B) pików produktu P^*_{FMO} (czas retencji około 24 minut, Rys.29).



Rys.37. Porównanie widm UV-vis związku C-1330 i produktu P^*_{FMO} jego reakcji z FMO.

Widma UV-vis związku C-1330 oraz produktu jego przemian wobec FMO nie wykazują wyraźnych różnic (Rys.37), a zatem cząsteczka metabolitu zawiera zachowany układ chromoforowy cząsteczki substratu a modyfikacje jego struktury, podobnie jak w przypadku związku C-1311, zaszły poza pierścieniem imidzoakrydonu. Po dokonaniu podobnych analiz jak dla C-1311 postawiłam wniosek, że koordynacyjne przyłączenie atomu tlenu może mieć miejsce na atomie azotu w łańcuchu bocznym.

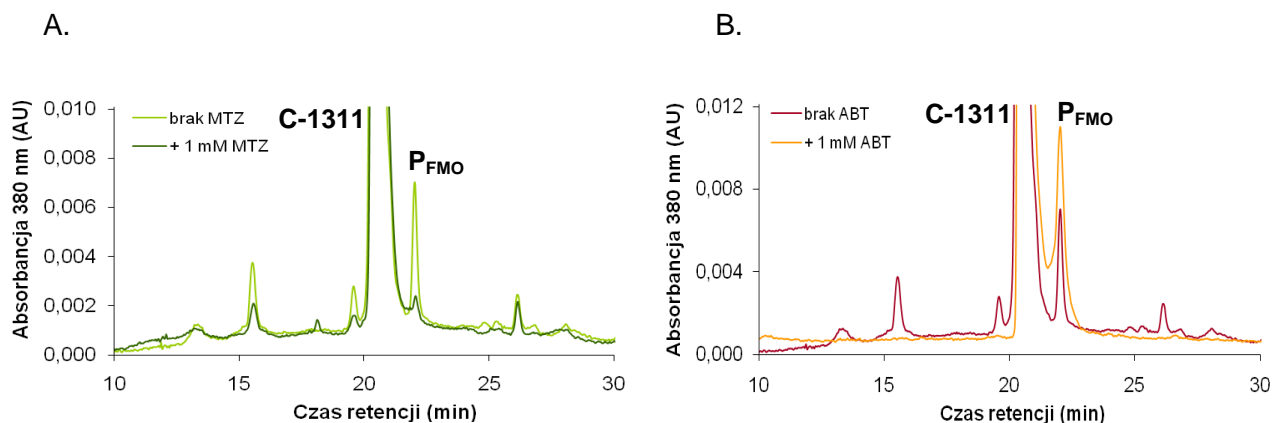


Rys.38. Proponowana struktura produktu P^*_{FMO} , $m/z = 381, 1$.

IV.1.1.6. Udział FMO w metabolizmie C-1311 zachodzącym we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Badania przemian metabolicznych C-1311 wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i człowieka wykazały istnienie produktu P3 (Rys.24), którego czas retencji oraz widmo UV-vis odpowiadają produktowi P_{FMO} otrzymanemu w reakcji C-1311 z rekombinantowymi ludzkimi izoenzymami FMO (Rys.27A), który został zidentyfikowany jako N-tlenek na atomie azotu łańcucha bocznego. W celu potwierdzenia udziału FMO, a jednocześnie wykluczenia roli izoenzymów cytochromu P450, w powstawaniu tego produktu wykonałam serię dodatkowych doświadczeń, w których wykorzystywałam różnice we właściwościach kinetycznych oraz mechanizmie działania monooksygenaz flawinowych i cytochromów P450. Obejmowały one, m.in. użycie specyficznych inhibitorów poszczególnych enzymów, jak również uwzględniały wrażliwość FMO na ogrzewanie w podwyższonej temperaturze oraz ochronne działanie NADPH przed inaktywacją FMO w tych warunkach.

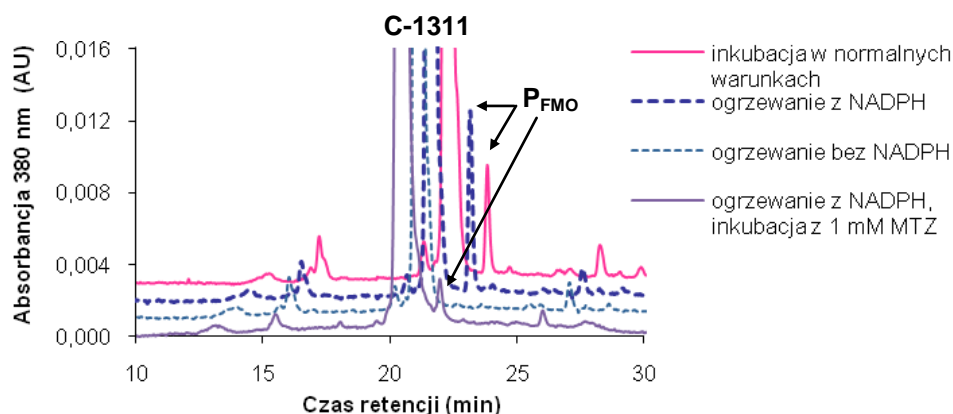
Metimazol (2-merkapto-1-metyloimidazol, MTZ) to standardowy substrat FMO, jednakże w niskich stężeniach i dla krótkiego czasu inkubacji związek ten może działać jako inhibitor odwracalny kompetycyjny tego enzymu [Mani i Kupfer, 1991]. W niewielkim stopniu wpływa także hamująco na aktywność niektórych cytochromów P450 [Guo i wsp., 1997]. 1-Aminobenzotriazol (ABT) jest z kolei znanym selektywnym inhibitorem wielu cytochromów P450 i chloroperoksydazy [Ortiz de Montellano i wsp., 1984]. Obecność MTZ w mieszaninie zawierającej C-1311, mikrosomy szczurze i NADPH spowodowała obniżenie stężenia obserwowanego produktu (Rys.39A), podczas gdy w obecności ABT intensywność pików P_{FMO} wzrosła (Rys.39B). Poza tym, ABT spowodował również zanik pików odpowiadających pozostałym metabolitom C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Taki wynik wykazał fakt zahamowania aktywności FMO przez MTZ, a cytochromów P450 przez ABT i wzmocnił przesłanki o udziale FMO w powstawaniu pików produktu P_{FMO} .



mieszanina reakcyjna 1 (M1): +/- MTZ (ABT) + mikrosomy szczurze + NADPH (30 minut inkubacji, 37°C)
mieszanina reakcyjna 2 (M2): M1 + C-1311 (60 minut inkubacji, 37°C)

Rys.39. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych M2 po inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1311, 2 mM NADPH, 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura w obecności i przy braku 1 mM: (A) MTZ i (B) ABT [chromatograf HPLC Waters Millennium].

Ogrzewanie frakcji mikrosomalnej komórek wątroby bez obecności NADPH w temperaturze 45°C (brak tego składnika mieszaniny reakcyjnej zostaje uzupełniony dopiero po zakończeniu ogrzewania) powoduje zahamowanie aktywności FMO, zaś ma niewielki wpływ na aktywność cytochromów P450. Natomiast obecność egzogenego kofaktora, NADPH, w takiej mieszaninie przeciwdziała inaktywacji FMO [McManus i wsp., 1987]. Powyższe właściwości pozwoliły na dalszy etap weryfikacji hipotezy o roli FMO w metabolizmie C-1311. Wyniki przeprowadzonych badań ilustruje Rys.40.



mieszanina reakcyjna 1 (M1): mikrosomy szczurze +/- NADPH (5 minut ogrzewania, 45°C)
mieszanina reakcyjna 2 (M2): M1 +/- NADPH + C-1311 +/- MTZ (60 minut inkubacji, 37°C)

Rys.40. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1311, 2 mM NADPH i 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura [chromatograf HPLC Waters Millennium].

Okazało się, że pik produktu P_{FMO} zanikał tylko w reakcjach, w których mikrosomy szczurze ogrzewałam w podwyższonej temperaturze bez NADPH i w obecności NADPH, ale

z dodatkiem MTZ. Obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej, której frakcję mikrosomalną poddałam inkubacji w temperaturze 45°C wraz z NADPH, nie zmienił się znacznie w stosunku do kontroli, tzn. intensywny pik produktu P_{FMO} był nadal wykrywalny. Tak więc, zaprezentowane wyniki stanowią kolejny dowód na to, że produkt ten powstaje podczas reakcji C-1311 katalizowanej przez FMO.

IV.1.2. Transformacje metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec enzymów z rodziny transferazy glukuronianowej, UGT.

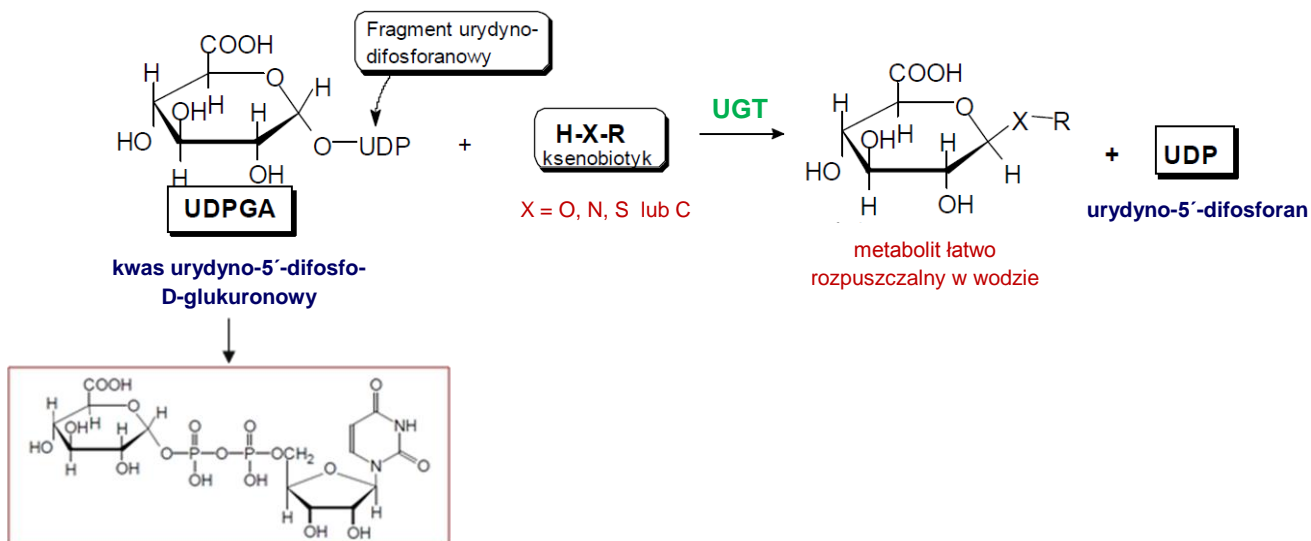
Kolejnym etapem prac nad określeniem grup enzymów obecnych w pęcherzykach mikrosomalnych komórek wątroby, które mogą uczestniczyć w transformacji imidazoakrydonów, było sprawdzenie podatności C-1311 i C-1330 na przemiany wobec enzymów drugiej fazy metabolizmu – transferaz glukuronianowych, UGT.

IV.1.2.1. Ogólne informacje o transferazach glukuronianowych.

Transferazy glukuronianowe (UDP-glukuronylotransferazy; EC 2.4.1.17) są głównymi enzymami drugiej fazy biotransformacji, odgrywającymi istotną rolę w procesach detoksykacji szeregu związków endo- i egzogennych nie tylko u ludzi, ale też u innych kręgowców. Katalizowane przez tę grupę enzymów reakcje glukuronidacji często niebezpiecznych związków toksycznych oraz metabolitów leków doprowadzają do zwiększenia ich polarności ułatwiającej wydalanie z organizmu z moczem lub żółcią. Podczas reakcji glukuronidacji, kwas glukuronowy, w postaci aktywnej – kwasu urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowego (UDPGA) – sprzęgany jest z grupą funkcyjną ksenobiotyku (aglikonu), zazwyczaj grupą hydroksylową, karboksylową, aminową bądź tiolową, co prowadzi do utworzenia, przeważnie mniej toksycznych, O-, N- lub S-glukuronidów (Rys.41) [Meech i Mackenzie, 1997]. Niektóre związki, np. sulfinpirazol czy fenylobutazon są przekształcane do rzadko spotykanych C-glukuronidów [Richter i wsp., 1975]. Poza zmniejszaniem toksyczności ksenobiotyków, UGT pełnią również istotną rolę w eliminacji wielu substancji endogennych, takich jak kwasy żółciowe oraz hormony steroidowe, ale też bilirubiny usuwanej z organizmu za pomocą izoenzymu UGT1A1. Enzymy z rodziny UGT występują w wielu odmianach w retikulum endoplazmatycznym i błonach jądrowych. Zlokalizowane są głównie w wątrobie, ale odgrywają też znaczącą rolę w metabolizmie poza komórkami wątroby – w przewodzie pokarmowym i nerkach [Fisher i wsp., 2001].

Na podstawie sekwencji aminokwasowej i organizacji genu, ludzkie enzymy z rodziny transferaz glukuronianowych zostały sklasyfikowane w dwie podrodziny, UGT1 i UGT2, lub,

alternatywnie, w trzy podrodziny, UGT1A, UGT2A i UGT2B. Zidentyfikowano dotąd 19 ludzkich izoenzymów UGT i 17 postaci cDNA je kodujących [Mackenzie i wsp., 2005].



Rys.41. Schemat katalizowanej przez transferazy glukuronianowe reakcji glukuronidacji (opracowanie własne na podstawie [Meech i Mackenzie, 1997]).

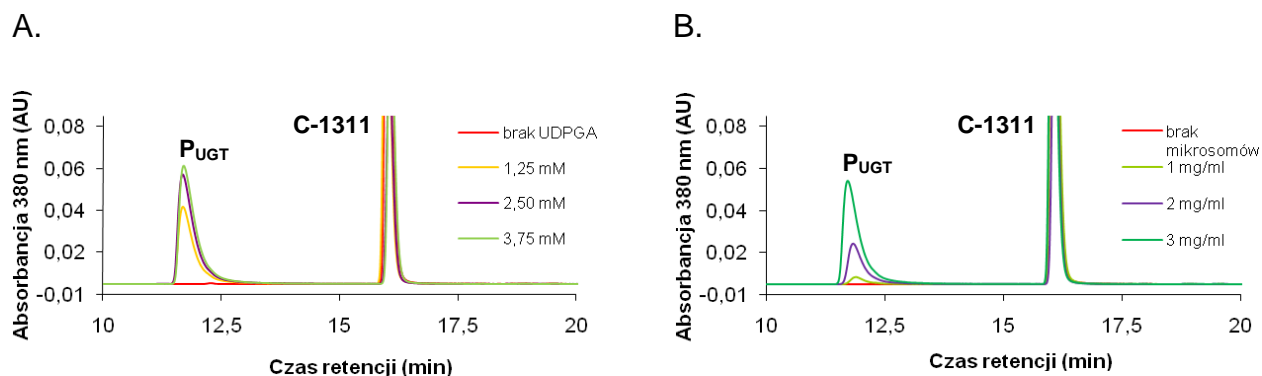
IV.1.2.2. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby i UDPGA jako kosubstratu zawartych w niej enzymów UGT.

Badania podatności związków C-1311 i C-1330 na transformacje metaboliczne wobec UGT rozpoczęłam od analizy chromatograficznej składu mieszanin reakcyjnych zawierających frakcję mikrosomalną szczurzych bądź ludzkich komórek wątroby i badany związek w buforze o pH~7,5 z dodatkiem bezwodnego chlorku magnezu i alametycyny¹⁰, do których po wstępnej preinkubacji dodawano UDPGA, będący kosubstratem dla enzymów UGT. W celu ustalenia optymalnych warunków doświadczenia początkowo przeprowadziłam inkubacje obydwu pochodnych imidazoakrydonu w warunkach ze zmieniającym się stężeniem kofaktora UDPGA (0; 1,25; 2,5 i 3,75 mM) lub enzymów frakcji mikrosomalnych (0; 1; 2 i 3 mg/ml).

Uzyskane obrazy chromatograficzne wskazały, iż w wyniku przemian C-1311 przez enzymy UGT zawarte w pęcherzykach mikrosomalnych szczurzych i ludzkich komórek wątroby powstaje jeden pik produktu, o czasie retencji znacznie krótszym od czasu retencji związku wyjściowego. Dodatkową informacją jest to, że stopień przemiany C-1311 do tego

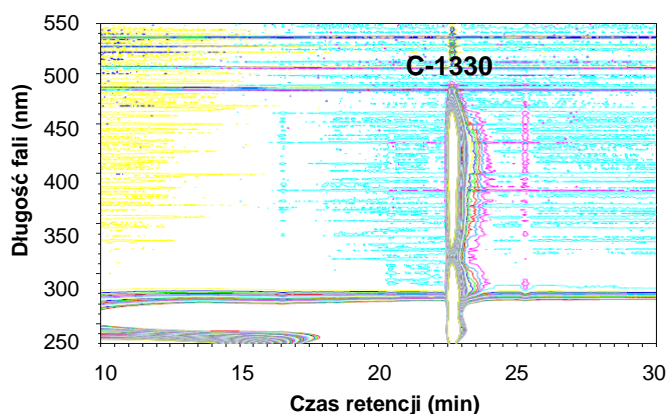
¹⁰ Chlorek magnezu aktywuje enzymy metabolizujące zawarte we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, zaś alametycyna jest grzybowym antybiotykiem peptydowym o właściwościach jonoforowych, który zwiększa przepuszczalność błony retikulum endoplazmatycznego pęcherzyków mikrosomalnych dla UDPGA (informacje producenta – BD Gentest, USA).

metabolitu zależał zarówno od stężenia UDPGA, jak i stężenia białek frakcji mikrosomalnej (Rys.42). W optymalnych warunkach stężeń reagentów wydajność reakcji C-1311 z transferazami glukuronianowymi była ponad dwukrotnie wyższa podczas stosowania frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura niż człowieka.



Rys.42. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1311, (A) 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura (przy zmieniającym się stężeniu UDPGA) i (B) 2 mM UDPGA (przy zmieniającym się stężeniu mikrosomów szczurzych) [chromatograf HPLC Waters Breeze].

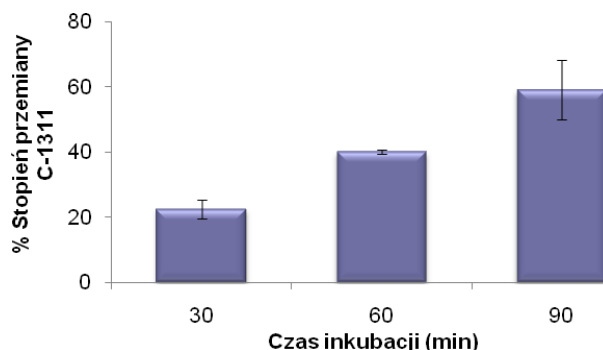
Analogiczne doświadczenia wykonałam dla związku C-1330. Nawet przy najwyższym stosowanym stężeniu UDPGA i białek mikrosomalnych nie zaobserwowałam żadnego wyraźnego produktu metabolizmu tej pochodnej imidazoakrydonu wobec UGT (Rys.43). Wynik ten świadczy zatem o tym, iż C-1330 nie jest substratem dla enzymów z grupy transferaz glukuronianowych zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.



Rys.43. Poziomicowy obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1330, 3 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i 2 mM UDPGA [chromatograf HPLC Waters Millennium].

W kolejnym etapie badań zbadalam zależność stopnia przereagowania związku C-1311 w obecności białek frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i UDPGA od czasu inkubacji. Zoptymalizowane końcowe stężenia składników mieszaniny reakcyjnej wynosiły:

0,2 mM C-1311, 2 mg/ml białek mikrosomalnych, 2,5 mM UDPGA. Jak wynika z wykresu na Rys.44 stężenie produktu C-1311 wzrastało liniowo wraz z postępem reakcji.



Rys.44. Zależność stopnia przereagowania związku C-1311 w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i UDPGA od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

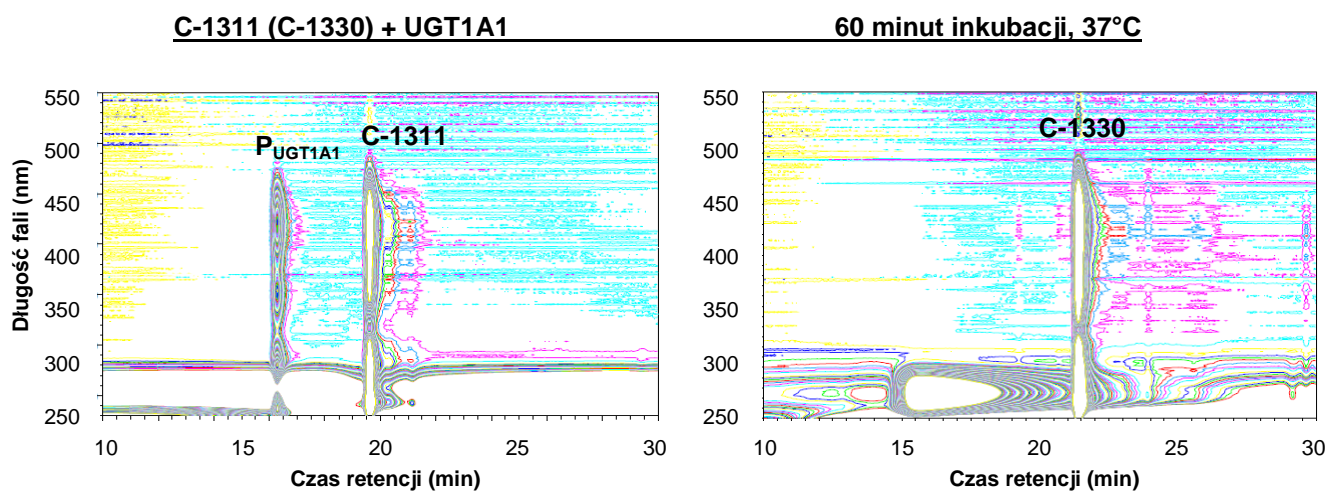
IV.1.2.3. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT.

Wyniki uzyskane z opisanych powyżej doświadczeń dowiodły, że C-1311, ale nie C-1330, jest substratem zawartych w mieszaninie białek mikrosomalnych komórek wątroby enzymów z rodziny transferaz glukuronianowych. Następnym etapem prowadzonych przeze mnie badań była analiza przebiegu transformacji metabolicznej obu pochodnych imidazoakrydonu wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT, które zostały otrzymane w bakulowirusowych systemach ekspresji umieszczonych w komórkach owadzych zapewniających wysoki poziom ich produkcji. W badaniach zastosowałam po jednym enzymie z każdej z dwóch podrodziny UGT, a mianowicie UGT1A1 i UGT2B7.

IV.1.2.3.1. Wyniki badań metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec UGT1A1.

UGT1A1 jest dominującym izoenzymem UGT, występującym w wątrobie ludzkiej, katalizującym reakcję sprzęgania wielu leków przeciwnowotworowych [Fisher i wsp., 2001]. Obrazy chromatograficzne uzyskane dla mieszaniny poinkubacyjnej C-1311 z tym enzymem wskazują, że badany związek jest przez niego metabolizowany. Na skutek reakcji powstaje jeden produkt, a wysokość piku pochodzącego od metabolitu rośnie wraz ze wzrostem stężenia enzymu rekombinantowego. Produkt ten charakteryzuje się identycznym, jak dla produktu otrzymanego wobec mieszaniny białek mikrosomalnych i UDPGA, czasem retencji (Rys.45). W przeciwieństwie zaś do C-1311, pochodna C-1330 nie ulegała biotransformacji wobec UGT1A1, nawet w warunkach najwyższego stężenia białka w mieszaninie reakcyjnej, podobnie jak to miało miejsce w doświadczeniach z zastosowaniem białek mikrosomalnych i

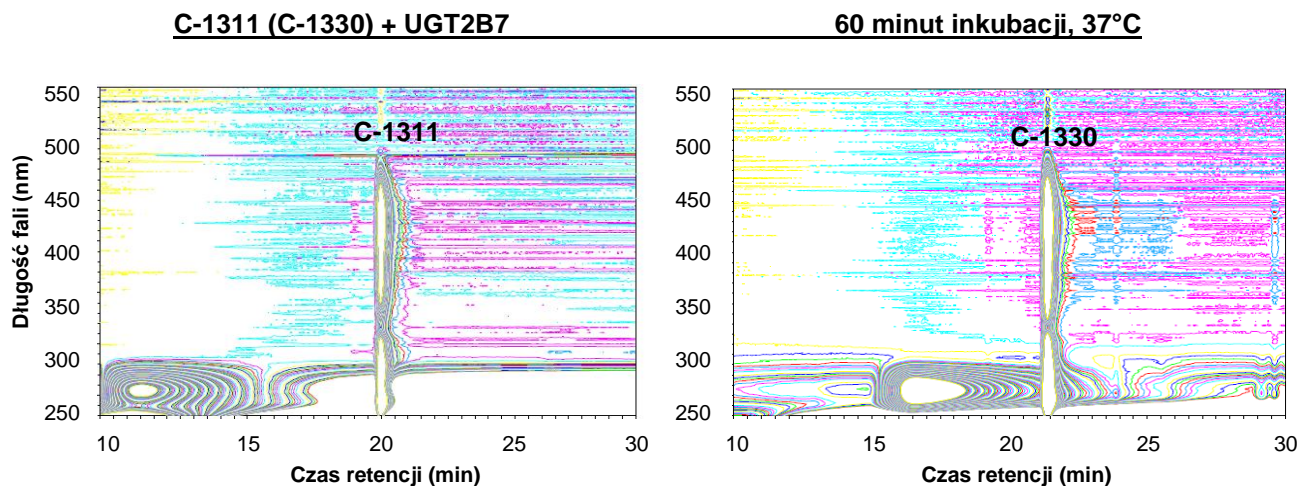
UDPGA. Wynik ten potwierdza zaobserwowany wcześniej brak reaktywności C-1330 w stosunku do enzymów z rodziny UGT.



Rys.45. Poziomicowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,05 mM C-1311 (C-1330), 1 mg/ml UGT1A1 i 2 mM UDPGA [chromatograf HPLC Millennium].

IV.1.2.3.2. Wyniki badań metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec UGT2B7.

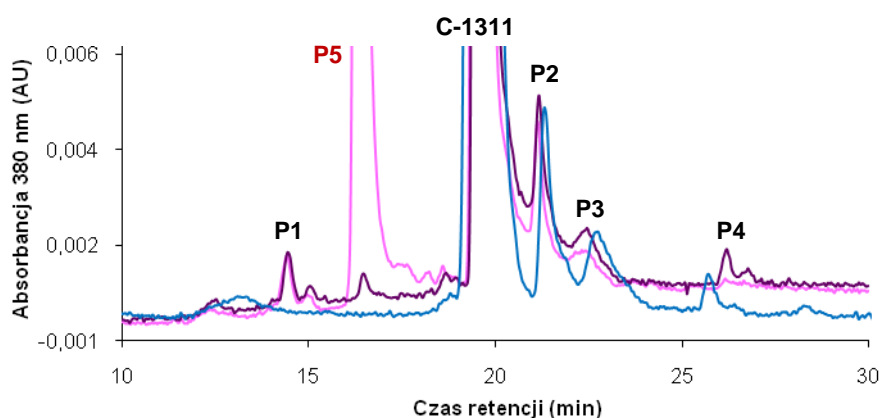
Ważnym wśród transferaz glukuronianowych enzymem, odpowiedzialnym za metabolizm szerokiej gamy związków istotnych z klinicznego punktu widzenia, jest również UGT2B7. Skuteczność jego działania względem C-1311 i C-1330 zbadalam w warunkach reakcyjnych przedstawionych powyżej. Dla obydwu związków nie zaobserwowałam jednak wyraźnej przemiany wobec UGT2B7, co wskazują chromatogramy na Rys.46. Przypuszczam, iż nie znajdują się one w spektrum substratowym działania tego enzymu.



Rys.46. Poziomicowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,05 mM C-1311 (C-1330), 1 mg/ml UGT2B7 i 2 mM UDPGA [chromatograf HPLC Waters Millennium].

IV.1.2.4. Badania przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura oraz NADPH i UDPGA jako kofaktorów FMO i UGT.

Aby określić udział UGT w metabolizmie pochodnych imidazoakrydonu, mając na uwadze dotychczas poznane przemiany metaboliczne badanych związków, w następnym etapie badań celowym było jednoczesne wprowadzenie do mieszaniny białek mikrosomalnych kofaktorów zarówno FMO, jak i UGT, czyli odpowiednio inkubacja z NADPH i UDPGA. Dążyłam w ten sposób do zbadania czy otrzymany metabolit pierwszej fazy metabolizmu, powstający wobec FMO, stanowi substrat dla enzymów UGT.



mieszanina reakcyjna 1 (M1): C-1311 + mikrosomy szczurze + NADPH (60 minut inkubacji, 37°C)

mieszanina reakcyjna 2 (M2): M1 + UDPGA (60 minut inkubacji, 37°C)

mieszanina reakcyjna 3 (M3): M2 + GUS (60 minut inkubacji, 37°C)

Rys.47. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych przemian metabolicznych 0,2 mM C-1311 wobec 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura, 1 mM NADPH, 2,5 mM UDPGA i 10 U/μl GUS [chromatograf HPLC Waters Millennium].

Na początku przeprowadziłam reakcję związku C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura tylko w obecności NADPH, stanowiącego kofaktor FMO i cytochromów P450. Chromatograficzny obraz składu otrzymanej mieszaniny reakcyjnej wskazał na istnienie czterech pików produktów reakcji, wśród których w najwyższym stężeniu był obecny pik produktu FMO (oznaczony jako P2 na Rys.47). Dodanie UDPGA do mieszaniny reakcyjnej spowodowało, po pewnym czasie inkubacji, pojawienie się nowego piketu produktu, P5, który powstał na skutek działania UGT. Obserwowałam, iż bez względu na czas trwania inkubacji frakcji mikrosomalnej z NADPH, pik produktu P5, pojawiający się po inkubacji z UDPGA, posiadał zbliżoną intensywność. Wynika stąd, że reakcje pierwszej i drugiej fazy metabolizmu C-1311 przebiegają niezależnie od siebie. W celu potwierdzenia udziału UGT w tworzeniu piketu produktu P5 do inkubowanej mieszaniny dodałam następnie β-glukuronidazę (GUS, EC 3.2.1.31), bakteryjny enzym, który przeprowadza enzymatyczną

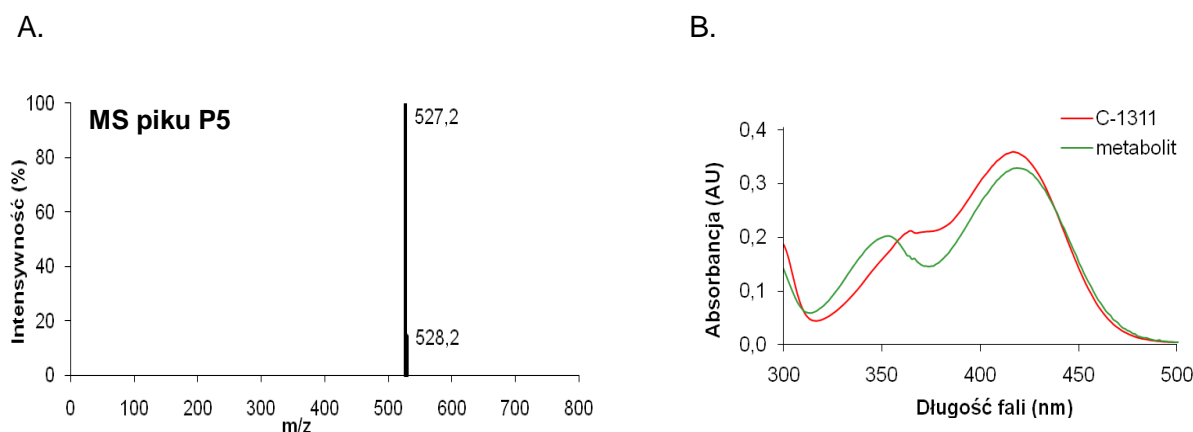
hydrolizę glukuronidów [McCarter i Withers, 1994]. Zgodnie z przewidywaniami, po kolejnych 60 minutach inkubacji, pik produktu P5 całkowicie zniknął z mieszaniny reakcyjnej.

Podobne doświadczenie przeprowadziłam też dla związku C-1330. Zgodnie z przewidywaniami, zasygnalizowanymi na podstawie wcześniejszych badań, C-1330 nie był metabolizowany przez enzymy mikrosomalne w obecności UDPGA, natomiast przy udziale NADPH pojawił się jeden pik produktu, który określiłam poprzednio jako produkt działania FMO (dane nieprezentowane).

IV.1.2.5. Identyfikacja produktów reakcji C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura, NADPH i UDPGA.

W celu zaproponowania struktur chemicznych produktów powstałych w reakcji C-1311 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura oraz NADPH i UDPGA (kofaktorów FMO i UGT) odpowiednie mieszaniny reakcyjne, przygotowane w standardowych warunkach, poddałam analizie HPLC/ESI-MS. Poniżej przedstawiam charakterystykę widm masowych uzyskanych dla dwóch pików produktów oznaczonych na Rys.47 jako P2 i P5.

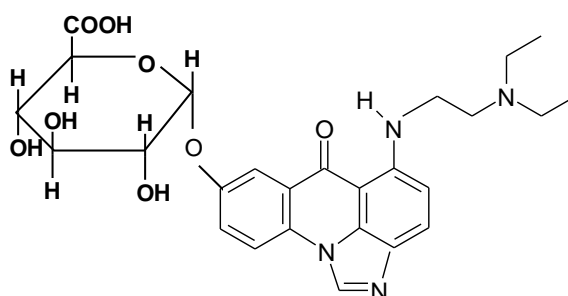
Widmo MS pików produktu P2 zawierało główny jon masowy o wartości m/z 367,1. Był on również obecny w widmie MS pików produktu P_{FMO} reakcji C-1311 z FMO (Rys.32B). Opierając się na tych danych oraz czasach retencji i widmach absorpcyjnych UV-vis wspomnianych metabolitów mogłam przyjąć, iż jest to ten sam produkt, który zidentyfikowałam już uprzednio jako N-tlenek związku C-1311.



Rys.48. (A) Widmo masowe pików produktu P5 (czas retencji około 16 minut, Rys.47); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1311 i produktu P5 jego reakcji z UGT.

Przedstawione na Rys.48A widmo MS pików metabolitu P5 zawiera jon masowy o wartości m/z 527,2 ($[M_s + 176 + 1]$). Podwyższenie masy cząsteczkowej substratu o 176 jednostek

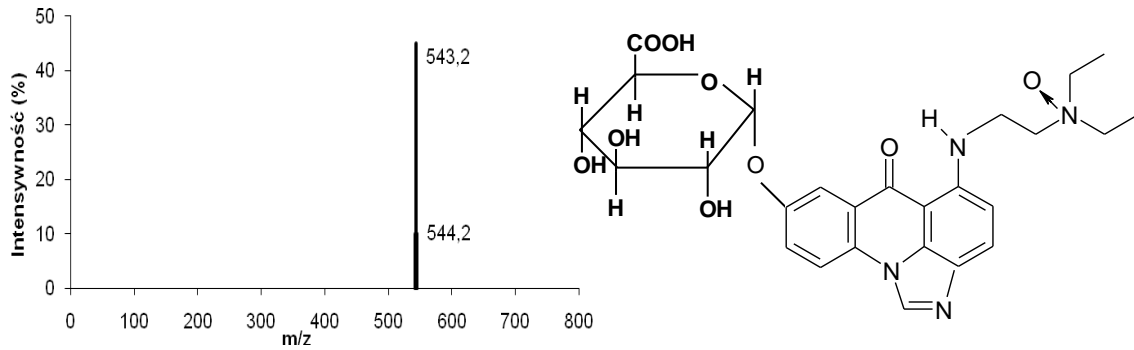
wskazuje, że produkt ten jest połączeniem cząsteczki C-1311 z resztą kwasu glukuronowego, prawdopodobnie na atomie tlenu w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, zatem jest to O-glukuronid. Za wskazanym miejscem sprzęgania przemawia fakt, że próby uzyskania takiego koniugatu dla związku C-1330, strukturalnej pochodnej C-1311 z zablokowaną grupą hydroksylową, zakończyły się niepowodzeniem. Ponadto, widmo UV-vis analizowanego produktu metabolizmu wykazuje odmienny przebieg od widma UV-vis substratu (Rys.48B). W związku z tym można sądzić, że zmiana nastąpiła w podstawniku bezpośrednio związanym z układem chromoforowym cząsteczki C-1311, czyli jak przedstawiłam na Rys.49, na atomie tlenu grupy hydroksylowej.



Rys.49. Proponowana struktura produktu P5, $m/z = 527,2$.

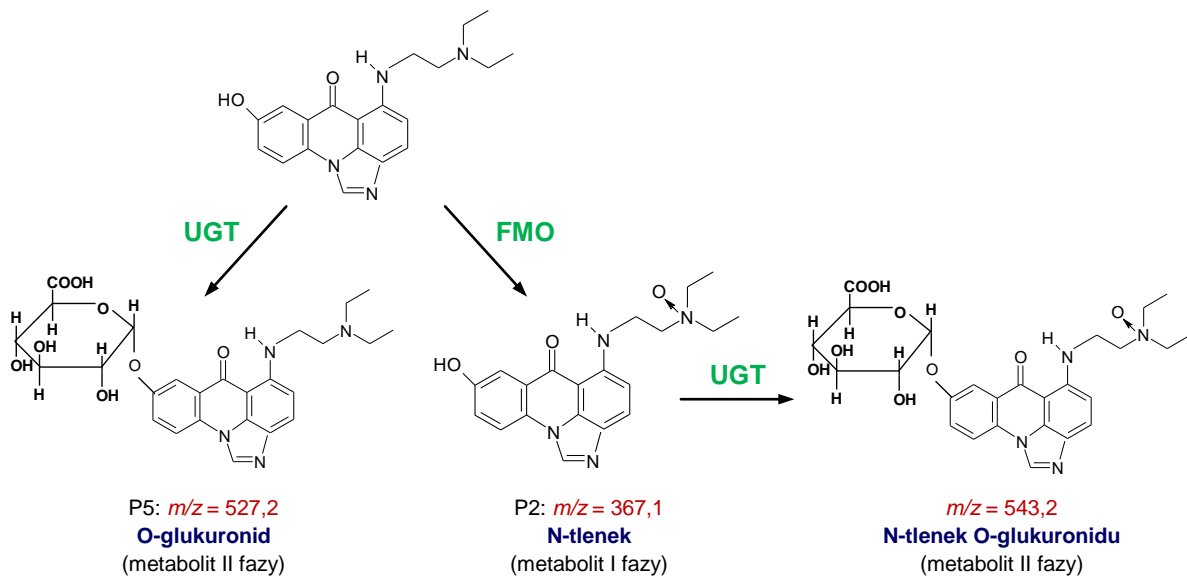
Interpretacja zebranych widm absorpcyjnych (UV-vis) oraz masowych (MS) pików uzyskanych metabolitów pozwoliła stwierdzić, że produkt reakcji C-1311 z enzymami obecnymi w mikrosomach w obecności kosubstratu dla zawartych w nich transferaz glukuronianowych, UDPGA (P_{UGT} na Rys.42, P5 na Rys.47), jest tożsamy z produktem otrzymanym wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT1A1 (P_{UGT1A1} na Rys.45). Natomiast produkt reakcji pochodnej imidazoakrydonu z enzymami komórek wątroby i NADPH (P2 na Rys.47) jest tym samym produktem jaki uzyskałam wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów z rodziny monooksygenaz flawinowych (P_{FMO} na Rys.27).

Analiza spektroskopowa wskazała również na istnienie w mieszaninie C-1311, enzymów mikrosomalnych, NADPH i UDPGA dodatkowego, choć słabo widocznego na chromatogramie, metabolitu. Wartość m/z 543,2 ($[M_s + 176 + 16 + 1]$) jego jonu masowego może odpowiadać strukturze chemicznej takiego produktu, w którym N-tlenek C-1311 sprzężony jest z resztą kwasu glukuronowego poprzez atom tlenu w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu (Rys.50). Obecność takiego metabolitu potwierdza przypuszczenia, że P2 – produkt pierwszej fazy przemian metabolicznych – poddawany jest dalszym przekształceniom w drugiej fazie biotransformacji, w tym przypadku procesowi glukuronidacji.



Rys.50. Widmo masowe produktu o jonie masowym $m/z = 543,2$ i jego proponowana struktura.

Mając na uwadze powyższe obserwacje zaproponowałam dwie alternatywne drogi metabolicznej przemiany C-1311 wobec zawartych w pęcherzykach mikrosomalnych komórek wątroby enzymów z rodziny UGT (Rys.51). Bezpośrednia glukuronidacja ma miejsce na atomie tlenu grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia akrydyny, zaś pośrednia zachodzi z wytworzeniem najpierw N-tlenku, będącego produktem utlenienia przez FMO, który następnie ulega sprzężeniu z UDPGA. Zatem, na drodze przemian detoksykacyjnych powstają dwa produkty, które mogą zostać łatwo wydalone z organizmu.

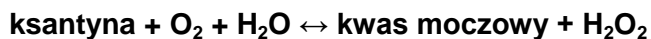
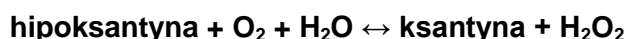


Rys.51. Proponowany szlak przemian metabolicznych związku C-1311 wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

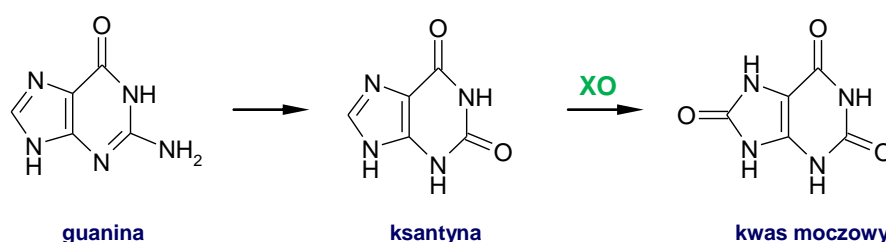
IV.1.3. Metabolizm C-1311 wobec oksydazy ksantynowej, XO.

Kontynuując poszukiwania enzymów, dla których imidazoakrydon C-1311 może być substratem, zbadalam przemiany związku C-1311 wobec oksydazy ksantynowej (ang. *xanthine oxidase* – XO, EC 1.1.3.22) wyizolowanej z maślanki mleka krowiego. XO katalizuje w organizmie ludzkim przekształcenie hipoksantyny w ksantynę przy udziale wody i tlenu

cząsteczkowego oraz z uwolnieniem nadtlenu wodoru, jak również transformację ksantyny w kwas moczowy, również z wytworzeniem nadtlenu wodoru [Hille i Nishino, 1995]. Procesy te przebiegają zgodnie z następującymi sumarycznymi równaniami:



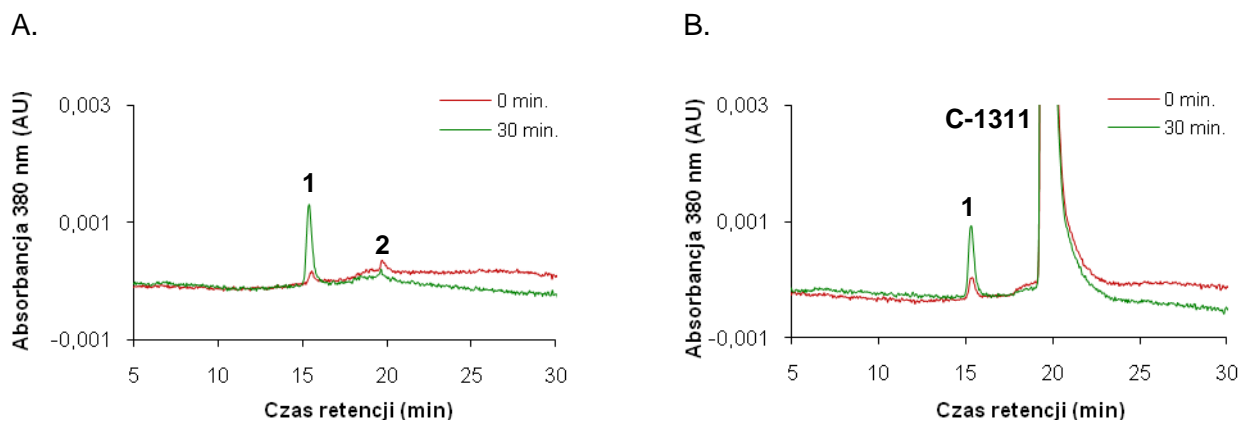
Przedstawione reakcje są częścią metabolizmu nukleotydów purynowych. Wybór tego enzymu wynikał więc z tego, że jest on głównym katalizatorem przemian nukleotydów w organizmie człowieka. Ponadto jego standardowy naturalny substrat, jakim jest ksantyna, jest podobny strukturalnie do badanego przeze mnie związku – tak jak C-1311 zawiera pierścień imidazolowy. Rys.52 obrazuje podstawową funkcję XO w organizmie ludzkim.



Rys.52. Szlak przemian metabolicznych guaniny w organizmie ludzkim [opracowanie własne na podstawie: Berg i wsp. *Biochemia*. Warszawa: PWN S.A., 2005, ss. 709 – 710].

Na wstępie, podobnie jak w przypadku badań z FMO i UGT, na podstawie charakterystyki podanej przez producenta (SIGMA Chemical Co., USA), danych literaturowych oraz optymalnych warunków dla reakcji C-1311 z wcześniej badanymi enzymami, określiłam odpowiednie warunki reakcji związku z XO. Ostatecznie badania przeprowadziłam stosując 0,1 mM stężenie związku C-1311 oraz stężenie enzymu 1,65 mg/ml.

Analizę chromatograficzną roztworu samego enzymu, bez dodatku substratu, przyjąłam jako kontrolę. Bezpośrednio po rozcieńczeniu XO w buforze reakcyjnym zarejestrowałam dwa piki o niewielkiej intensywności (oznaczyłam je jako 1, 2 na Rys.53A). Udział piku 1 pojawiającego się przy czasie retencji wynoszącym około 15 minut wzrósł po 30 minutach inkubacji. Prawdopodobnie był to ślad pochodzący od uwalniającej się grupy prostetycznej enzymu, jaką jest FAD. Drugi pik stanowił, jak przypuszczam, zanieczyszczenie samej XO. Na podstawie chromatogramów przedstawionych na Rys.53B można wysunąć wniosek, iż C-1311 nie ulega przemianom metabolicznym wobec oksydazy ksantynowej. W składzie mieszanin reakcyjnych poddanych analizie chromatograficznej nie pojawiły się bowiem żadne dodatkowe piki, które mogłyby świadczyć o metabolizmie badanej pochodnej imidazoakrydonu.



Rys.53. Liniowe obrazy chromatograficzne (A) roztworu 1 U/ml XO oraz (B) składu mieszaniny reakcyjnej na starcie i po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,1 mM C-1311 z 1,65 mg/ml XO [chromatograf HPLC Waters Millennium].

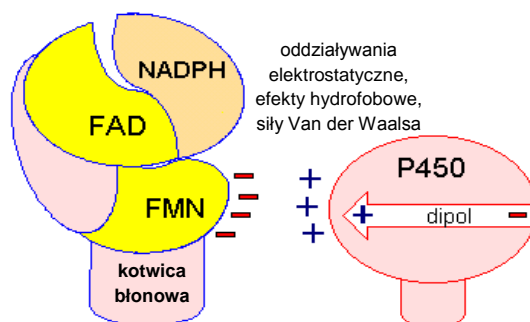
IV.1.4. Badania roli NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450, CPR, w metabolizmie C-1311 i C-1330.

Dla kontynuacji badań metabolizmu przeciwnowotworowych pochodnych imidzoakrydonu w kolejnym etapie pracy podjęłam próbę wyjaśnienia jaką rolę w transformacjach metabolicznych C-1311 i C-1330 spełnia NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450, obecna w komórkach wątroby wraz z izoenzymami cytochromu P450.

IV.1.4.1. Ogólne informacje o CPR.

NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450 (ang. *cytochrome P450 reductase*, CPR; EC 1.6.2.4), odkryta w 1950 roku i pierwotnie nazwana NADPH-reduktazą cytochromu c [Horecker, 1950], jest flawoproteiną o masie cząsteczkowej wynoszącej około 75 do 80 kDa, zlokalizowaną w błonie retikulum endoplazmatycznego większości komórek eukariotycznych. Poziom ekspresji genu kodującego CPR w organizmach ssaków jest regulowany obecnością hormonu tyreotropowego, T3 i jest najwyższy w wątrobie oraz płucach, aczkolwiek niewielkie ilości tego enzymu zlokalizowano niemal we wszystkich organach i tkankach [Ram i Waxman, 1992].

CPR umożliwia szybki i bezpośredni transport elektronów z NADPH do jonu Fe(III) hemu cytochromu P450. Interakcja pomiędzy białkiem P450 a CPR polega na oddziaływaniu różnych sił fizykochemicznych, w tym dopełniających się par ładunków (Rys.54). Dla prawidłowego funkcjonowania tego układu stosunek cytochromu P450 i jego reduktazy powinien wynosić 1:1. Jednak w organizmie człowieka ilość CPR jest kilka razy niższa niż cytochromu P450, dlatego jej obecność jest czynnikiem limitującym dla wielu reakcji zależnych od cytochromu P450 [Nadler i Strobel, 1991].



Rys.54. Model wzajemnego oddziaływania cytochromu P450 i NADPH-reduktazy cytochromu P450 [źródło: www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology].

Do innych fizjologicznych akceptorów elektronów, oddziałujących z CPR, należą także oksygenaza hemu [Schacter i wsp., 1972], biorąca udział w katabolizmie hemu; cytochrom b_5 [Enoch i Strittmatter, 1979], katalizujący procesy metabolizmu kwasów tłuszczowych oraz monooksygenaza skwalenu i reduktaza 7-dehydrocholesterolu, które wraz z cytochromem b_5 uczestniczą w biosyntezie steroli. Z CPR współpracuje również cytochrom c oraz ferrycyanid. W przenoszeniu elektronów w CPR pomagają związane z enzymem dwa kofaktory flawinowe: FAD oraz FMN. FAD pełni funkcję akceptora dwóch równoważników jonu hydroniowego pobieranych z cząsteczki NADPH, a FMN jest donorem jednego elektronu na terminalny akceptor.

IV.1.4.2. Model myszy HRN.

Dla poznania funkcji specyficznych genów tworzone są różne modele zwierząt transgenicznych. W Biomedical Research Centre, BRC (University of Dundee, Wielka Brytania), w grupie badawczej doktora Colina Hendersona opracowano, m.in. model myszy transgenicznych pozbawionych genu kodującego NADPH-reduktazę cytochromu P450 w komórkach wątroby (ang. *hepatic reductase null* – HRN). Zwierzęta HRN uzyskano z zastosowaniem technologii „Cre/LoxP”, która pozwoliła na eliminację genu CPR selektywnie tylko w komórkach wątroby [Henderson i wsp., 2003, 2006].

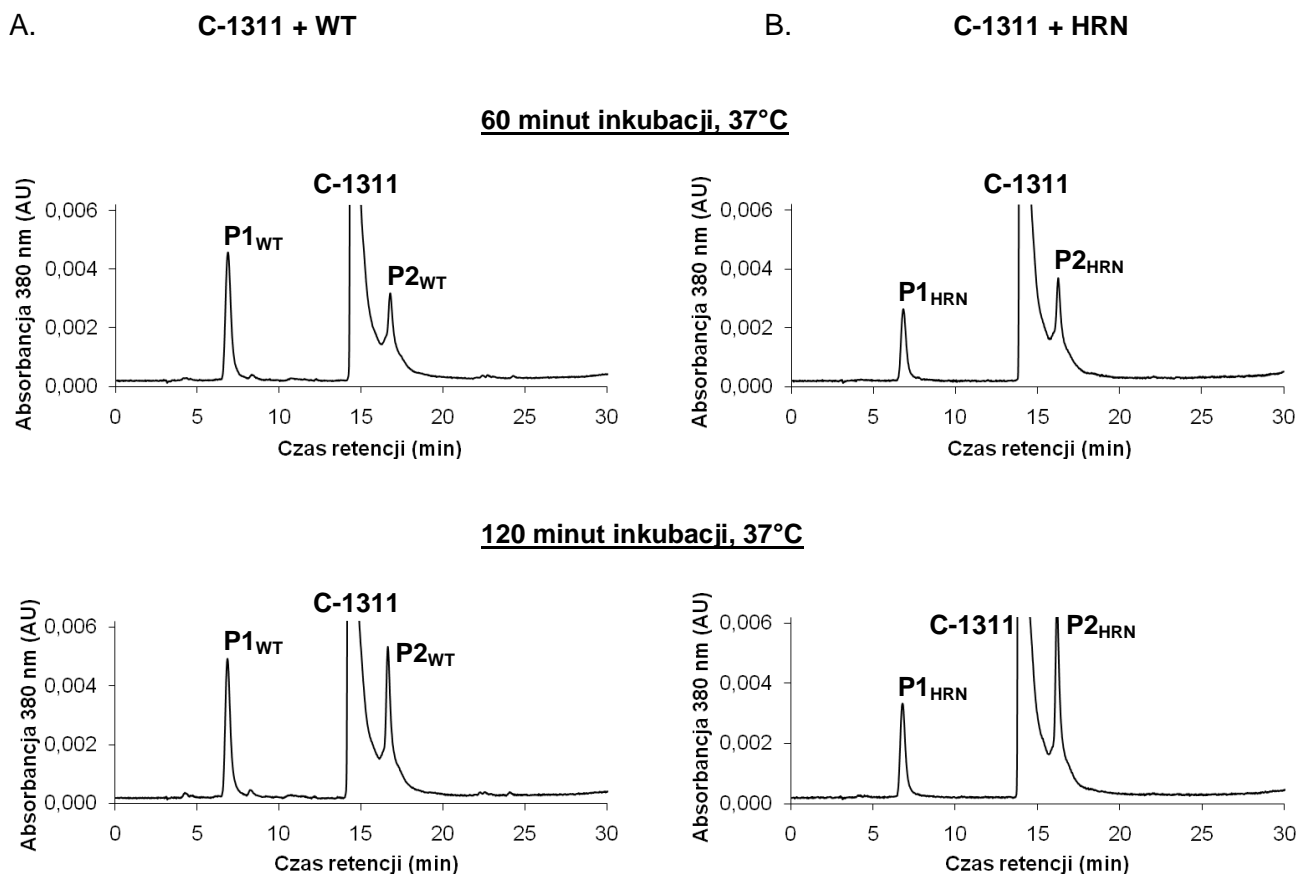
Wcześniejsze badania potwierdziły jednoznacznie, że enzym CPR jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju embrionalnego myszy i całkowite wyeliminowanie go z organizmu, na skutek zmian w sekwencji nukleotydów kodujących CPR, jest dla tych zwierząt letalne. Myszy HRN, nie posiadające funkcjonalnej CPR, a więc aktywnych cytochromów P450, tylko w komórkach wątroby, są jednak zdolne do życia i rozmnażania się, a fenotypowo nie różnią się od myszy typu dzikiego (ang. *wild type* – WT). Zauważono jednakże, iż mają znacznie obniżony poziom cholesterolu i trójglicerydów we krwi, chociaż w wątrobie nadal pozostaje on wysoki [Henderson i wsp., 2003].

Obecnie myszy HRN to jedyny dostępny model zwierzęcy z nokautem genu kodującego CPR. Myszy te zastosowano dotychczas, m.in. do zbadania roli cytochromów P450 w farmakokinetyce i toksyczności przeciwnowotworowego leku alkilującego, cyklofosfamidu [Pass i wsp., 2005] oraz przeciwnowotworowego alkaloidu, eliptycyny [Stiborova i wsp., 2008]. W ramach mojej pracy doktorskiej zbadalam przebieg reakcji biotransformacji obydwu związków wobec enzymów frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy o prawidłowym poziomie ekspresji genu NADPH-reduktazy cytochromu P450 (typ WT) i komórek z nokautem tego genu (typ HRN). Dodatkowo, dla związku C-1311 przeprowadziłam także badania farmakokinetyczne z zastosowaniem myszy WT i HRN. Część tych badań wykonałam we wspomnianym Biomedical Research Centre, korzystając z dwumiesięcznego stypendium przyznanego przez British Council i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

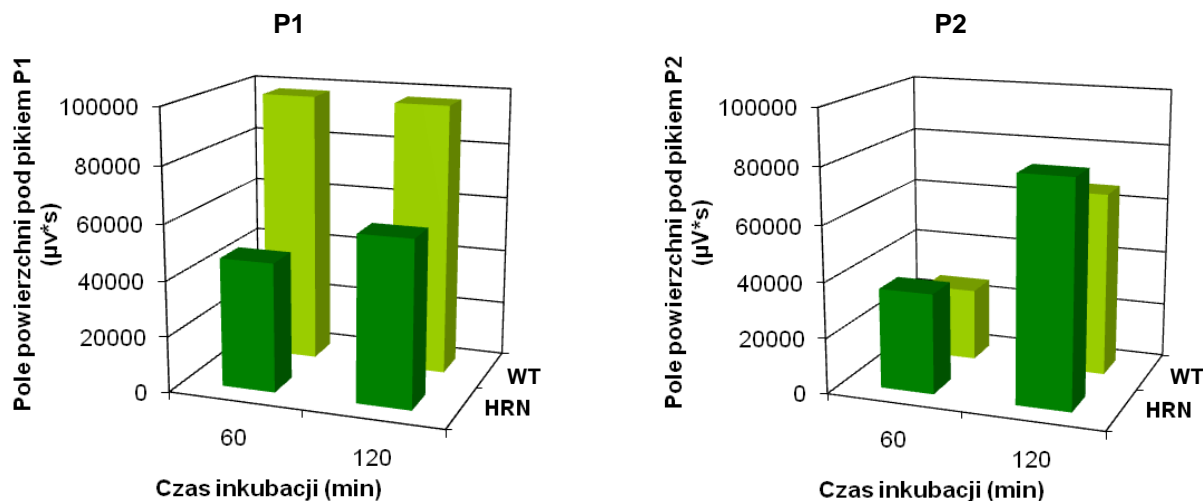
IV.1.4.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN.

Wzorując się na ustalonych wcześniej optymalnych warunkach przemian C-1311 w obecności szczurzych i ludzkich enzymów mikrosomalnych [Wiśniewska i wsp., 2007], po przeprowadzeniu kilku wstępnych analiz chromatograficznych przyjął następujące stężenia reagentów: C-1311 – 0,2 mM, frakcja mikrosomalna WT (bądź HRN) – 2 mg/ml, NADPH – 2 mM. Wyniki badań zaprezentowałam w postaci chromatogramów liniowych zebranych po 60 i 120 minutach inkubacji. Dla wybranych odcinków czasu widać istotne różnice w stężeniu powstałych metabolitów w zależności od źródła mikrosomów.

Analiza chromatograficzna składu mieszanin reakcyjnych wskazała na istnienie dwóch głównych produktów. Pik metabolitu P1 pojawił się na starcie chromatogramu, natomiast pik metabolitu P2 tuż za pikiem substratu (Rys.55). Stężenie obu produktów wzrastało z czasem inkubacji. Porównując obie frakcje mikrosomalne można natomiast dostrzec różnice w kierunku zmian stężenia powstających metabolitów, a mianowicie intensywność piku produktu P1 była znacznie niższa, a piku P2 tylko niewiele wyższa w przypadku zastosowania mikrosomów myszy HRN. Relacje te ilustrują wykresy słupkowe na Rys.56. Za miarę stężenia produktu, które informuje o szybkości jego powstawania, przyjął pole powierzchni pod odpowiadającym mu pikiem chromatograficznym, wyrażone w [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$].



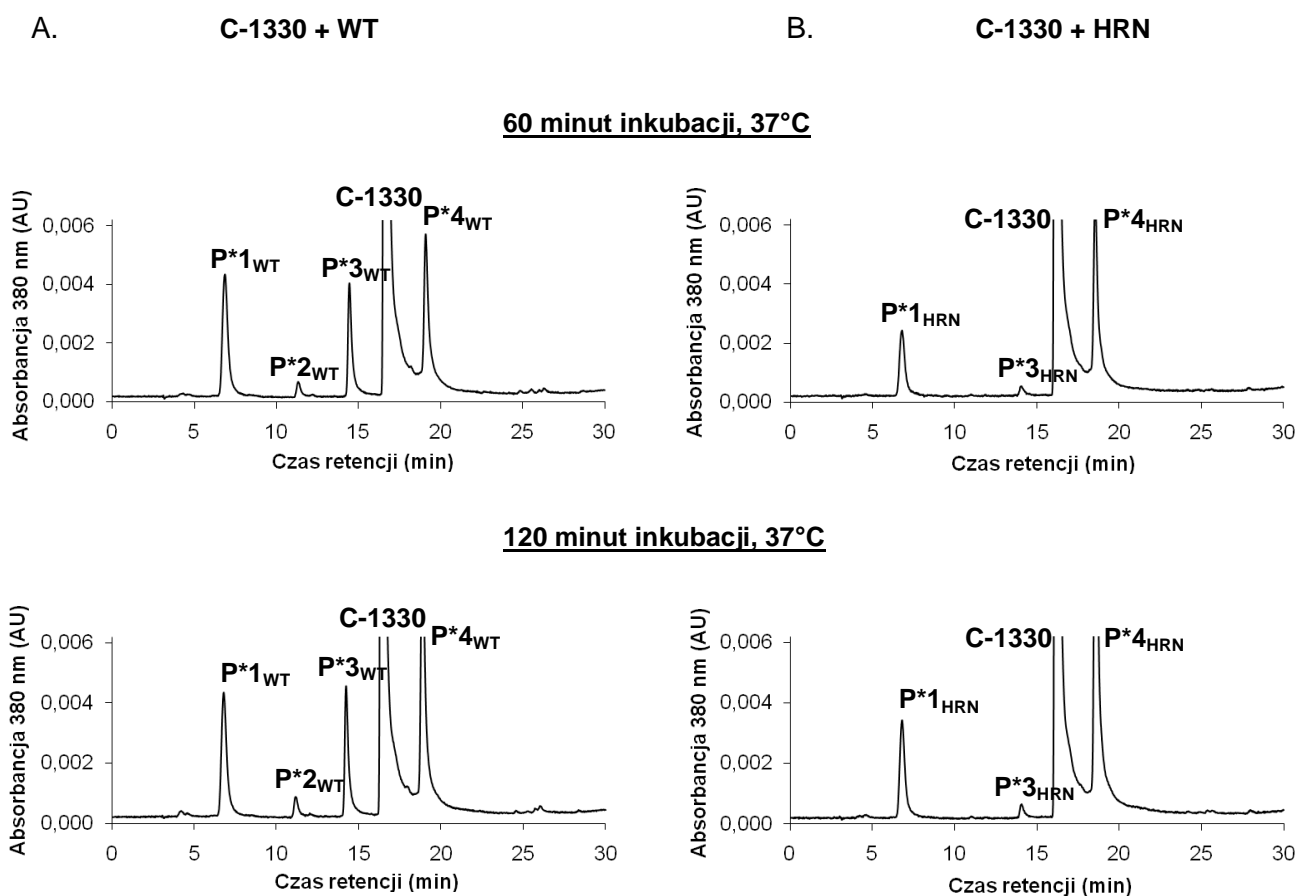
Rys.55. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 i 120 minutach inkubacji 0,2 mM C-1311, 2 mM NADPH i 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT (HRN) [chromatograf HPLC Waters Breeze].



Rys.56. Porównanie stężeń metabolitów P1 i P2 powstających w reakcji C-1311 z enzymami frakcji mikrosomalnej WT i HRN w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.

IV.1.4.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN.

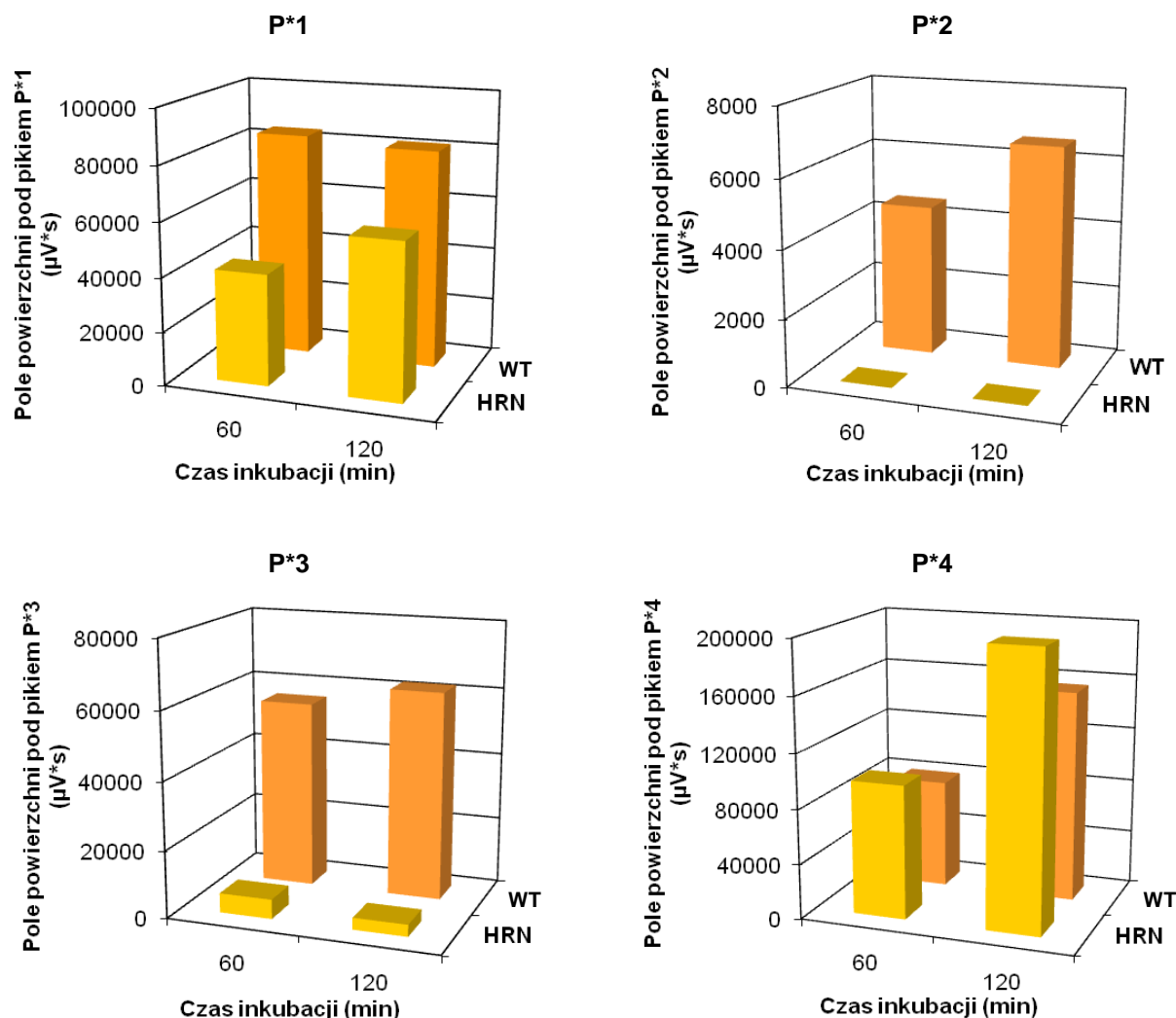
Jak wynika z kolejnych chromatogramów (Rys.57), pochodna imidazoakrydonu o symbolu C-1330 również okazała się wrażliwa na biotransformację w obecności enzymów obu badanych frakcji mikrosomalnych. Stosując identyczne warunki prowadzenia reakcji i układ chromatograficzny, jak dla badań metabolizmu związku C-1311, zaobserwowałam dla związku C-1330 powstawanie czterech różnych produktów.



Rys.57. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 i 120 minutach inkubacji 0,2 mM C-1330, 2 mM NADPH i 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT (HRN) [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Pik produktu P*1 posiadał krótki czas retencji, zbliżony do czasu retencji pików P1, produktu metabolizmu związku C-1311. Jego intensywność była wyższa w przypadku frakcji mikrosomów WT niż HRN. Pik zawierający produkt P*2 był słabo widoczny na chromatogramie i wystąpił tylko w obecności frakcji mikrosomów myszy typu dzikiego. Kolejny pik metabolitu, P*3, także pojawił się przed pikiem substratu. Warto zwrócić uwagę, że jego intensywność obniżyła się, gdy zastosowałam mieszaninę enzymów nie zawierających CPR. Z kolei pik produktu P*4, o czasie retencji nieznacznie wyższym od

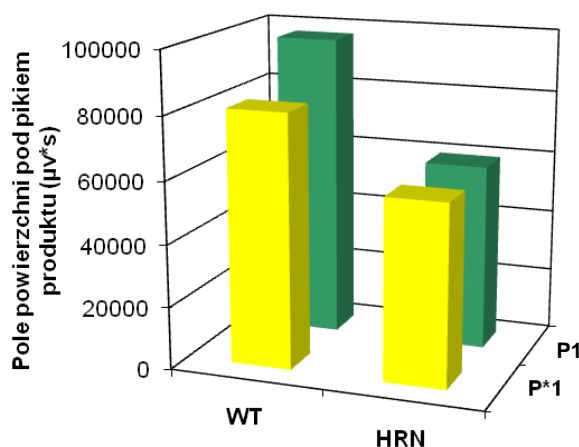
czasu retencji pików substratu, powstawał w większej ilości podczas przemian C-1330 wobec mikrosomów myszy HRN (Rys.58), tak jak to obserwowano dla pików P2 w przypadku C-1311.



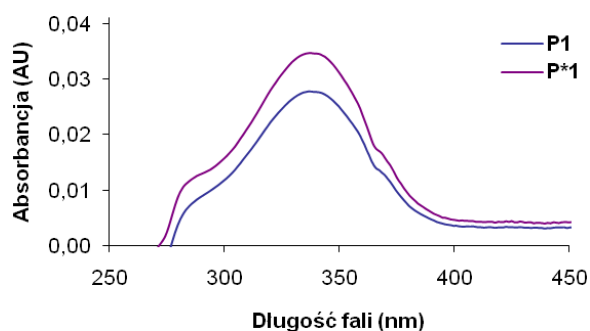
Rys.58. Porównanie stężeń metabolitów P*1, P*2, P*3 i P*4 powstających w reakcji C-1330 z enzymami frakcji mikrosomalnej WT i HRN w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.

Opierając się na powyższych obserwacjach mogłam stwierdzić, iż obie pochodne imidzoakrydonu, C-1311 i C-1330, ulegają przemianom metabolicznym zarówno wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT, jak i HRN, przy czym reaktywność związku C-1330 była większa w porównaniu do przemian C-1311. Metabolizm C-1330 prowadził do otrzymania czterech produktów, podczas gdy C-1311 do dwóch. W zależności od stosowanej frakcji mikrosomów dostrzegalne były różnice w intensywności poszczególnych pików metabolitów. Szczególną uwagę zwracają piki produktów: P1 (metabolit C-1311) oraz P*1 (metabolit C-1330), gdyż mają one ten sam czas retencji (Rys.55 i 57) a ich widma UV-vis są jednakowe (Rys.60). Takie wyniki pozwalają

przypuszczać, że przemiana metaboliczna C-1311 oraz C-1330 wobec enzymów obu badanych frakcji mikrosomalnych prowadzi do identycznego produktu.



Rys.59. Porównanie stężeń metabolitów P1 i P*1 powstających w reakcjach badanych związków z enzymami frakcji mikrosomalnej WT i HRN w zależności od źródła mikrosomów. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.



Rys.60. Porównanie widm UV-vis produktów P1 (metabolitu C-1311) i P*1 (metabolitu C-1330).

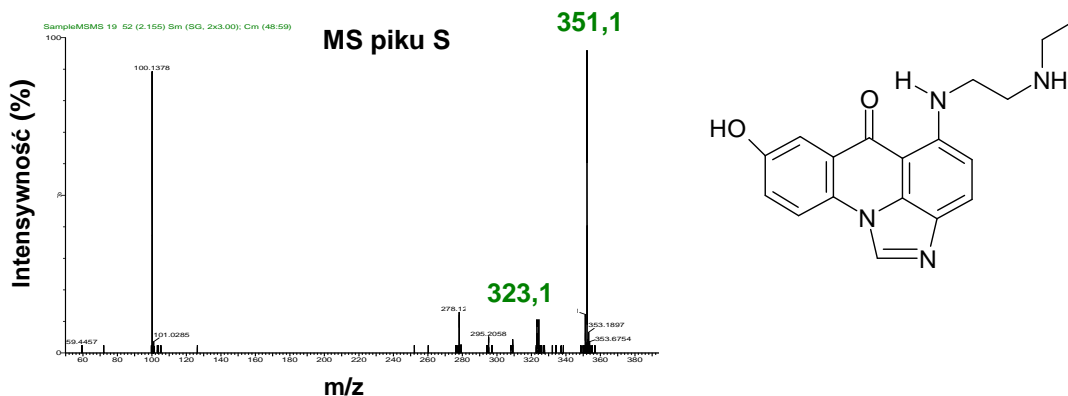
IV.1.4.5. Identyfikacja produktów reakcji C-1311 i C-1330 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT i HRN.

□ Produkty reakcji C-1311 z mikrosomami WT i HRN.

Jak opisałam wcześniej, podczas przemian metabolicznych C-1311 wobec enzymów mysich mikrosomów, zarówno WT, jak i HRN, zarejestrowałam dwa piki produktów, chociaż ich intensywność była różna w zależności od zastosowanej frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Dla uzyskania widm MS tych produktów wybrałam frakcję mikrosomów WT, gdyż w tym przypadku obserwowałam wyższe stężenie metabolitu P1.

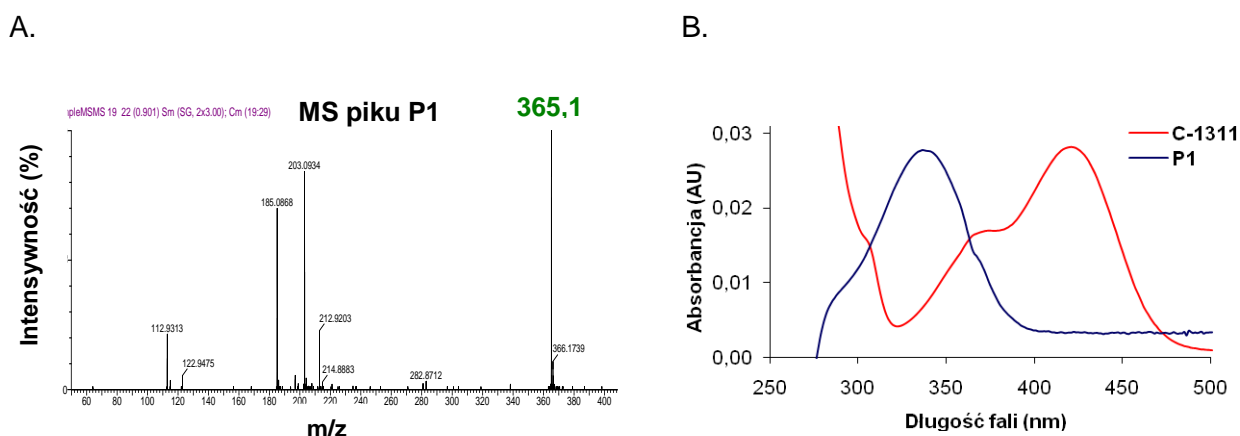
W widmie MS piku odpowiadającego substratowi, oprócz charakterystycznych dla C-1311 jonów masowych o wartościach m/z : 351,1 ($[M_S + 1]$) i 352,1 ($[M_S + 2]$), pojawiły się dwa dodatkowe jony masowe, o niewielkiej intensywności, dla których wartość m/z jest o 28

jednostek niższa od wartości m/z odpowiednich jonów masowych substratu (Rys.61). Jony te spełniają następujące zależności: $323,1 = [M_S - 28 + 1]$ i $324,1 = [M_S - 28 + 2]$. Fakt ten pozwala sądzić, że pik substratu zawierał prawdopodobnie pochodną związku C-1311 (oznaczoną jako P0), w której nastąpiła deetylacja w łańcuchu diaminoalkilowym ($323,1 = [M_S - M_{CH_2CH_3} + M_H + 1]$). Pik tego produktu nie został dobrze chromatograficznie rozdzielony od pików substratu.



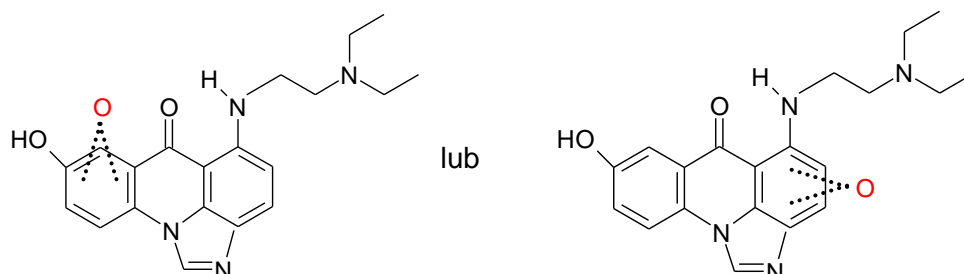
Rys.61. Widmo masowe pików substratu, C-1311 (czas retencji około 15 minut, Rys.55), i proponowana struktura produktu P0, $m/z = 323,1$.

W widmie MS otrzymanym dla pików produktu P1 widoczne są, m.in. jony masowe o wartościach m/z : 365,1 ($[M_S + 14 + 1]$) i 366,1 ($[M_S + 14 + 2]$), czyli o 14 jednostek m/z wyższych od charakterystycznych jonów masowych związku macierzystego (Rys.62A). Ponadto, widmo UV-vis tego metabolitu nie przypomina widma absorpcyjnego substratu, zatem prawdopodobne zmiany strukturalne nastąpiły w układzie heterocyklicznym (Rys.62B).



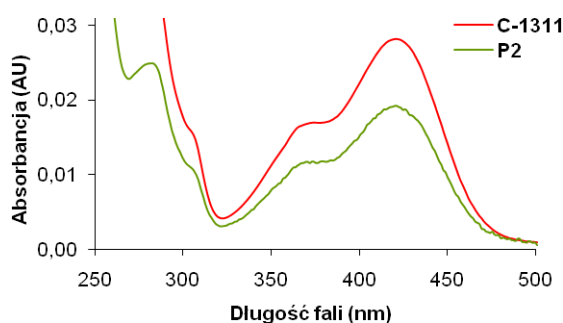
Rys.62. (A) Widmo masowe pików produktu P1 (czas retencji około 7 minut, Rys.55); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1311 i produktu P1 jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT (HRN).

Interpretacja powyższych danych wskazuje na obecność dodatkowego atomu tlenu w pierścieniu cząsteczki C-1311, a co więcej, przyłączenie atomu tlenu zachodzi z jednoczesną utratą dwóch atomów wodoru ($365,1 = [M_S + M_O - 2M_H + 1]$). Na tej podstawie mogłam zaproponować, że produkt P1 to być może pochodna C-1311 z ugrupowaniem epoksydowym w jednym z pierścieni imidazoakrydonu.



Rys.63. Proponowana struktura produktu P1, $m/z = 365,1$.

Nie udało się niestety uzyskać widma MS pików produktu P2, jednakże analiza spektralna ujawniła, iż metabolit ten posiada widmo UV-vis identyczne z widmem UV-vis C-1311 (Rys.64). Informacja ta wskazuje na obecność w strukturze produktu P2 niezmienionego układu pierścieniowego z prawdopodobnymi modyfikacjami w łańcuchu diaminoalkilowym. Co więcej, zbliżone czasy retencji pików substratu i P2 wskazują na podobną polarność obu związków. Biorąc pod uwagę fakt wystąpienia śladu produktu P0 w widmie MS pików substratu można przypuszczać, iż P2 to właśnie pochodna P0, czyli produkt deetylacji C-1311.



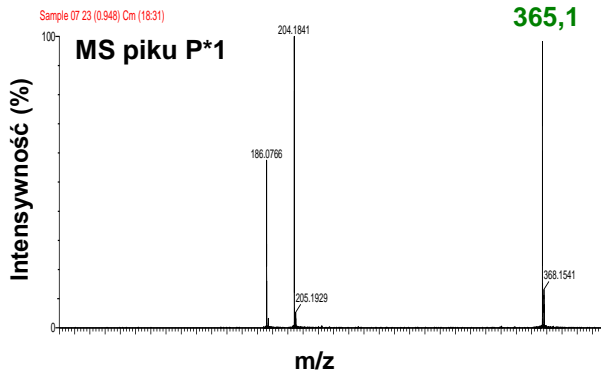
Rys.64. Porównanie widm UV-vis związku C-1311 i produktu P2 (czas retencji około 17 minut, Rys.55) jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT (HRN).

□ Produkty reakcji C-1330 z mikrosomami WT i HRN.

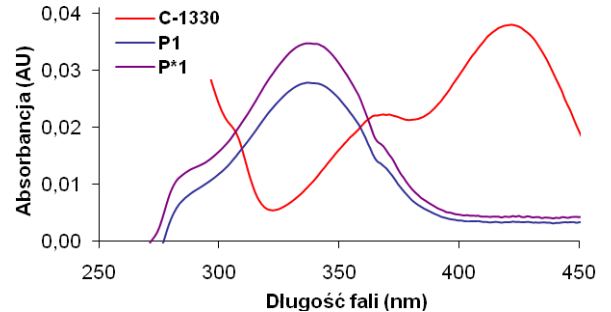
Podobne badania, jakie omówiłam dla związku C-1311, przeprowadziłam również dla pochodnej imidazoakrydonu C-1330. Widma MS poszczególnych pików chromatograficznych

zarejestrowałam dla reakcji wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT.

A.



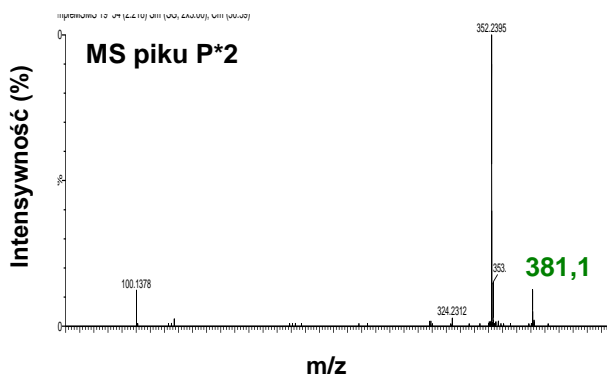
B.



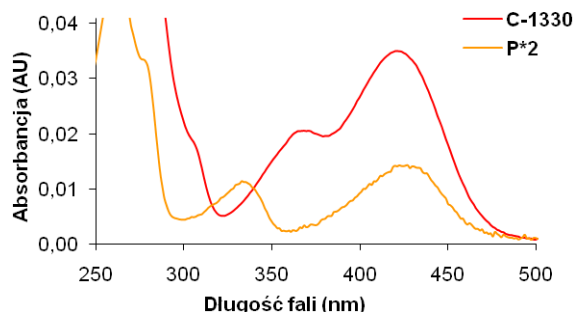
Rys.65. (A) Widmo masowe piku produktu P*1 (czas retencji około 7 minut, Rys.57); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1330, produktu P*1 jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT (HRN) i produktu P1 (metabolitu C-1311).

W widmie MS piku produktu P*1 najintensywniejszy jon masowy posiada wartość m/z 365,1, dokładnie taką jaką odpowiada związkowi C-1330 (Rys.65A). Jednakże czas retencji oraz widmo UV-vis tego metabolitu nie są takie same jak substratu (Rys.65B). Zwraca uwagę także fakt, że analogiczny jon masowy był obecny w widmie MS piku produktu P1 związku C-1311 (Rys.62A). Identyczność widm MS (zarówno jonów masowych jak i ich fragmentacji), czasów retencji i widm absorpcyjnych produktów P1 i P*1 pozwala sądzić, iż mamy do czynienia z tym samym produktem przemian metabolicznych, który zidentyfikowałam jako pochodną C-1311 z dodatkowym atomem tlenu, prawdopodobnie epoksydowym, w pierścieniu cząsteczki imidzoakrydonu (Rys.63).

A.

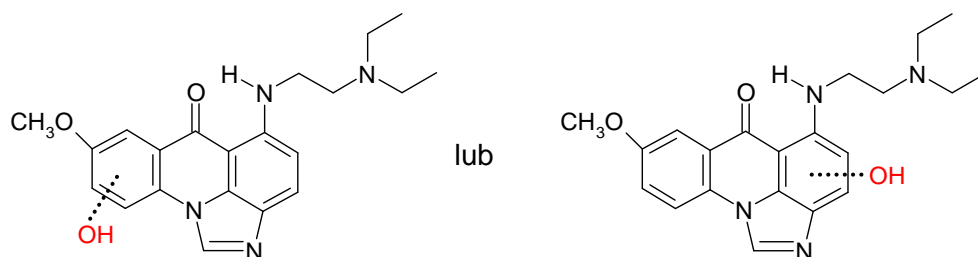


B.

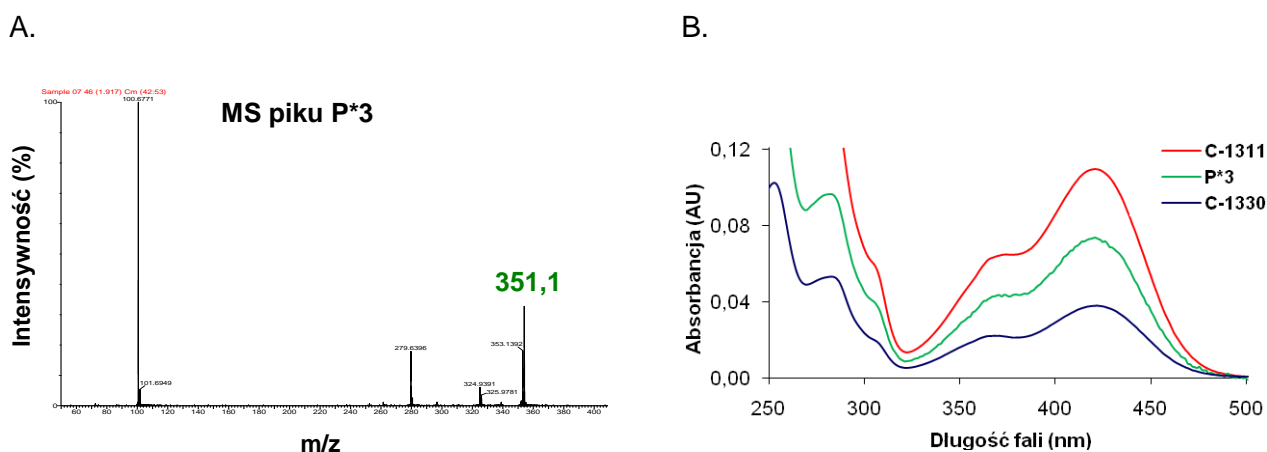


Rys.66. (A) Widmo masowe piku produktu P*2 (czas retencji około 12 minut, Rys.57); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1330 i produktu P*2 jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT.

Widmo MS pików produktu P*2, obserwowanego tylko podczas transformacji C1330 z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT, uwidacznia jon masowy o wartości m/z o 16 jednostek m/z wyższych od charakterystycznych dla substratu (Rys.66A). Spełnia on następującą zależność: $381,1 = [M_S + 16 + 1]$. Pozwala to wysunąć wniosek, że być może metabolit P*2 jest utlenioną formą C-1330. Widmo absorpcyjne tego metabolitu znacznie różni się od widma UV-vis badanego substratu (Rys.66B), jest jednak, co ciekawe, bardzo zbliżone do widma UV-vis 1-aminoakrydonu, co nasuwa przypuszczenie, że mogło też nastąpić jednoczesne otwarcie pierścienia imidazolowego.



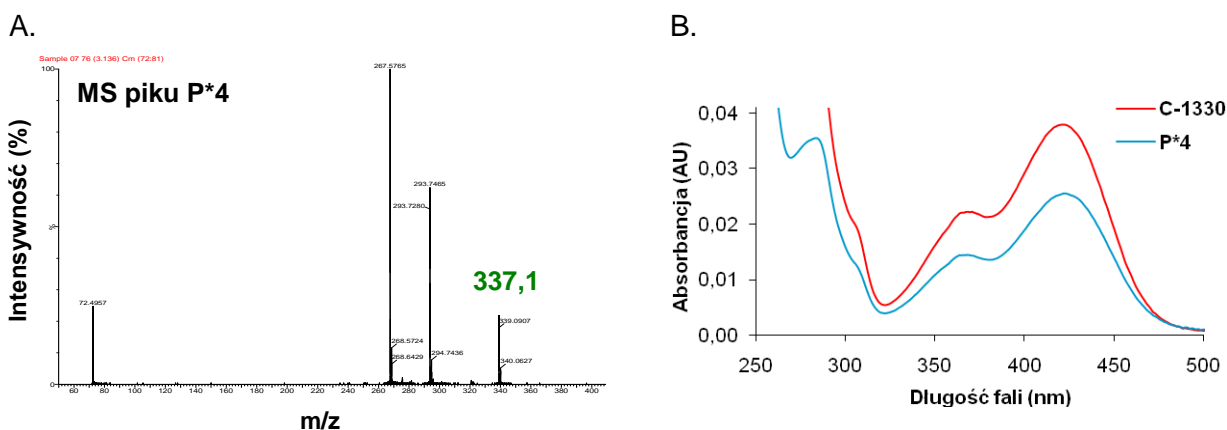
Rys.67. Proponowana struktura produktu P*2, $m/z = 381,1$.



Rys.68. (A) Widmo masowe pików produktu P*3 (czas retencji około 15 minut, Rys.57); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1330, produktu P*3 jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT (HRN) i C-1311.

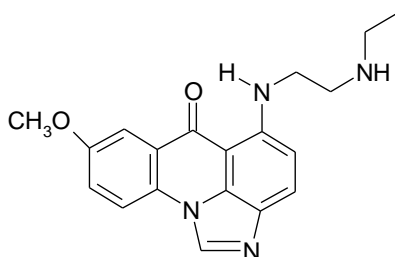
Widmo MS pików produktu P*3 zawiera jon masowy o m/z 351,1, co odpowiada zależności: $[M_S - 14 + 1]$ (Rys.68A). Człon (-14) tego równania rozpisany w postaci $(-15 + 1)$ można interpretować jako masę odszczepionej grupy metylowej powiększoną o masę jednego atomu wodoru, a zatem $351,1 = [M_S - M_{CH_3} + M_H + 1]$. Oznaczałoby to, że kolejnym produktem przemian C-1330, powstającym głównie wobec enzymów obecnych we frakcji mikrosomalnej posiadającej aktywny gen CPR, jest związek C-1311. Czasy retencji oraz widma UV-vis analizowanego metabolitu i hydroksylowej pochodnej imidzoakrydonu są ze sobą zgodne (Rys.68B). Dodatkowo, w widmach MS pików P*3 i C-1311 pojawił się także jon

fragmentacyjny, którego wartość m/z 278,1 jest o 73 jednostki mniejsza od wartości m/z jonu macierzystego. Wartość 73 odpowiada masie ugrupowania aminodietylowego, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, odłączonego od cząsteczki C-1311. Obecność C-1311 w szlaku przemian C-1330 wyjaśniłoby więc pojawienie się, zaproponowanego wcześniej, wspólnego dla obu związków produktu (P*1 i P1), będącego utlenioną pochodną związku C-1311.



Rys.69. (A) Widmo masowe pików produktu P*4 (czas retencji około 19 minut, Rys.57); (B) Porównanie widm UV-vis związku C-1330 i produktu P*4 jego reakcji z enzymami frakcji mikrosomalnej WT (HRN).

W widmie MS pików P*4 obecny jest jon masowy, którego wartość m/z jest o 28 jednostek mniejsza od wartości m/z charakterystycznej dla jonu masowego C-1330, $337,1 = [M_s - 28 + 1]$ (Rys.69A). Analogicznie, jak w przypadku C-1311, można się spodziewać, iż metabolit ten jest pochodną C-1330 pozbawioną jednej z grup etylowych w łańcuchu diaminoalkilowym. Przemawia za tym także podobieństwo widm UV-vis substratu i produktu P*4, które wyraźnie wskazuje na brak zmian strukturalnych w układzie pierścieniowym (Rys.69B).

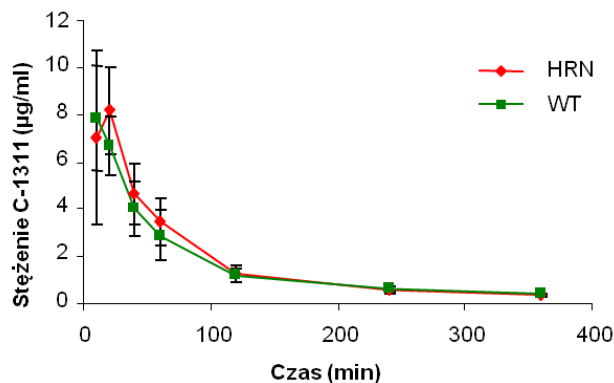


Rys.70. Proponowana struktura produktu P*4, $m/z = 337,1$.

IV.1.4.6. Wyniki badań farmakokinetycznych związku C-1311 u myszy WT i HRN.

Myszom doświadczalnym, zarówno typu WT, jak i HRN, podano dootrzewnowo związek C-1311 (roztwór w buforowanej soli fizjologicznej, PBS, pH ~ 7,4, o stężeniu 5 mg/ml) w dawce 50 mg na kg masy ciała, po czym pobrano im krew, w której zmierzono stężenie niemetabolizowanego związku. Pozwoliło to określić tempo eliminacji pochodnej

imidzoakrydonu w czasie, tj. po 10, 20, 40, 60 minutach oraz 2, 4 i 6 godzinach od momentu podania związku, co przedstawiłam na Rys.71. Wyznaczone zostały również niektóre parametry farmakokinetyczne, które charakteryzują zależności między podaną dawką a stężeniem związku we krwi (Tabela 1). Stężenie C-1311, który nie uległ metabolizmowi, zostało dodatkowo zbadane w moczu myszy obu genotypów (Tabela 2).



Rys.71. Eliminacja związku C-1311 z krwi myszy WT i HRN; dawka związku: 50 mg/kg. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Tabela 1. Parametry farmakokinetyczne¹¹ C-1311.

Parametr farmakokinetyczny	Jednostka	HRN	WT
AUC 0→360	min*µg/ml	623,5 ± 136,7	570,6 ± 109,6
AUC 0→∞	min*µg/ml	683,3 ± 135,3	634,3 ± 118,5
CL	ml/min/kg	75,4 ± 14,9	81,2 ± 17,1
C _{max}	µg/ml	8,7 ± 2,7	8,3 ± 1,4
biologiczny okres półtrwania	min	130,6 ± 20,6	127,5 ± 5,8

Tabela 2. Stężenie C-1311 w moczu myszy WT i HRN.

Genotyp	Numer myszy	Czas od podania C-1311 (godz.)	Stężenie C-1311 (µg/ml)	Objętość badanej próbki moczu (µl)
HRN	2	4	4,1	13
WT	3	4	4,6	20
WT	4	4	4,2	8
HRN	1	6	4,6	20
WT	4	6	3,0	17,5
HRN	1	24	1,2	175
HRN	2	24	0,8	285
WT	3	24	1,1	150
WT	4	24	1,1	22

¹¹ AUC (ang. *area under the curve*) – pole pod krzywą stężeń – miara ilości leku jaka dociera do krążenia ogólnego w postaci nie zmienionej;

CL – klirens leku – objętość krwi oczyszczana z leku w jednostce czasu, jest miarą wydajności eliminacji leku; C_{max} – największe stężenie leku obserwowane we krwi natychmiast po dożylnym podaniu lub po pewnym czasie od chwili pozanaczyniowego podania leku (wg Kostowski i wsp. *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Wydanie II poprawione. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001, ss. 67 – 70).

Okazało się, że C-1311 był tylko nieco wolniej usuwany z krwi i moczu myszy HRN niż myszy WT. Taki wynik wskazał, że obecne w komórkach wątroby izoenzymy cytochromu P450, których prawidłowe funkcjonowanie jest uwarunkowane obecnością i odpowiednią ilością CPR, nie odgrywają kluczowej roli w aktywacji metabolicznej badanej pochodnej imidazoakrydonu.

IV.1.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.1.

Zestawiając wyniki badań zrealizowanych w ramach pierwszego etapu prezentowanej pracy wykazałam m.in., że:

- ❖ Rekombinantowe ludzkie izoenzymy FMO1 i FMO3, ale nie FMO5, są skutecznymi enzymami w metabolizmie obydwu badanych pochodnych imidazoakrydonu. Produkt metabolizmu wobec FMO zidentyfikowałam jako N-tlenek na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym badanych związków.
- ❖ Spośród obu analogów imidazoakrydonu tylko C-1311 był efektywnie sprzęgany w mieszaninie enzymów mikrosomalnych i wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT1A1 z kwasem glukuronowym, prawdopodobnie do O-glukuronidu. Rekombinantowy ludzki izoenzym UGT2B7 nie katalizował przemian C-1311.
- ❖ XO nie jest katalizatorem transformacji metabolicznych związku C-1311.
- ❖ C-1311 był w porównywalnym stopniu usuwany z krwi i moczu myszy WT i HRN.

IV.2. Badania wpływu C-1311 i C-1330 na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450.

Drugą hipotezą, postawioną na wstępie wobec braku istotnej reaktywności C-1311 i C-1330 inkubowanych z rekombinantowymi ludzkimi izoenzymami cytochromu P450 (Rys.25), było przypuszczenie, że badane związki mogą działać jako inhibitory niektórych enzymów z rodziny cytochromu P450. Podejmując próbę zweryfikowania tego założenia, w drugim z głównych etapów mojej pracy zbadalam i porównalam przemiany typowych substratów poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 w dwóch wariantach: przy braku i w obecności pochodnej imidazoakrydonu w środowisku reakcyjnym. Jednocześnie, dążyłam do uzyskania odpowiedzi na pytanie jaką rolę w inhibicji aktywności enzymów cytochromowych może pełnić podstawnik w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, różny dla C-1311 i C-1330.

Substratami cytochromów P450, które zastosowałam do rozpatrzenia postawionej hipotezy były: 7-etoksykumaryna, testosteron oraz imipramina. Korzystając z danych literaturowych opracowałam warunki prowadzenia reakcji i analiz wybranych substratów.

Obraz przemian metabolicznych poszczególnych substratów wobec odpowiadającym im izoenzymom cytochromu P450, bez i z udziałem badanego związku, poznałam, a następnie porównałam analizując w każdym przypadku stopień przemiany (przereagowania) substratu, stężenie (jako miarę szybkości powstawania) głównego metabolitu oraz procentową aktywność enzymu po zakończeniu reakcji.

- Stopień przemiany substratu wyznaczałam na podstawie wzoru 1 przedstawionego w IV.1.1.3.
- Ilość powstającego produktu obrazowałam zależnością:

$$A = f(t) \quad (\text{wzór 2})$$

gdzie:

A – pole powierzchni pod pikiem chromatograficznym odpowiadającym produktowi, będące miarą stężenia produktu [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$],

t – czas inkubacji mieszaniny reakcyjnej [min].

- Procentową aktywność enzymu (Y) obliczałam ze wzoru:

$$Y = (100 \cdot a) / b \text{ [\%]} \quad (\text{wzór 3})$$

gdzie:

a – pole powierzchni pod pikiem metabolitu po odpowiednim czasie trwania inkubacji z badanym związkiem [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]

b – pole powierzchni pod pikiem metabolitu po odpowiednim czasie trwania inkubacji bez udziału badanego związku [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]

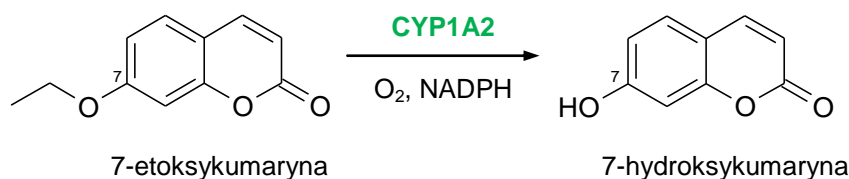
Wszystkie analizy chromatograficzne przeprowadziłam co najmniej dwukrotnie, zatem prezentowane wyniki są wartością średnią z wykonanych niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.2.1. Metabolizm 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2.

7-etoksykumaryna to dwupierścieniowy związek heterocykliczny, lakton kwasu o-hydroksycynamonowego (α -benzopiren) posiadający grupę etoksyłową w położeniu 7 pierścienia. Jest to syntetyczna pochodna kumaryny. Związki kumaryny są składnikami wielu roślin i jako tzw. metabolity wtórne usytuowane głównie w wakuolach komórek, wchodzą w skład olejków eterycznych. Niektóre z nich znalazły zastosowanie w lecznictwie jako silne leki przeciwzakrzepowe.

Głównym miejscem metabolizmu 7-etoksykumaryny w organizmie człowieka jest wątroba. Liczne przemiany metaboliczne tego związku są tu katalizowane przez szereg różnych enzymów cytochromu P450, m.in. izoenzymy CYP1A2 i CYP2E1. Pierwszy z wymienionych enzymów odgrywa zasadniczą rolę w procesie O-deetylacji, w wyniku którego powstaje 7-hydroksykumaryna, wg reakcji przedstawionej na Rys.72 [Yamazaki i wsp.,

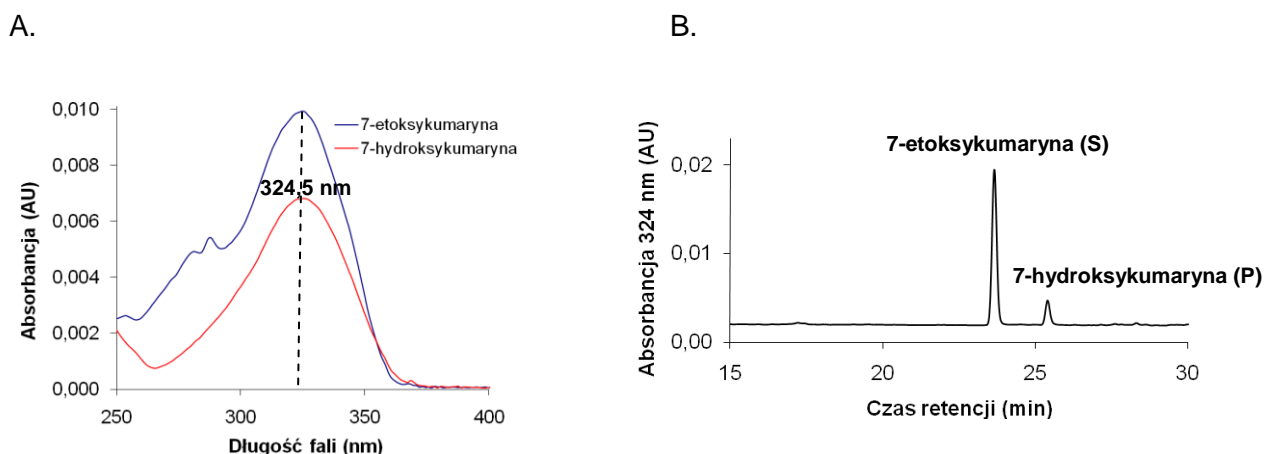
1999].



Rys.72. Schemat reakcji O-deetylacji 7-etoksykumaryny katalizowanej przez izoenzym CYP1A2.

IV.2.1.1. Opracowanie warunków reakcji 7-etoksykumaryny z CYP1A2.

Na wstępie sprawdziłam czy reakcję 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2 można kontrolować spektrofotometrycznie. Uzyskałam dość zbliżone widma UV-vis 7-etoksykumaryny i 7-hydroksykumaryny, z maksimum absorpcji przy długości fali około 324,5 nm (Rys.73A). Podobieństwo maksimum absorpcji substratu i produktu wykluczyła zastosowanie metody spektrofotometrycznej do analizy przebiegu tej reakcji, stąd zastosowałam w dalszej części badań metodę chromatograficzną (RP-HPLC). Ustalając warunki chromatograficzne, pozwalające obserwować zmiany stężeń 7-etoksykumaryny oraz jej głównego metabolitu w obecności izoenzymu CYP1A2, dobrałam odpowiednią kolumnę chromatograficzną (RP-C18) i określiłam optymalny skład eluentu. Na obrazie chromatograficznym składu mieszaniny reakcyjnej ostry pik substratu pojawił się jako pierwszy przy czasie retencji około 24 minut, zaś produkt reakcji przy czasie retencji około 25 minut (Rys.73B). Warunki podziału mieszanin reakcyjnych przedstawiłam w Części doświadczalnej (rozdział V.4.).



Rys.73. (A) Porównanie widm UV-vis 7-etoksykumaryny i jej metabolitu; (A) Liniowy obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM 7-etoksykumaryny, 1 mM NADPH i 0,05 μ M CYP1A2L [chromatograf HPLC Waters Breeze].

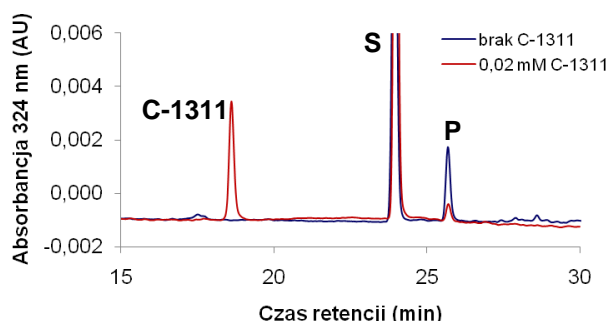
Następnym zadaniem było wybranie takiego zestawu stężeń reagentów

(7-etoksykumaryny, NADPH i enzymu) aby stopień przereagowania związku nie był zbyt wysoki. Porównując stopień przereagowania 7-etoksykumaryny dla kilku wybranych stężeń CYP1A2, o obniżonej (ang. *low* – L) aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450 (CYP1A2L), zdecydowałam, że optymalny stopień przemiany związku otrzymam, gdy stężenia składników mieszaniny reakcyjnej będą następujące: 7-etoksykumaryna – 0,02 mM, NADPH – 1 mM (co daje wzajemny stosunek ilości 7-etoksykumaryny do NADPH – 1:50), CYP1A2 – 0,05 μ M.

IV.2.1.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP1A2.

Przebieg metabolizmu 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2 w obecności C-1311 zanalizowałam metodą RP-HPLC dla kilku wybranych stężeń C-1311 (0,005; 0,01; 0,02 mM). Optymalny czas reakcji przyjąłam jako 30 minut, gdyż dalsze jego wydłużanie prowadziło do stanu równowagi kompleksu enzym-substrat. Jak widać na załączonym chromatogramie (Rys.74), obecność w środowisku reakcyjnym pochodnej imidazoakrydonu istotnie obniżyła ilość powstającego produktu, 7-hydroksykumaryny. Stężenie metabolitu było tym niższe, im wyższe było stężenie C-1311.

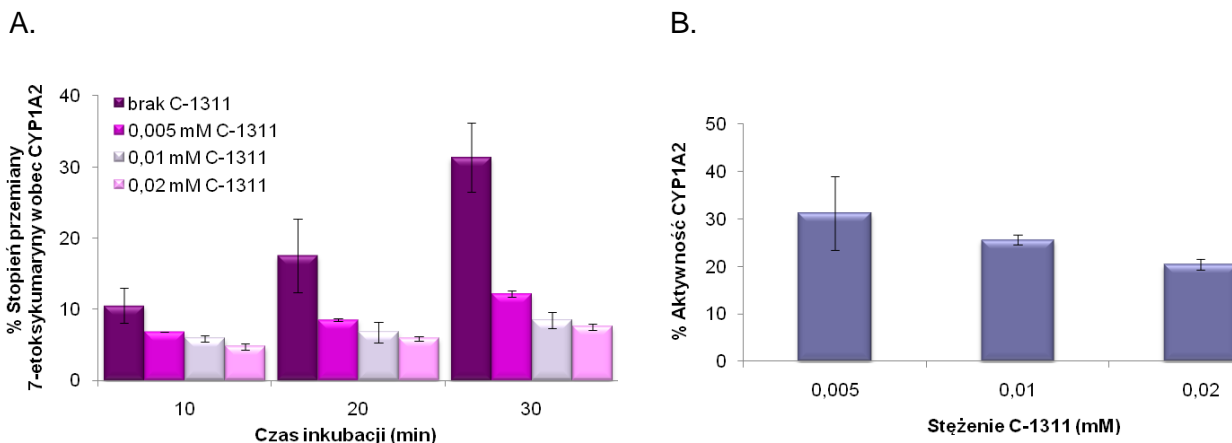
7-etoksykumaryna + CYP1A2 30 minut inkubacji, 37°C



Rys.74. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM 7-etoksykumaryny, 1 mM NADPH i 0,05 μ M CYP1A2L, bez i z udziałem 0,02 mM C-1311 [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Wyniki zmiany stopnia przereagowania 7-etoksykumaryny wobec izoenzymu CYP1A2, w reakcji bez i z udziałem C-1311, przedstawiłam na Rys.75A. Średni stopień przemiany związku po 30 minutach inkubacji z CYP1A2, przy braku C-1311 w środowisku reakcyjnym, wyniósł około 30%. Przy 0,005 mM stężeniu C-1311 stopień przereagowania 7-etoksykumaryny, po tym samym czasie inkubacji, obniżył się z 30% do około 12% a dla 0,02 mM C-1311 do około 8%. Przedstawione wyniki wykazały jednoznacznie, że badana pochodna imidazoakrydonu spowodowała zahamowanie reakcji katalizowanej przez CYP1A2, a zatem można uznać C-1311 za inhibitor tego enzymu. Zaobserwowałam też, iż

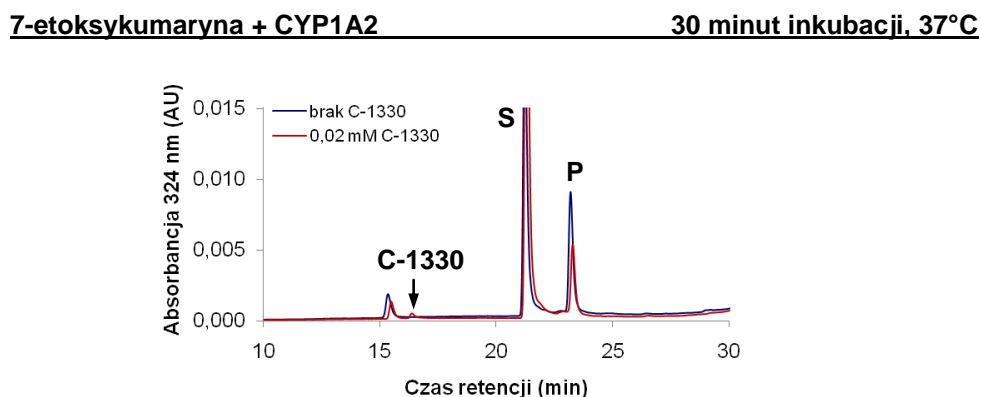
spadek aktywności CYP1A2 następował wprost proporcjonalnie do zwiększającego się stężenia C-1311, by przy 0,02 mM stężeniu inhibitora zachować tylko około 20% aktywności (Rys.75B).



Rys.75. (A) Porównanie stopnia przereagowania 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2, bez i z udziałem C-1311, w zależności od czasu inkubacji; (B) Porównanie aktywności CYP1A2 (dla 30 minut reakcji) w zależności od stężenia C-1311. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.2.1.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP1A2.

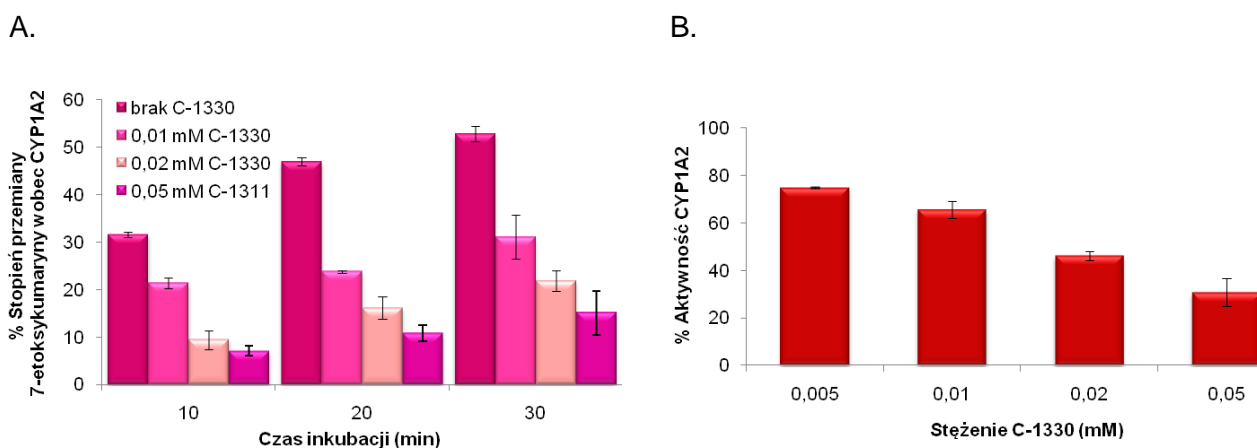
Wpływ C-1330 na aktywność izoenzymu CYP1A2 zbadalam analogicznie jak w przypadku C-1311, z tą różnicą, że w doświadczeniach zastosowałam izoenzym CYP1A2 charakteryzujący się podwyższoną (ang. *high* – H) aktywnością NADPH-reduktazy cytochromu P450 (CYP1A2H). Przemianę 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2 w obecności C-1330 obserwowałam stosując kilka wybranych stężeń pochodnej imidazoakrydonu (0,01, 0,02, 0,05 mM) oraz różne czasy inkubacji (0, 10, 20, 30 minut).



Rys.76. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM 7-etoksykumaryny, 1 mM NADPH i 0,05 μ M CYP1A2H, bez i z udziałem 0,02 mM C-1330 [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Porównując na otrzymanych chromatogramach wysokość pików 7-hydroksykumaryny w warunkach reakcji bez i z udziałem związku C-1330, dla tego samego czasu inkubacji, mogłam stwierdzić, iż ilość powstającego metabolitu malała stopniowo wraz ze wzrostem stężenia C-1330. Przykładowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych przedstawiłam na Rys.76.

Za miarę reaktywności 7-etoksykumaryny wobec izoenzymu CYP1A2, w reakcji bez i z udziałem C-1330, podobnie jak poprzednio, przyjąłam stopień przereagowania substratu. Analiza wykresów zamieszczonych na Rys.77A pokazuje, że średni stopień przemiany 7-etoksykumaryny po 30 minutach trwania reakcji bez udziału C-1330 wyniósł około 53%. Przy 0,01 mM stężeniu C-1330 stopień przereagowania 7-etoksykumaryny, dla tego samego czasu inkubacji, obniżył się do około 30% a przy pięciokrotnie wyższym stężeniu C-1330 do około 15%. Na podstawie powyższych wyników stwierdziłam, że pochodna imidzoakrydonu C-1330, podobnie jak C-1311, hamuje katalizowaną przez izoenzym CYP1A2 reakcję hydroksylacji 7-etoksykumaryny. Również tutaj, spadek aktywności enzymu był tym wyższy, im wyższe było stężenie C-1330 – od około 65% do 30% odpowiednio dla 0,01 i 0,05 mM stężenia inhibitora (Rys.77B).

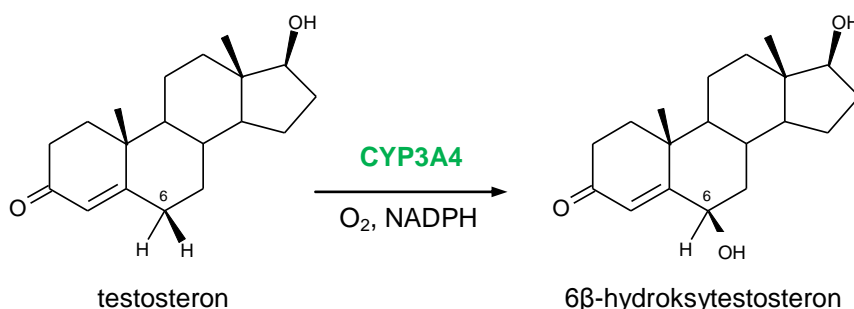


Rys.77. (A) Porównanie stopnia przereagowania 7-etoksykumaryny wobec CYP1A2, bez i z udziałem C-1330, w zależności od czasu inkubacji; (B) Porównanie aktywności CYP1A2 (dla 30 minut reakcji) w zależności od stężenia C-1330. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.2.2. Metabolizm testosteronu wobec CYP3A4.

Testosteron jest steroidem o 19 atomach węgla, pochodną Δ_4 -androstenu, z grupą ketonową w położeniu 3 oraz grupą hydroksylową w położeniu 17. Związek ten odpowiedzialny jest za wytworzenie drugorzędowych cech płciowych męskich, nasila procesy biosyntezy białka oraz ma silne działanie anaboliczne. Produkowany jest przez komórki śródmięzszowe Leydiga w jądrach, a także w niewielkich ilościach przez korę

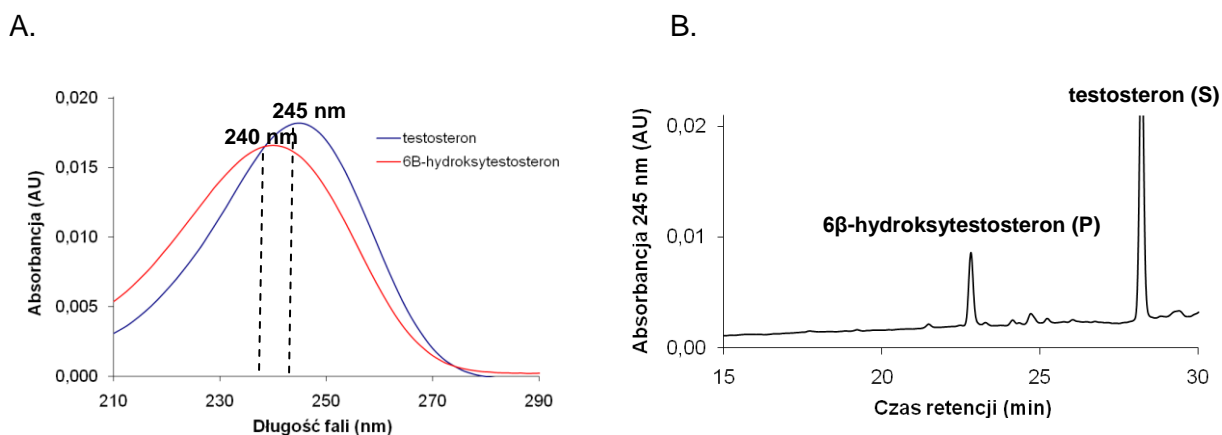
nadnerczy, jajniki i łożysko. Przemianę testosteronu do 6 β -hydroksytestosteronu w organizmie człowieka katalizuje izoenzym CYP3A4 cytochromu P450 (Rys.78) [Krauser i Guengerich, 2005].



Rys.78. Schemat reakcji 6 β -hydroksylacji testosteronu katalizowanej przez izoenzym CYP3A4.

IV.2.2.1. Opracowanie warunków reakcji testosteronu z CYP3A4.

Podobnie, jak w doświadczeniu dotyczącym metabolizmu 7-etoksykumaryny z CYP1A2, przed przystąpieniem do dalszych badań, zarejestrowałam widma UV-vis testosteronu i 6 β -hydroksytestosteronu. Zaobserwowane przesunięcie maksimum absorpcji metabolitu względem maksimum absorpcji substratu w kierunku niższych wartości długości fali (Rys.79A) było zbyt małe aby zastosować analizę spektrofotometryczną dla kontroli przebiegu reakcji. Dlatego dalsze badania przemiany testosteronu wobec CYP3A4 prowadziłam, podobnie jak w przypadku 7-etoksykumaryny, metodą RP-HPLC. Określiłam warunki podziału mieszanin reakcyjnych, a następnie położenie pików testosteronu i jego metabolitu na chromatogramie. Pik substratu pojawił się przy czasie retencji około 28 minut, a poprzedzający go pik produktu przy czasie retencji około 23 minut (Rys.79B).



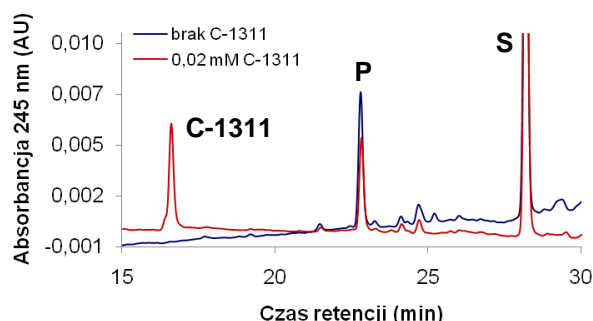
Rys.79. (A) Porównanie widm UV-vis testosteronu i jego metabolitu; (B) Liniowy obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM testosteronu, 0,5 mM NADPH i 0,05 μ M CYP3A4L [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Ustaliłam też najkorzystniejsze dla przebiegu reakcji enzymatycznej stężenia reagentów. Przyjmując optymalne stężenie testosteronu jako 0,02 mM, zaś stężenie izoenzymu CYP3A4 początkowo 0,1 μ M (przy stężeniu NADPH 1 mM), a następnie 0,05 μ M (przy stężeniu NADPH 0,5 mM) porównałam stopień przereagowania testosteronu w tych warunkach. Do dalszych badań wybrałam drugi z zaproponowanych zestawów stężeń reagentów, ponieważ stopień przemiany substratu nie przekroczył tu 40% po 30 minutach inkubacji.

IV.2.2.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP3A4.

Zamierzając sprawdzić wpływ C-1311 na przebieg reakcji 6 β -hydroksylacji testosteronu przeprowadziłam analizę chromatograficzną składu mieszanin reakcyjnych dla trzech różnych stężeń pochodnej imidazoakrydonu: 0,005; 0,01; 0,02 mM. Następnie porównałam ilość głównego metabolitu testosteronu oraz stopień przereagowania substratu uzyskane dla reakcji bez i z udziałem C-1311 w zależności od czasu inkubacji. Spostrzegłam, że obecność C-1311 w środowisku reakcji powodowała wyraźne obniżenie stężenia 6 β -hydroksyttestosteronu (Rys.80). Ilość powstającego metabolitu malała równomiernie ze wzrostem stężenia C-1311.

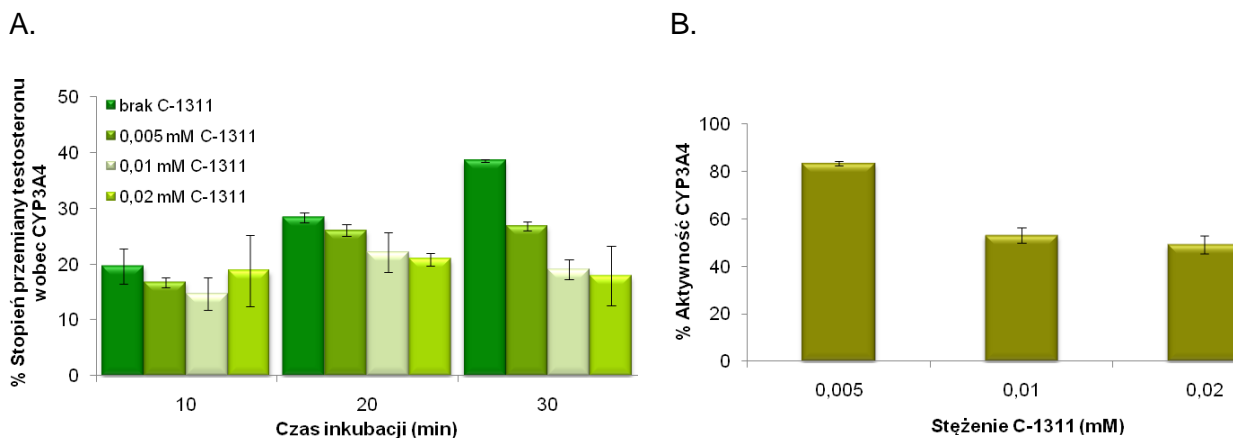
testosteron + CYP3A4 30 minut inkubacji, 37°C



Rys.80. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM testosteronu, 0,5 mM NADPH i 0,05 μ M CYP3A4L, bez i z udziałem 0,02 mM C-1311 [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Analizując reaktywność testosteronu wobec CYP3A4 w zależności od stężenia C-1311 mogłam stwierdzić, że przy 0,02 mM stężeniu imidazoakrydonu stopień przemiany substratu, po 30 minutach trwania inkubacji, zmniejszył się niemal o połowę w stosunku do wartości obserwowanej przy braku C-1311 w mieszaninie reakcyjnej. Jak widać na Rys.81A, stopniowe wydłużanie czasu reakcji o 10 minut prowadziło do pogłębienia się różnicy w stopniu przereagowania substratu CYP3A4 przy 0,005 a 0,01 i 0,02 mM C-1311. Wobec powyższych wyników ustaliłam, że C-1311 posiada zdolność hamowania aktywności

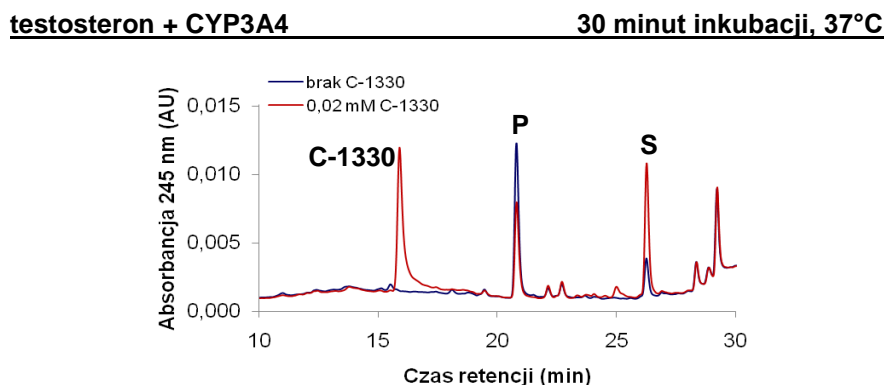
izoenzymu CYP3A4. Jak przedstawia wykres słupkowy na Rys.81B, 0,005 mM C-1311 spowodował utratę aktywności enzymu o około 20%, zaś kolejne wielokrotności tego stężenia inhibitora przyczyniły się do zahamowania funkcji katalitycznej CYP3A4 o kolejne 30%.



Rys.81. (A) Porównanie stopnia przereagowania testosteronu wobec CYP3A4, bez i z udziałem C-1311, w zależności od czasu inkubacji; (B) Porównanie aktywności CYP3A4 (dla 30 minut reakcji) w zależności od stężenia C-1311. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

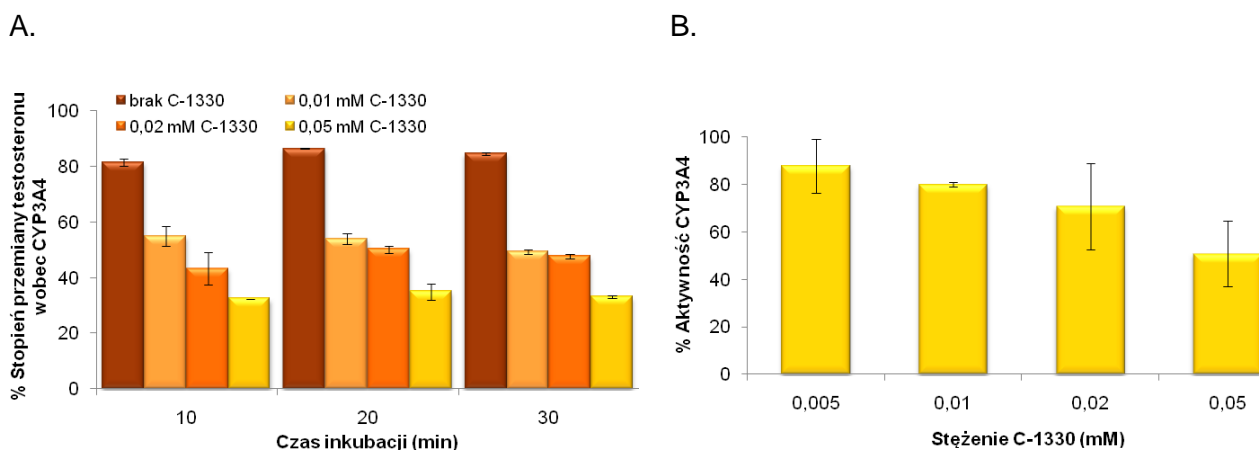
IV.2.2.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP3A4.

Znając obraz przemian metabolicznych testosteronu z izoenzymem CYP3A4 zbadalam także wpływ 8-metoksyłowej pochodnej C-1311 na wydajność reakcji katalizowanej przez ten enzym. Porównując intensywność pików metabolitu otrzymanego w reakcji bez udziału C-1330 oraz z niższym i wyższym stężeniem tego związku zauważyłam, iż wzrost stężenia C-1330 w mieszaninie reakcyjnej zdecydowanie osłabiał metabolizm testosteronu wobec CYP3A4 (Rys.82).



Rys.82. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 30 minutach inkubacji (37°C) 0,02 mM testosteronu, 0,5 mM NADPH i 0,05 µM CYP3A4H, bez i z udziałem 0,02 mM C-1330 [chromatograf HPLC Waters Breeze].

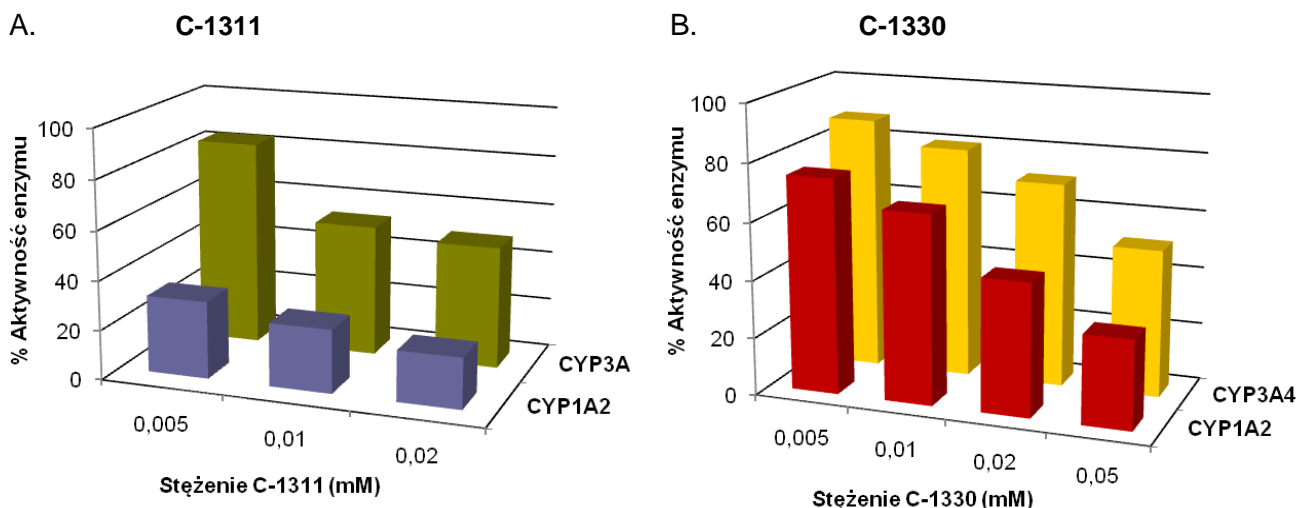
Dodatkowe informacje na temat wpływu C-1330 na aktywność CYP3A4 uzyskałam analizując stopień przemiany testosteronu w zależności od stężenia C-1330 dla różnych czasów inkubacji (Rys.83A). Zaobserwowałam istotne różnice w przebiegu metabolizmu testosteronu w obecności i bez C-1330, które już tylko w niewielkim stopniu zmieniały się wraz z postępem reakcji. Ponadto, mogłam stwierdzić, że 0,05 mM C-1330 powodował największe, z około 80% do 30%, obniżenie stopnia przereagowania testosteronu wobec izoenzymu CYP3A4. Zaprezentowane wyniki badań niewątpliwie świadczą o występowaniu inhibicji aktywności izoenzymu CYP3A4 przez związek C-1330. Wykres słupkowy na Rys.83B ilustruje zależność pomiędzy aktywnością enzymu a stężeniem inhibitora – przy najwyższym stosowanym stężeniu C-1330 (0,05 mM) nastąpiła największa utrata zdolności katalitycznej CYP3A4 (około 50%).



Rys.83. (A) Porównanie stopnia przereagowania testosteronu wobec CYP3A4, bez i z udziałem C-1330, w zależności od czasu inkubacji; (B) Porównanie aktywności CYP3A4 (dla 30 minut reakcji) w zależności od stężenia C-1330. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

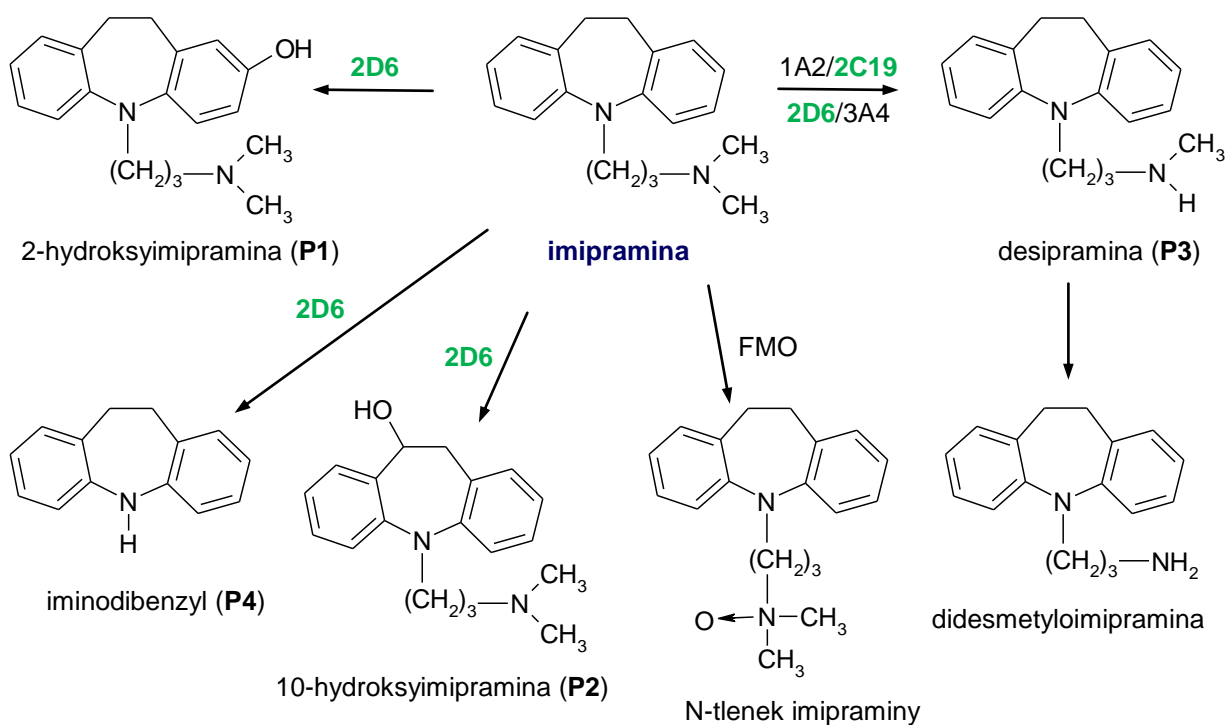
Porównanie wpływu C-1311 i C-1330 na aktywność izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4.

Oceniając zdolność badanych pochodnych imidzoakrydonu do inhibicji aktywności dwóch cytochromów P450 można stwierdzić silniejsze hamowanie aktywności izoenzymu CYP1A2 niż CYP3A4 zarówno przez C-1311, jak i C-1330 (Rys.84). Należy również zauważyć, iż większe różnice pomiędzy stopniem zahamowania funkcji katalitycznej CYP1A2 i CYP3A4 dla tego samego stężenia inhibitora zachodziły w przypadku C-1311. Otrzymane wyniki mogą, z jednej strony, wskazywać na występowanie podobieństw w sposobie oddziaływania związku C-1311 i C-1330 z danym enzymem, z drugiej strony, być przesłanką dla istnienia pewnych różnic w mechanizmie inhibicji aktywności obu izoenzymów cytochromu P450.



Rys.84. Porównanie aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 (dla 30 minut reakcji) w zależności od stężenia (A) C-1311 i (B) C-1330. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.

IV.2.3. Metabolizm imipraminy wobec CYP2C19 i CYP2D6.



Rys.85. Szlaki przemian metabolicznych imipraminy; produkty P1-4 oznaczono na Rys.86 i 89 (opracowanie własne na podstawie [Sequeira i Strobel, 1995]).

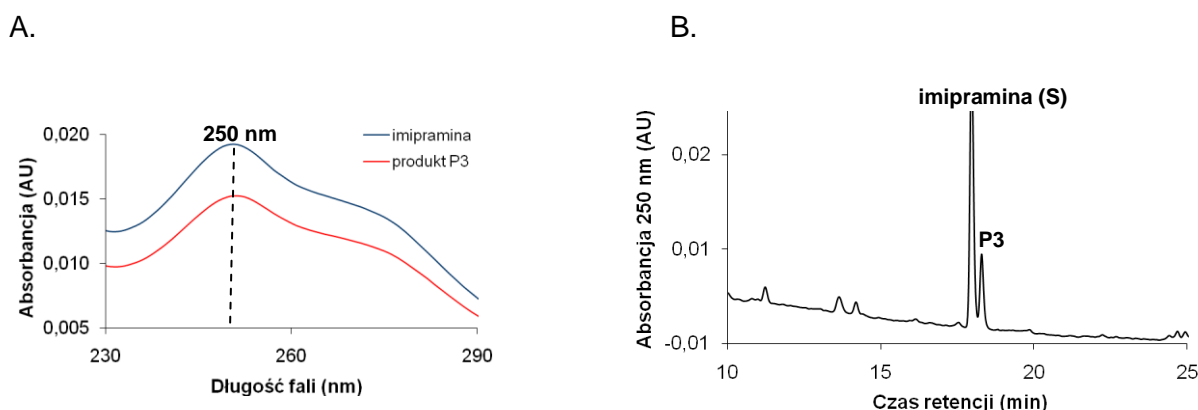
Imipramina (*Deprinol*, *Tofranil*) jest trójpierścieniowym lekiem przeciwdepresyjnym (TLPD) stosowanym w leczeniu objawów głębokiej depresji już od 1957 roku. Siedmoczłonowy pierścień heterocykliczny cząsteczki imipraminy stanowi azepina, skondensowana z dwoma niepodstawionymi pierścieniami benzenowymi. Związek ten działa

jako nieselektywny inhibitor wychwytu zwrotnego noradrenaliny i serotoniny. Obok silnego działania przeciwdepresyjnego, wpływa także na zwiększenie aktywności psychoruchowej (psychomotorycznej) [Bull i wsp., 1999].

Imipramina ulega w organizmie człowieka wielu przemianom. Szczególnie ważne są szlaki metaboliczne prowadzące do N-demetylacji, hydroksylacji oraz oksydacji grupy aminowej (Rys.85). W transformacje te zaangażowane są różne izoenzymy cytochromu P450. Enzym CYP2C19 katalizuje głównie reakcję N-demetylacji imipraminy, co prowadzi do powstania dwóch produktów biotransformacji: desipraminy i didesmetryloimipraminy. Aktywność izoenzymu CYP2D6 przyczynia się do powstania znacznej ilości 2-hydroksyimipraminy, głównego produktu hydroksylacji imipraminy [Sequeira i Strobel, 1995].

IV.2.3.1. Opracowanie warunków reakcji imipraminy z CYP2C19.

W pierwszym etapie badań nad metabolizmem imipraminy w obecności izoenzymu CYP2C19 ustaliłam, że maksima absorbancji w widmie widzialnym substratu i metabolitu występują przy podobnej długości fali (Rys.86A), stąd dalszą analizę przebiegu reakcji również, podobnie jak w przypadku 7-etoksykumaryny i testosteronu, kontrolowałam metodą RP-HPLC, z detekcją przy 250 nm. Analiza chromatograficzna składu mieszaniny reakcyjnej wskazała, iż pik imipraminy i jej głównego metabolitu (prawdopodobnie produktu demetylacji w łańcuchu bocznym – desipraminy, Rys.85) występują tuż obok siebie przy czasie retencji około 18 minut (Rys.86B).



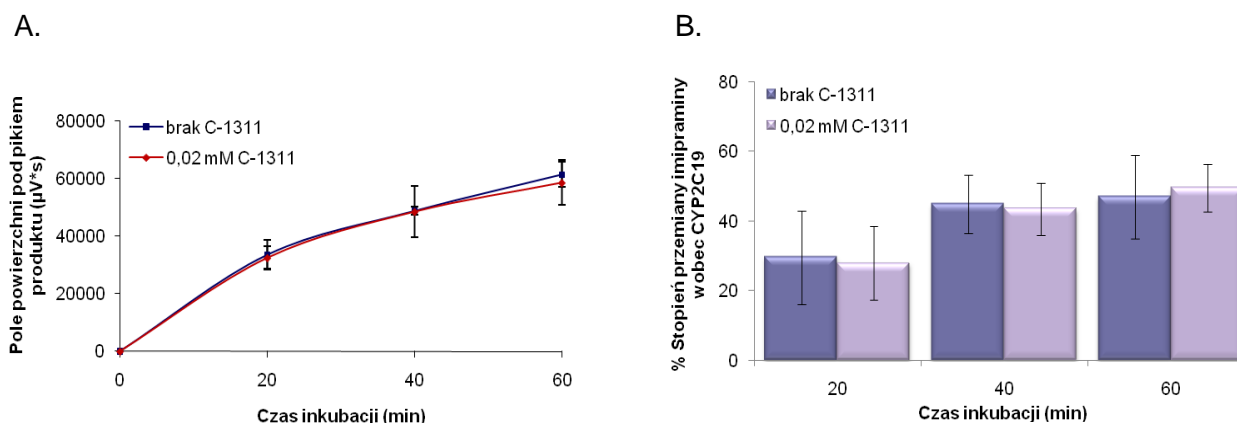
Rys.86. (A) Porównanie widm UV-vis imipraminy i jej metabolitu; (B) Liniowy obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,02 imipraminy, 0,5 mM NADPH i 0,1 μ M CYP2C19L [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Wstępne analizy chromatograficzne mieszanin reakcyjnych otrzymanych dla stałych stężeń: imipraminy (0,02 mM) oraz NADPH (0,5 mM) a zmiennego izoenzymu CYP2C19

pozwołyły wybrać optymalny do dalszych badań zestaw stężeń reagentów. Porównanie stopnia przemiany imipraminy w zależności od stężenia stosowanego enzymu wskazało, że korzystniej będzie stosować stężenia białka 0,05 μM . W tych warunkach stopień przereagowania imipraminy był bowiem porównywalny ze stopniem przemiany badanych wcześniej 7-etoksykumaryny oraz testosteronu. Za optymalny czas reakcji przyjąłem 60 minut.

IV.2.3.2. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP2C19.

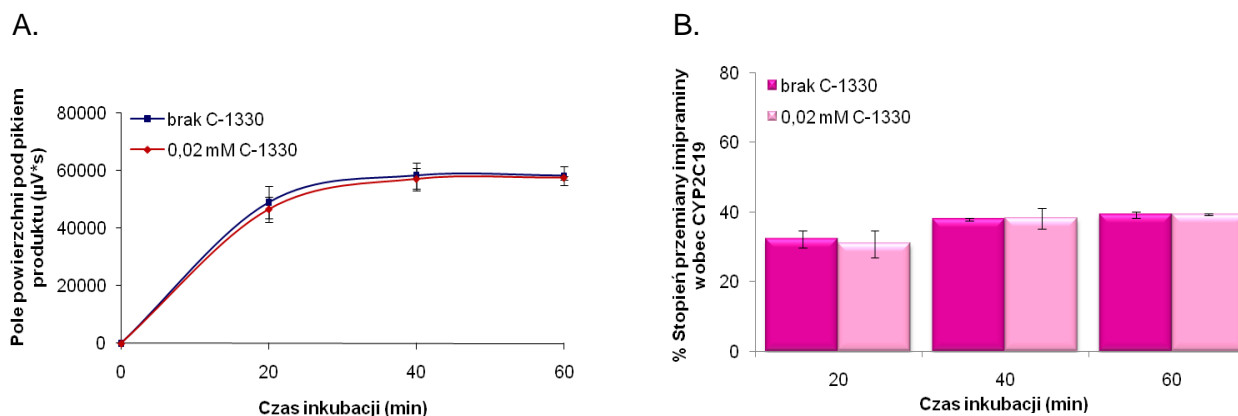
Dla poznania wpływu związku C-1311 na funkcjonowanie izoenzymu CYP2C19 mieszaninę imipraminy, NADPH i enzymu inkubowałam z 0,02 mM roztworem C-1311. Wyniki badań, przedstawione na kolejnych wykresach, wskazują, iż obecność pochodnej imidzoakrydonu w środowisku reakcji ani nie zmieniła ilości metabolitu imipraminy (Rys.87A), ani nie spowodowała znaczących zmian w stopniu przereagowania substratu (Rys.87B). Zatem, niezależnie od udziału C-1311 w przemianach metabolicznych imipraminy CYP2C19 zachował swoją pełną aktywność.



Rys.87. Porównanie (A) ilości metabolitu imipraminy i (B) stopnia przereagowania imipraminy wobec CYP2C19, bez i z udziałem C-1311, w zależności od czasu inkubacji; stężenia: substratu – 0,02 mM, NADPH – 0,5 mM, CYP2C19L – 0,05 μM , C-1311 – 0,02 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

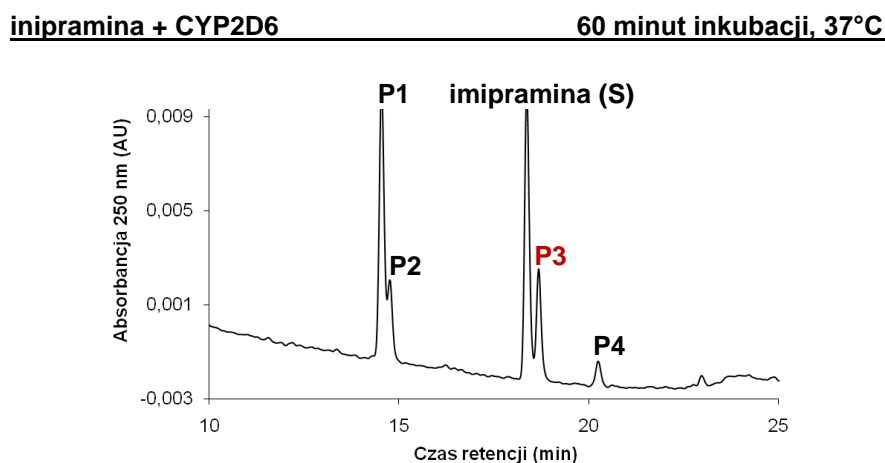
IV.2.3.3. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP2C19.

Obserwacje metabolizmu imipraminy wobec CYP2C19 przeprowadziłam bez udziału i w obecności 0,02 mM C-1330. Zobrazowane na Rys.88 wyniki badań wyraźnie sygnalizują, że C-1330, podobnie jak C-1311, nie hamował aktywności CYP2C19. Nie odnotowałam ani zmian w stężeniu metabolitu, ani też obniżenia reaktywności imipraminy wobec CYP2C19 w obecności C-1311.



Rys.88. Porównanie (A) ilości metabolitu imipraminy i (B) stopnia przereagowania imipraminy wobec CYP2C19, bez i z udziałem C-1330, w zależności od czasu inkubacji; stężenia: substratu – 0,02 mM, NADPH – 0,5 mM, CYP2C19H – 0,05 µM, C-1330 – 0,02 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.2.3.4. Opracowanie warunków reakcji imipraminy z CYP2D6.

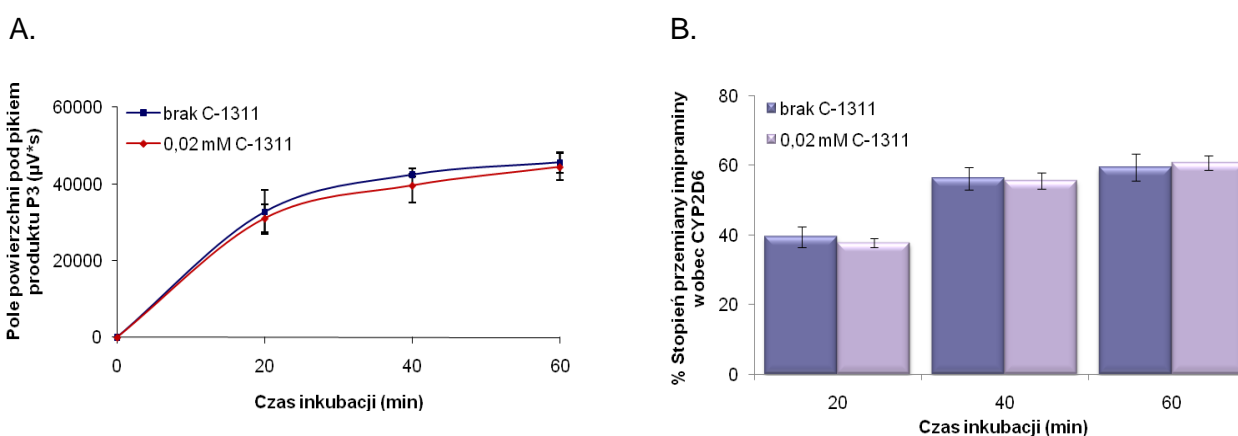


Rys.89. Liniowy obraz chromatograficzny składu mieszaniny reakcyjnej po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,02 imipraminy, 0,5 mM NADPH i 0,05 µM CYP2D6L [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Innym, poza CYP2C19, izoenzymem cytochromu P450 zaangażowanym w metabolizm imipraminy jest CYP2D6. Zgodnie z danymi literaturowymi na obrazie chromatograficznym składu mieszaniny reakcyjnej pojawiły się cztery główne piky produktów reakcji imipraminy z izoenzymem CYP2D6 [Sequeira i Strobel, 1995] (Rys.89). Pik metabolitu oznaczony jako P3 to ten sam, który identyfikowałam badając przemiany imipraminy wobec CYP2C19, nie obserwowałam natomiast poprzednio pików produktów P1, P2 i P4. Ze względu na zbieżność czasów retencji pików metabolitów P1 i P2 (prawdopodobnie 2- i 10-hydroksyimipraminy, wg schematu na Rys.85) z czasem retencji C-1311 oraz niewielką intensywność pików P4 (iminodibenzylu, Rys.85) wpływ obu pochodnych imidazoakrydonu na aktywność CYP2D6 zdecydowałam się zbadać na podstawie obserwacji zmian zachodzących w tworzeniu tylko produktu P3 (desipraminy).

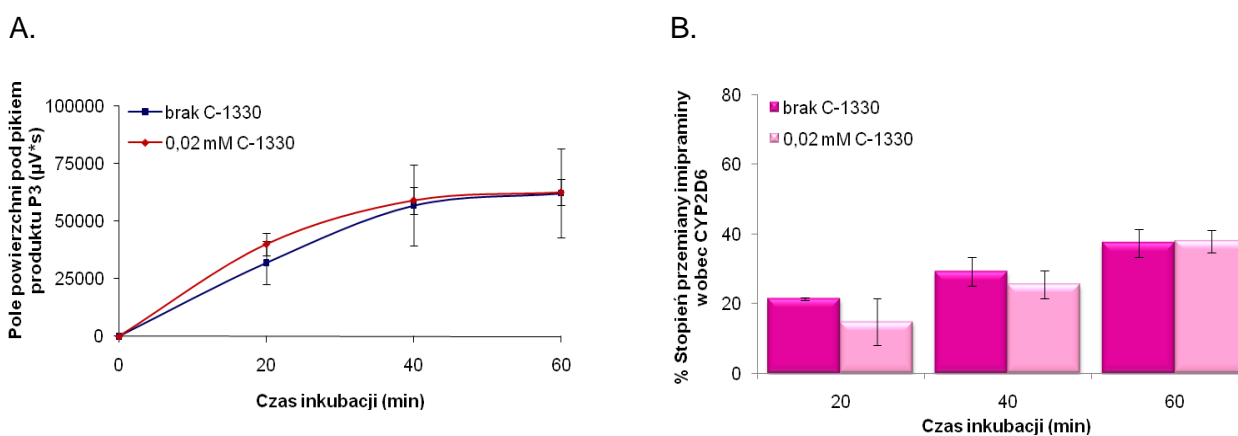
IV.2.3.5. Badania wpływu C-1311 na aktywność izoenzymu CYP2D6.

Wobec nie zaobserwowanego uprzednio wpływu C-1311 na przebieg metabolizmu imipraminy z CYP2C19, w kolejnym etapie mojej pracy dążyłam do określenia czy i jak zmienia się przemiana metaboliczna imipraminy wobec izoenzymu CYP2D6 w obecności pochodnej imidazoakrydonu. Na Rys.90 zamieściłam wykresy ilustrujące stężenie powstającego produktu oraz stopień przereagowania imipraminy w reakcji z 0,02 mM C-1311 w zależności od czasu inkubacji i porównałam je z wynikami uzyskanymi dla mieszanin reakcyjnych nie zawierających C-1311. Na ich podstawie mogłam stwierdzić, że C-1311 również nie hamuje przemian imipraminy katalizowanych przez izoenzym CYP2D6.



Rys.90. Porównanie (A) ilości metabolitu imipraminy i (B) stopnia przereagowania imipraminy wobec CYP2D6, bez i z udziałem C-1311, w zależności od czasu inkubacji; stężenia: substratu – 0,02 mM, NADPH – 0,5 mM, CYP2D6L – 0,05 μM, C-1311 – 0,02 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

IV.2.3.6. Badania wpływu C-1330 na aktywność izoenzymu CYP2D6.



Rys.91. Porównanie (A) ilości metabolitu imipraminy i (B) stopnia przereagowania imipraminy wobec CYP2D6, bez i z udziałem C-1330, w zależności od czasu inkubacji; stężenia: substratu – 0,02 mM, NADPH – 0,5 mM, CYP2D6H – 0,05 μM, C-1330 – 0,02 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Zważywszy na brak zdolności C-1311 do hamowania aktywności CYP2D6 sprawdziłam także wpływ jego analogu strukturalnego na funkcjonowanie tego enzymu. Stosując identyczne warunki reakcji uzyskałam wyniki, które przedstawiłam na Rys.91. Zarówno ilość metabolitu imipraminy, jak i stopień przereagowania substratu nie zmieniły się znacząco w obecności i przy braku C-1330 w mieszaninie reakcyjnej, co świadczy o wpływu C-1330 na reakcję katalizowaną przez izoenzym CYP2D6.

IV.2.4. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.2.

Wyniki badań dotyczących wpływu C-1311 i C-1330 na przemiany standardowych substratów izoenzymów cytochromu P450 wskazały, że:

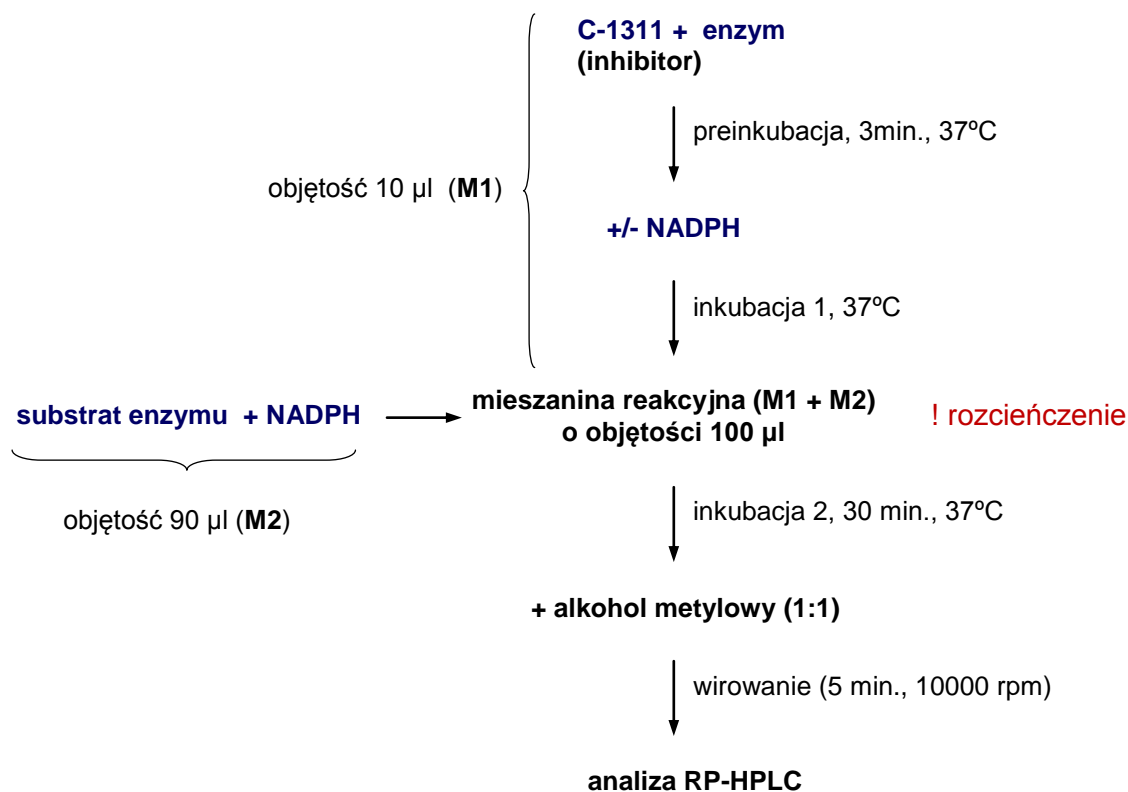
- ❖ Zarówno C-1311, jak i C-1330 zahamowały reakcje katalizowane przez izoenzymy CYP1A2 i CYP3A4, przy czym inhibicja działania CYP1A2 indukowana przez oba związki była silniejsza niż CYP3A4 (Rys.84).
- ❖ Obie badane pochodne imidzoakrydonu nie wywołały natomiast znaczących zmian w metabolizmie imipraminy, substratu dla dwóch izoenzymów cytochromu P450: CYP2C19 i CYP2D6.

IV.3. Badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez związek C-1311.

Zważając na przedstawione w poprzednim rozdziale fakty, kolejnym zadaniem badawczym była próba określenia prawdopodobnego mechanizmu obserwowanej inhibicji izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311. Do dalszych badań zastosowałam rekombinantowe ludzkie izoenzymy CYP1A2 i CYP3A4 tym razem o podwyższonej aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450, co miało na celu uzyskanie wyraźniejszego obrazu przemian metabolicznych standardowych substratów enzymów.

IV.3.1. Określenie charakteru inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

Pierwszy etap badań hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez imidzoakrydon C-1311 wymagał sprawdzenia czy obserwowana inhibicja zachodzi w sposób odwracalny czy nieodwracalny. Uczyniłam to poprzez zastosowanie metody rozcieńczenia, czyli inkubowaną wcześniej mieszaninę C-1311, NADPH i odpowiedniego enzymu rozcieńczyłam dziesięciokrotnie roztworem standardowego substratu tego enzymu i NADPH (III.2.2.2.1.). Kolejne etapy tego doświadczenia przedstawiłam na poniższym schemacie (Rys.92).



Rys.92. Ogólny schemat przebiegu doświadczeń opartych na metodzie rozcieńczenia¹².

Obraz przemian metabolicznych 7-etoksykumaryny i testosteronu wobec odpowiadającym im izoenzymom cytochromu P450, bez i z udziałem związku C-1311, porównywałam analizując, m.in. w każdym przypadku końcową (szczątkową) aktywność enzymu. Procentową aktywność enzymu (Y_r), przy stosowaniu metody rozcieńczenia, wyznaczałam na podstawie pola powierzchni pod pikiem powstającego w wyniku reakcji metabolitu i ilustrowałam za pomocą wykresu słupkowego. Korzystałam z następującej zależności:

$$Y_r = (100 \cdot a) / b \text{ [%]} \quad (\text{wzór 4})$$

gdzie:

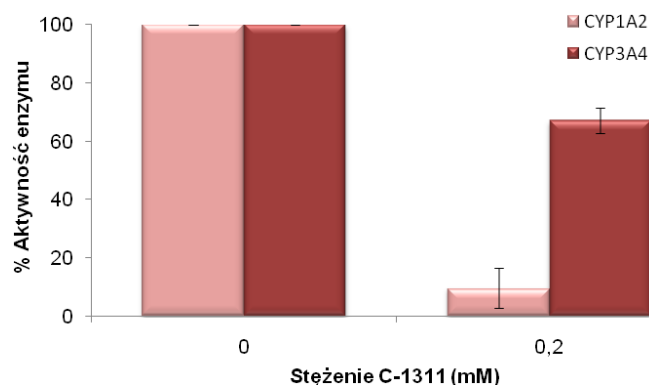
a – pole powierzchni pod pikiem metabolitu po odpowiednim czasie trwania inkubacji 1 oraz 30 minutach inkubacji 2 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$],

b – pole powierzchni pod pikiem metabolitu przy zerowym czasie inkubacji 1 (start reakcji) lub przy braku inhibitora oraz po 30 minutach inkubacji 2 [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$].

Na podstawie wykresów z Rys.93 można stwierdzić, że pochodna imidazoakrydonu obniżyła, choć w różnym stopniu, aktywność obu izoenzymów cytochromu P450. Wyższy

¹² Stężenia składników mieszaniny inkubacyjnej M1, które podaję w opisach doświadczeń opartych na metodzie rozcieńczenia są stężeniami końcowymi w mieszaninie przed rozcieńczeniem.

stopień zahamowania funkcji katalitycznej enzymu nastąpił w przypadku CYP1A2, którego aktywność obniżyła się aż do 10% aktywności początkowej. Zastosowanie wielokrotnego rozcieńczenia mieszaniny reakcyjnej nie przywróciło aktywności żadnego z enzymów. Efekt ten przemawia za nieodwracalnym charakterem inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.



Rys.93. Porównanie aktywności CYP1A2 i CYP3A4 po 40 minutach inkubacji (37°C) z C-1311; stężenia składników M1: C-1311 – 0,2 mM, enzym – 1 μM, NADPH – 0,5 mM. Czas inkubacji 1: 40 minut. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

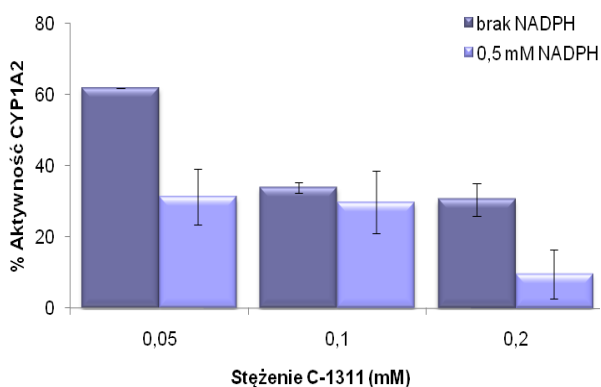
Wykazanie nieodwracalności obserwowanej inaktywacji izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311 oraz przegląd literatury opisującej mechanizmy hamowania aktywności cytochromów P450 skłoniły mnie do sprawdzenia czy badana pochodna imidzoakrydonu działa jako inhibitor „mechanism-based” izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4. Inhibicję „mechanism-based” (MBI) scharakteryzowałam szczegółowo w Części teoretycznej prezentowanej pracy (III.2.2. i III.2.3.). Porównanie struktury cząsteczki C-1311 do struktur znanych inhibitorów „mechanism-based” cytochromów P450 wzmocniło przekonanie, iż związek ten może być efektywnym inhibitorem tego typu. Wykazano bowiem wcześniej, że liczne związki chemiczne posiadające ugrupowanie dialkiloaminoalkilowe, obecne także w strukturze C-1311, generują często reaktywne pochodne nitrozowe, które są przyczyną unieczynnienia funkcji katalitycznej enzymu [Murray i Murray, 2003]. W następnym etapie pracy przeprowadziłam więc badania pozwalające sprawdzić czy przebieg procesu inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 indukowanej przez C-1311 ma cechy charakterystyczne dla inhibicji MBI cytochromów P450. Szczegółowy schemat przebiegu doświadczeń zamieściłam na Rys. 107.

IV.3.2. Badania wpływu stężenia inhibitora, czasu inkubacji enzymu z inhibitorem oraz obecności kofaktora NADPH.

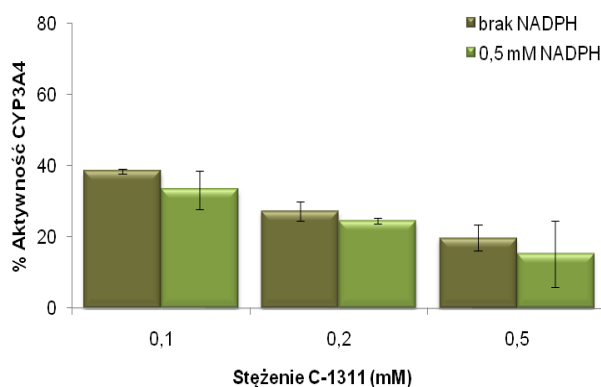
Pierwszym zbadanym kryterium MBI było określenie wpływu stężenia C-1311, czasu

inkubacji enzymu z inhibitorem oraz obecności egzogenego kofaktora, NADPH, na proces hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4. W tym celu przeprowadziłam szereg reakcji, w których zastosowałam kilka wybranych stężeń C-1311 dla 40 minut inkubacji 1 lub prowadziłam inkubację 1 dla kilku różnych czasów przy stałym stężeniu C-1311. Równoległe wykonałam też podobne serie reakcji nie wprowadzając NADPH do mieszaniny inhibitora i enzymu. Kontrolą, względem której porównywałam ilość otrzymanych metabolitów 7-etoksykumaryny i testosteronu, a na tej podstawie aktywność izoenzymów cytochromu P450, były mieszaniny reakcyjne M1 bez dodatku C-1311 lub takie, dla których nie prowadzono inkubacji 1 (czas 0).

A. C-1311 + CYP1A2



B. C-1311 + CYP3A4



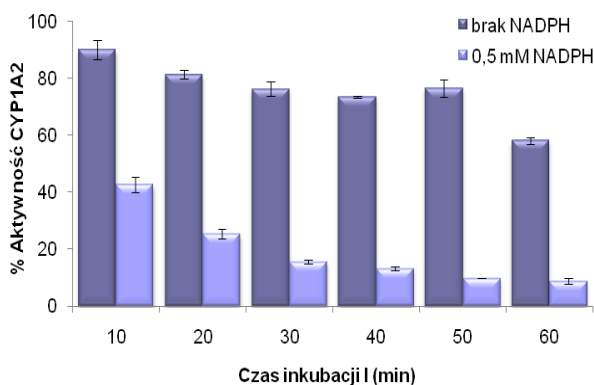
Rys.94. Zmiany aktywności 1 μ M (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w reakcji bez i z udziałem 0,5 mM NADPH w mieszaninie enzymu i C-1311 w zależności od stężenia C-1311. Czas inkubacji 1: 40 minut. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Wykresy przedstawione na Rys.94 zdecydowanie sygnalizują, iż zmiana aktywności obu cytochromów P450 wyraźnie zależała od zastosowanego stężenia C-1311. Dla CYP1A2 spadek aktywności następował stopniowo do 0,2 mM stężenia inhibitora, przy którym aktywność izoenzymu wyniosła tylko około 10% aktywności początkowej. Dla uzyskania podobnego efektu inhibicji, w przypadku CYP3A4 zastosowałam wyższe stężenia pochodnej imidazoakrydonu. Dopiero 0,5 mM C-1311 obniżył aktywność enzymu do około 15%. Powyższe dane wskazują, co obserwowałam już wcześniej, na silniejsze hamowanie aktywności CYP1A2 niż CYP3A4 przez C-1311.

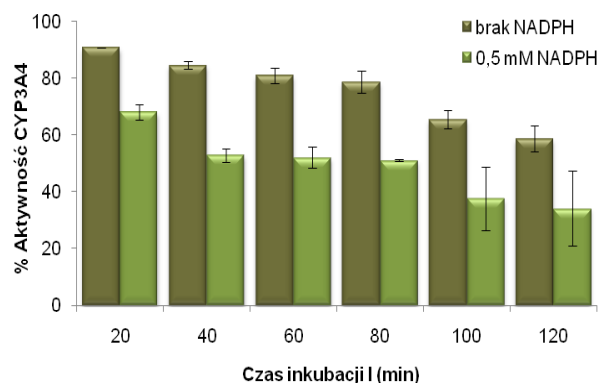
Podobnie jak to miało miejsce dla zmiennych stężeń C-1311, istotną zależność obserwowałam również między stopniem hamowania enzymu a czasem jego oddziaływania z inhibitorem (Rys.95). Spadek aktywności CYP1A2 dla 0,05 mM C-1311 następował liniowo do 60 minut inkubacji, po którym to czasie aktywność enzymu obniżyła się do około 10%. Wpływ czasu inkubacji CYP3A4 z C-1311 na aktywność enzymu zbadałam dla 0,1 mM C-1311, wydłużając czas inkubacji do 120 minut. Całkowita aktywność CYP3A4 także

obniżała się ze wzrostem czasu reakcji, osiągając blisko 60% po 120 minutach. Bieżące doświadczenie potwierdziło również, iż CYP1A2 jest bardziej niż CYP3A4 podatny na hamujące działanie C-1311.

A. C-1311 + CYP1A2



B. C-1311 + CYP3A4



Rys.95. Zmiany aktywności 1 μ M (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w reakcji bez i z udziałem 0,5 mM NADPH w mieszaninie enzymu i C-1311 w zależności od czasu inkubacji enzymu z C-1311. Stężenie C-1311: (A) 0,05 mM, (B) 0,1 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Przypatrując się wynikom przedstawionym na Rys.94 i 95, zauważamy także, że obecność NADPH w mieszaninie enzymu i C-1311 miała znaczenie dla wywołania efektu inhibicji. NADPH, jako nośnik elektronów, jest niezbędny dla przemiany wyjściowego związku pod wpływem izoenzymu P450 w reaktywny metabolit, który następnie może wiązać się z enzymem powodując jego nieodwracalną inaktywację. W reakcjach gdzie NADPH był obecny w mieszaninie cytochromu P450 i C-1311 zahamowanie aktywności enzymu było silniejsze w porównaniu do reakcji gdzie nie dodano tego reagenta. Efekt hamowania aktywności enzymów wzmacniał się więc na skutek zajęcia cyklu katalitycznego cytochromu P450 z udziałem C-1311 w obecności egzogenego kofaktora enzymu.

Podsumowując, omówione w niniejszym rozdziale wyniki badań wskazały, że na stopień zahamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311 wpływają trzy czynniki:

- stężenie inhibitora,
- czas inkubacji inhibitora z enzymem oraz
- obecność NADPH w mieszaninie reakcyjnej.

Biorąc pod uwagę powyższe zależności przyjął, że obserwowana inhibicja aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez pochodną imidazoakrydonu jest w znacznym stopniu spowodowana inhibicją typu „mechanism-based”. W związku z tym, w toku dalszych badań sprawdzałam kolejno wybrane kryteria potwierdzające obecność tego typu inhibicji.

IV.3.3. Określenie swoistych parametrów inhibicji MBI.

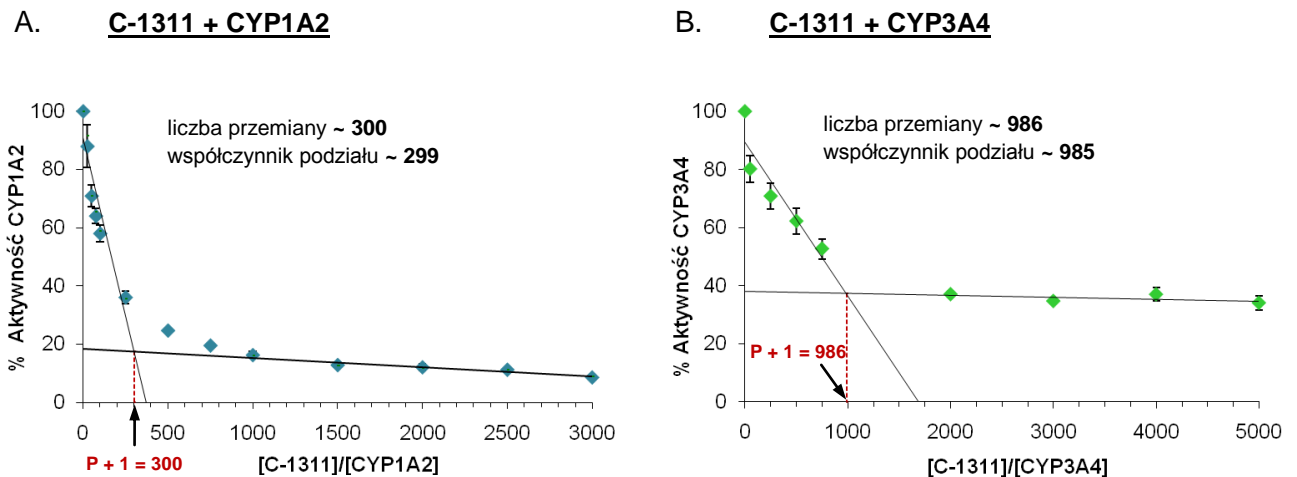
IV.3.3.1. Wyznaczenie współczynnika podziału i liczby przemiany dla inaktywacji CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań pozwoliły stwierdzić, że inhibicja aktywności izoenzymu CYP1A2 przez pochodną imidazoakrydonu C-1311 jest znacznie silniejsza niż izoenzymu CYP3A4. Dla zbadania i porównania siły z jaką reaktywny metabolit pośredni związku C-1311 przyczynia się do hamowania aktywności obu enzymów dla każdego z procesów inaktywacji wyznaczyłam tzw. współczynnik podziału (ang. *partition ratio*, P) oraz tzw. liczbę przemiany (ang. *turnover number*). Pierwsza z wymienionych wielkości opisuje liczbę cząsteczek związku metabolizowaną przez enzym do momentu obniżenia jego aktywności do stałej najniższej z możliwych wartości w danych warunkach reakcji. Jest więc miarą wydajności inhibitora. Drugi z parametrów, bezpośrednio związany z pierwszą wielkością zależnością: $liczba\ przemiany = P + 1$, określa przybliżoną liczbę cykli katalitycznych niezbędnych do osiągnięcia najniższych wartości aktywności enzymu w obecności cząsteczek inaktywatora.

Aby poznać wartości P i P + 1 dla procesów hamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311 wykonałam serię doświadczeń wg schematu przedstawionego na Rys.107. CYP1A2 lub CYP3A4 o stężeniu 0,5 μ M inkubowałam, odpowiednio przez 30 i 60 minut, z różnymi stężeniami C-1311 (0,0125 – 2,5 mM), w obecności 1 mM NADPH. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczałam następnie dziesięciokrotnie roztworem standardowego substratu danego enzymu i kofaktora. Liczbę przemiany wyznaczyłam graficznie prowadząc dwie krzywe zależności szczątkowej aktywności enzymu (obliczonej wg wzoru 4) od stosunku stężeń molowych inhibitora do cytochromu P450, $[C-1311]/[enzym]$ [Lin i wsp., 2002]. Jedna z prostych obrazuje spadek aktywności enzymu dla niższych wartości $[C-1311]/[enzym]$, zaś druga obejmuje wartości $[C-1311]/[enzym]$, dla których aktywność enzymu nie zmieniała się już pomimo zastosowania wysokich stężeń inhibitora. Punkt przecięcia obu krzywych wskazał na osi odciętych wartość liczby przemiany, co w dalszej kolejności pozwoliło na obliczenie współczynnika podziału.

Wartości poszukiwanych parametrów wyniosły odpowiednio dla CYP1A2: 300 i 299, dla CYP3A4: 985 i 986 (Rys.96). Uzyskane wyniki potwierdziły zatem, iż całkowite zahamowanie aktywności izoenzymu CYP1A2 przez imidazoakrydon C-1311 zachodzi szybciej i wymaga mniejszej ilości cząsteczek inhibitora niż ma to miejsce w przypadku CYP3A4. Pozwala to zakwalifikować C-1311 jako dość wydajny inhibitor izoenzymu CYP1A2. W wybranych warunkach reakcji aktywność CYP3A4 ulegała obniżeniu do poziomu poniżej 40%

aktywności początkowej dopiero dla ponad trzykrotnie wyższej niż dla CYP1A2 liczby cząsteczek inhibitora.



Rys.96. Wyznaczenie liczby przemiany i współczynnika podziału dla inhibicji aktywności (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 przez związek C-1311; stężenia składników M1: C-1311 – 0,0125 – 2,5 mM, enzym – 0,5 μ M, NADPH – 1 mM. Czas inkubacji 1: (A) 30 minut, (B) 60 minut. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Podjęte obserwacje pozwoliły wysunąć przypuszczenie, że inhibicja „mechanism-based” obu enzymów indukowana przez C-1311 zachodzi w odmienny sposób.

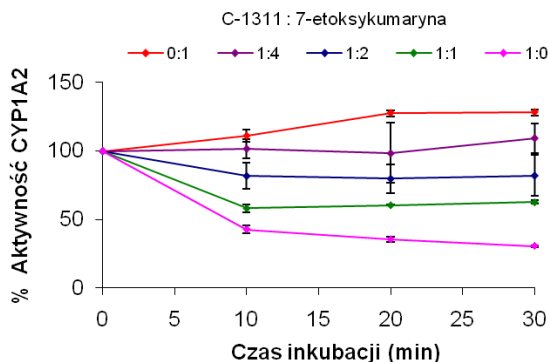
IV.3.3.2. Wpływ obecności standardowych substratów enzymów na stopień inhibicji aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

Bieżące doświadczenie, którego istotę opisałam w rozdziale III.2.2.2.4., miało na celu wykazanie czy obecność standardowego substratu enzymu w mieszaninie enzymu, inhibitora i kofaktora, chroni enzym przed inaktywacją. Obserwacja tego efektu świadczyłaby o występowaniu inhibicji „mechanism-based”. Pozwoliło ono także sprawdzić czy centrum aktywne cytochromu P450 uczestniczy w aktywacji C-1311 do reaktywnych metabolitów pośrednich, które są odpowiedzialne za nieodwracalną inaktywację enzymu.

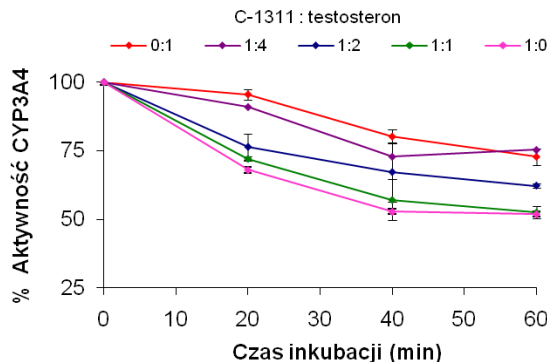
Okazało się, że zarówno obecność 7-etoksykumaryny, jak i testosteronu doprowadziła do obniżenia hamującego działania C-1311 w stosunku do izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 (Rys.97). Zastosowanie substratów enzymów w stężeniu czterokrotnie wyższym od stężenia inhibitora doprowadziło do niemal całkowitego przywrócenia aktywności obu cytochromów P450 do poziomu ich aktywności mierzonej w mieszaninach kontrolnych, w których C-1311 był nieobecny. Przedstawione wyniki dowodzą, że C-1311, działając przed wystąpieniem inaktywacji jako inhibitor kompetycyjny (Rys.10), współzawodniczy ze standardowym substratem enzymu o miejsce w centrum aktywnym białka, co tym samym obniża pulę

reaktywnych metabolitów pośrednich C-1311 zdolnych do unieczynnienia funkcji katalitycznych enzymu.

A. C-1311 + CYP1A2



B. C-1311 + CYP3A4



Rys.97. Porównanie aktywności (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w obecności C-1311 i standardowych substratów enzymów; stężenia składników M1: C-1311 – (A) 0,05 mM, (B) 0,2 mM, enzym – 0,5 μ M, NADPH – 1 mM, badany stosunek stężeń C-1311:7-etoksykumaryna (testosteron) – 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 0:1. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

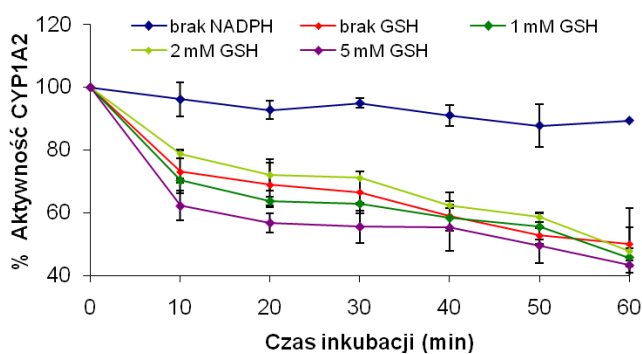
IV.3.3.3. Określenie wpływu glutationu na stopień zahamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

Rola glutationu (GSH) jako „pułapki” nukleofilowej polega na wychwytywaniu czynników elektrofilowych z roztworu (III.2.2.2.5.). Powstające w cyklu katalitycznym cytochromów P450 reaktywne metabolity pośrednie mogą wiązać się z enzymem, nie opuszczając jego miejsca aktywnego przed inaktywacją, lub też pozostać w postaci niezwiązanej i tylko w tej sytuacji zostają poddane działaniu GSH. Odczynnik ten pozwala zatem na rozróżnienie inhibitorów nieodwracalnych (pierwszy przypadek) od odwracalnych (drugi przypadek). Aby sprawdzić jak zachowują się reaktywne intermediały C-1311, postępując wg schematu doświadczenia na Rys.107, do mieszaniny tego związku i cytochromu P450 dodałam GSH w stężeniu 1, 2 lub 5 mM. Za kontrolę aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przyjął mieszaniny M1 bez dodatku NADPH, ale z 2 mM GSH, co miało służyć sprawdzeniu czy to nie on wywołuje zmiany aktywności badanych izoenzymów. Jako kontrolę inhibicji działania enzymów zastosowałam mieszaniny z dodatkiem C-1311, ale bez dodatku GSH.

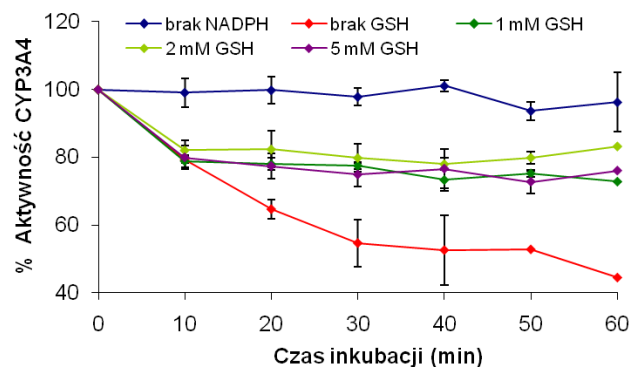
Jak wynika z Rys.98A aktywność izoenzymu CYP1A2 nie była przywracana w obecności GSH. Jest to najprawdopodobniej spowodowane faktem, że reaktywny intermediat C-1311, wygenerowany w cyklu katalitycznym tego cytochromu, wiąże się nieodwracalnie w centrum aktywnym białka i przez to staje się niedostępny dla GSH. Z kolei, w sytuacji dodania GSH do mieszaniny zawierającej CYP3A4 obserwowałam przywrócenie aktywności tego enzymu

o około 20 – 30%, i to niezależnie od zastosowanego stężenia GSH (Rys.98B). Przypuszczam, że za obserwowany efekt inhibicji, obok mechanizmu MBI, odpowiadają także inne rodzaje oddziaływań związku C-1311 z izoenzymem CYP3A4.

A. C-1311 + CYP1A2



B. C-1311 + CYP3A4

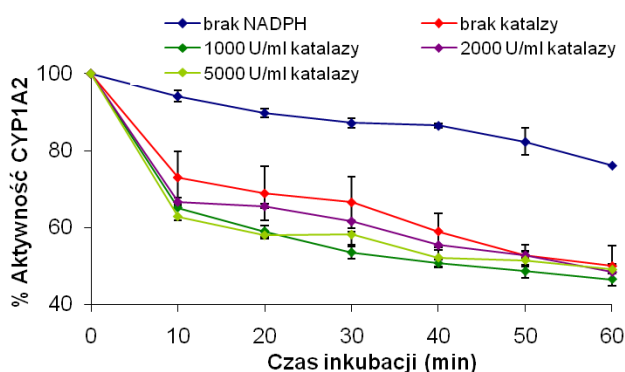


Rys.98. Porównanie aktywności (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w obecności C-1311 i glutationu; stężenia składników M1: C-1311 – (A) 0,05 mM, (B) 0,2 mM, enzym – 0,5 μ M, NADPH – 1 mM, GSH – 1 / 2 / 5 mM. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

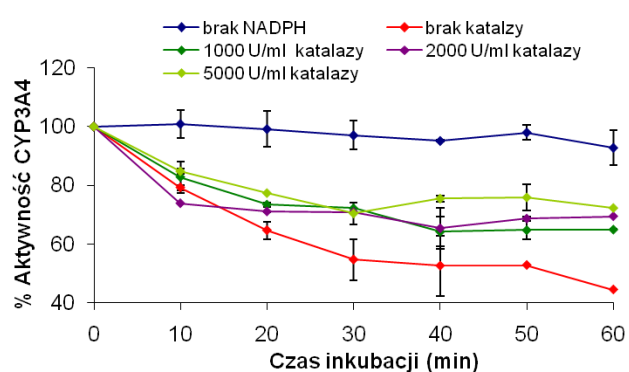
IV.3.3.4. Określenie wpływu katalazy na stopień zahamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

W podobny sposób, jak opisałam w przypadku GSH, zbadałam wpływ 1000, 2000 i 5000 U/ml katalazy na stopień zahamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

A. C-1311 + CYP1A2



B. C-1311 + CYP3A4

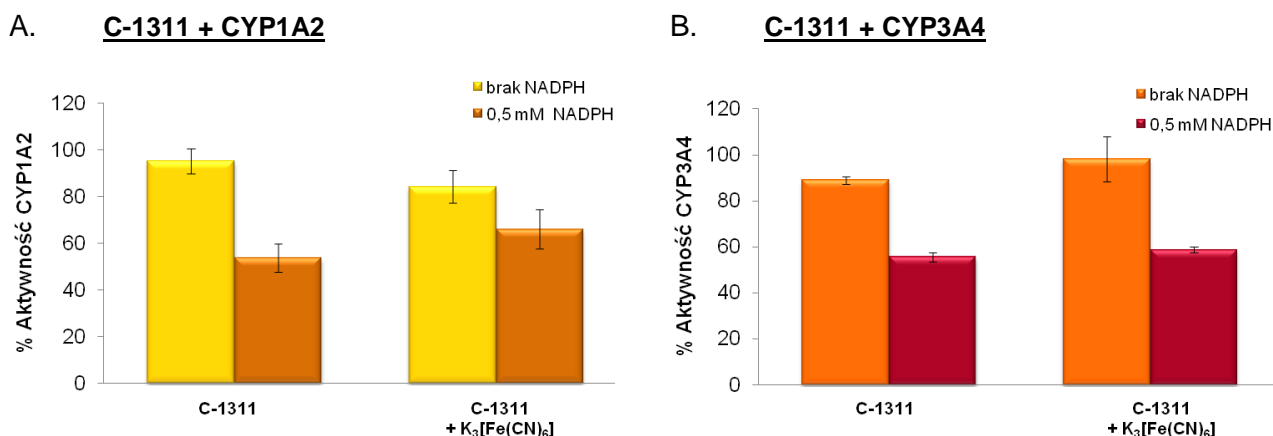


Rys.99. Porównanie aktywności (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w obecności C-1311 i katalazy; stężenia składników M1: C-1311 – (A) 0,05 mM, (B) 0,2 mM, enzym – 0,5 μ M, NADPH – 1 mM, katalaza – 1000 / 2000 / 5000 U/ml. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Na podstawie otrzymanych wyników (Rys.99) mogłam stwierdzić, że dodatek katalazy, mającej za zadanie wychwytywać powstające w reakcjach katalizowanych przez cytochromy P450 reaktywne formy tlenu, nie spowodował przywrócenia aktywności izoenzymu CYP1A2, zmienił natomiast aktywność izoenzymu CYP3A4 o ponad 20%. W żadnym przypadku enzym nie powrócił jednak do całkowitej, 100%, funkcjonalności. Świadczy to o mechanizmie inhibicji, w którym nie uczestniczą wolne rodniki tlenowe, a zatem jest to kolejny dowód na potwierdzenie, że obserwowane hamowanie aktywności CYP1A2 i CYP3A4 wywołane obecnością imidazoakrydonu C-1311 zachodzi według mechanizmu MBI. Co więcej, przywrócenie przez katalazę częściowej aktywności CYP3A4 jest zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami na temat dodatkowego sposobu oddziaływań C-1311 z tym enzymem.

IV.3.3.5. Efekt żelazicyjanku potasu na hamowanie aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311.

Celem kolejnego doświadczenia było zbadanie czy katalityczne funkcje izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4, utracone w obecności C-1311, mogą zostać przywrócone na skutek utleniającego działania żelazicyjanku potasu, $K_3[Fe(CN)_6]$ (III.2.2.2.1.). Po 30 minutach wstępnej inkubacji C-1311 i odpowiedniego cytochromu P450, w obecności lub przy braku NADPH, mieszaninę reakcyjną poddałam dalszej 15-minutowej inkubacji z 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$.



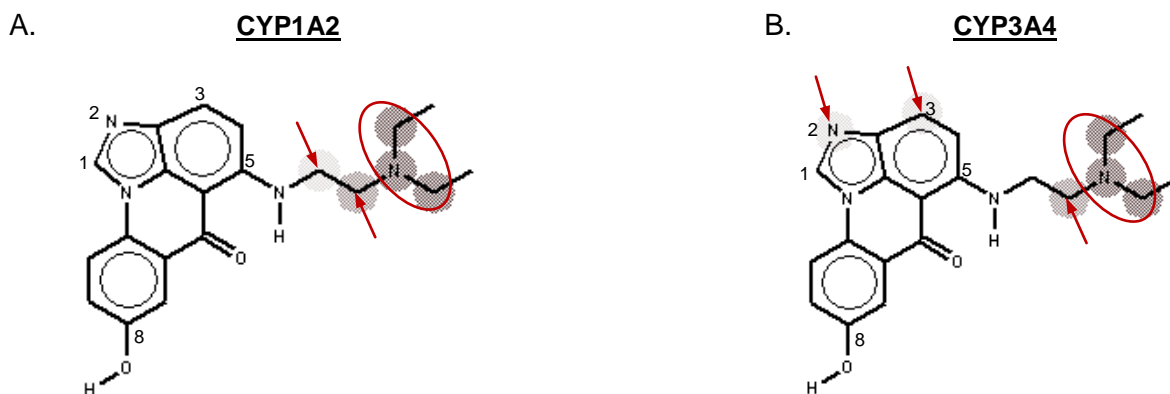
Rys.100. Porównanie aktywności (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 w obecności żelazicyjanku potasu, w reakcji bez i z udziałem NADPH w mieszaninie enzymu i C-1311; stężenia składników M1: C-1311 – (A) 0,05 mM, (B) 0,2 mM, enzym – 0,05 μ M, NADPH – 1 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ – 2 mM. Czas inkubacji 1: 30 minut + 15 minut inkubacji z $K_3[Fe(CN)_6]$. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Okazało się, że $K_3[Fe(CN)_6]$ tylko w znikomym stopniu spowodował przywrócenie aktywności CYP1A2 (około 10%), nie miał natomiast wpływu na odtworzenie aktywności CYP3A4 (Rys.100). Taki wynik badań oznacza, że reaktywna forma pośrednia C-1311 nie

została wyparta przez $K_3[Fe(CN)_6]$ z miejsca aktywnego żadnego z enzymów. Fakt ten przemawia za tym, że C-1311 działa raczej jako nieodwracalny, a nie quasi-nieodwracalny, inhibitor „mechanism-based” izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 (Rys.11).

IV.3.4. Przewidywanie miejsc metabolizmu C-1311 wobec CYP1A2 i CYP3A4 (program MetaSite).

MetaSite jest programem komputerowym, który umożliwia przewidywanie potencjalnych miejsc metabolizmu związku (ang. *site of metabolism prediction*) wobec różnych izoenzymów cytochromu P450. Udowodniono, iż z dużym prawdopodobieństwem wskazuje on trzy główne miejsca transformacji, które potwierdziły się w przypadku ponad 80% strukturalnie zróżnicowanych związków [Cruciani i wsp., 2005].



Rys.101. Potencjalne miejsca transformacji cząsteczki C-1311 wobec (A) CYP1A2 i (B) CYP3A4 wskazane na podstawie symulacji komputerowej z zastosowaniem programu MetaSite; najistotniejsze eksperymentalnie wyznaczone miejsce metabolizmu C-1311 zakreślono okręgiem, pozostałe wskazują strzałki. Oprogramowanie MetaSite (wersja 3.0.4.) zostało udostępnione za pośrednictwem Molecular Discovery Ltd., Włochy (www.moldiscovery.com).

MetaSite zastosowałam dla poznania najważniejszych miejsc reaktywnych w cząsteczce C-1311 podatnych na działanie izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 (Rys.101), których znajomość pozwoliłaby postulować strukturę możliwych metabolitów pośrednich odpowiedzialnych za inhibicję MBI obydwu enzymów. Okazało się, iż w obu przypadkach kluczowym dla katalizy enzymatycznej obszarem w cząsteczce pochodnej imidazoakrydonu może być ugrupowanie dietyloaminowe łańcucha bocznego. Nie bez znaczenia dla przemian metabolicznych C-1311 z udziałem CYP3A4 pozostaje też obecność atomu azotu N-2 w pierścieniu imidazolowym oraz atomu węgla C-3 rdzenia akrydonu.

IV.3.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.3.

Wyniki badań zmierzających do określenia mechanizmu hamowania aktywności CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311 pozwoliły stwierdzić, że obserwowana inhibicja ma charakter nieodwracalny, a stopień inaktywacji obu cytochromów P450 istotnie zależy od:

- ❖ stężenia inhibitora,
- ❖ czasu inkubacji inhibitora z enzymem oraz
- ❖ obecności egzogenego kofaktora cytochromów P450, NADPH, w mieszaninie inhibitora i enzymu – co wskazywało na konieczność wcześniejszej enzymatycznej aktywacji C-1311 dla uzyskania efektu inhibicji i sugerowało typ inhibicji „mechanism-based”.

Dodatkowe badania uwidoczniły współistnienie kolejnych cech MBI:

- ❖ Standardowe substraty CYP1A2 i CYP3A4 chroniły enzymy przed inaktywacją wywołaną przez C-1311, zaś
- ❖ obecność glutationu („pułapki” nukleofilowej) czy katalazy („wychwytywacza” wolnych rodników tlennych) nie przywracała pełnej aktywności żadnego z cytochromów P450, aczkolwiek w pewnym stopniu zmieniała aktywność izoenzymu CYP3A4.
- ❖ Natomiast żelazocyjanek potasu nie przywracał funkcjonalności ani CYP1A2, ani CYP3A4, co wykluczyło charakter quasi-nieodwracalny inhibicji.

Uzyskane wyniki pozwalają zakwalifikować C-1311 jako nieodwracalny inhibitor „mechanism-based”. Wydaje się też, że odpowiedzialne za efekt inhibicji reaktywne metabolity pośrednie mogły powstać na skutek modyfikacji strukturalnych w obrębie ugrupowania dietyloaminowego łańcucha bocznego cząsteczki imidazoakrydonu.

IV.4. C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4.

Znając możliwe kierunki przemian metabolicznych obu pochodnych imidazoakrydonu w różnych układach enzymatycznych (Rys.24 i 25 oraz IV.1.) w kolejnym etapie badań zmierzałam do poznania obrazu biotransformacji C-1311 i C-1330 także w miejscu ich oczekiwanego działania terapeutycznego, czyli w komórkach nowotworowych. Uwzględniając natomiast fakt indukowania przez C-1311 inhibicji aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4, podjęłam również badania uzupełniające pozwalające określić wpływ związku na poziom jednego z tych cytochromów P450 w wybranej linii komórek nowotworowych.

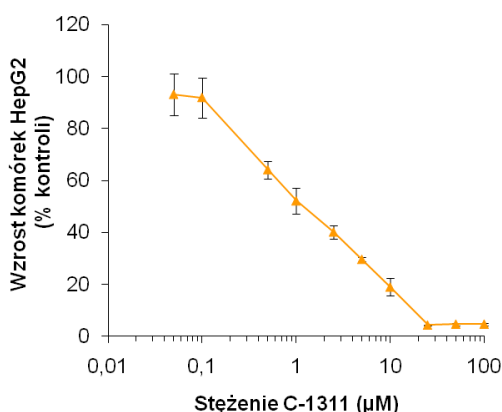
Proponowane badania przeprowadziłam stosując głównie linię komórkową ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2 (ang. *human hepatocellular liver carcinoma cell line*), która ze względu na obecność enzymów metabolizujących pierwszej (CYP: 1A, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4) i drugiej fazy metabolizmu (UGT, NAT, transferazy S-glutationowej – GST) jest powszechnie stosowana w badaniach przemian metabolicznych wielu leków i ksenobiotyków [Wilkening i Bader, 2003]. Druga z zastosowanych linii komórkowych, Hep3A4, charakteryzowała się wyższą niż w innych komórkach nowotworowych ekspresją genu izoenzymu CYP3A4.

IV.4.1. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 w komórkach nowotworowych HepG2 i Hep3A4.

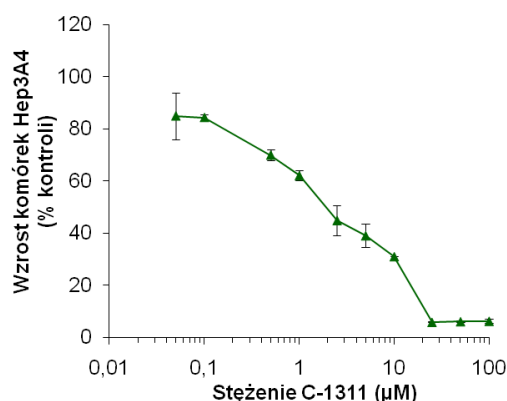
IV.4.1.1. Oznaczanie cytotoksyczności C-1311 w komórkach HepG2 i Hep3A4.

Prace nad metabolizmem imidzoakrydonów w komórkach nowotworowych poprzedziłam oznaczeniem aktywności cytotoksycznej C-1311 w stosunku do badanych linii komórkowych ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4. Spośród szeregu powszechnie stosowanych technik laboratoryjnych, oznaczenie cytotoksyczności C-1311 wykonałam posługując się metodą opartą na zdolnościach oksydoredukcyjnych mitochondriów z wykorzystaniem barwnika bromku 3-[4,5-dimetylo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazolu, MTT (V.4.4.2).

A. C-1311 + HepG2



B. C-1311 + Hep3A4



Rys.102. Zahamowanie wzrostu komórek (A) HepG2 i (B) Hep3A4 w zależności od dawki C-1311 po 72 godzinach inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Inkubację komórek z C-1311 (0,05 – 100 μM) prowadziłam przez 72 godziny. Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji sporządziłam wykresy zależności zahamowania wzrostu komórek (jako % kontroli, nie traktowanej związkami) od logarytmu stężenia C-1311,

co przedstawiłam na Rys.102. Za miarę aktywności cytotoksycznej pochodnej imidazoakrydonu przyjęłam wartość EC_{50}^{13} .

Analizując otrzymane wyniki (Tabela 3) stwierdziłam, że komórki HepG2 były w niewielkim stopniu wrażliwsze na działanie aktywnej przeciwnowotworowo pochodnej C-1311 niż komórki z nadekspresją genu izoenzymu CYP3A4. Stąd, porównanie przemian metabolicznych C-1311 w obu liniach komórkowych miało pomóc w uchwyceniu i interpretacji obserwowanych różnic cytotoksyczności.

Tabela 3. Parametry aktywności cytotoksycznej C-1311 wobec komórek ludzkich nowotworów wątroby.

Linia komórkowa	EC_{50} (μ M)
HepG2	1,51 +/- 0,264
Hep3A4	1,84 +/- 0,037

IV.4.1.2. Opracowanie warunków biotransformacji w komórkach nowotworowych.

Badania przemian metabolicznych pochodnych imidazoakrydonu zachodzących w komórkach nowotworowych wymagały na wstępie określenia optymalnych warunków prowadzenia reakcji, czyli doboru: ilości komórek, stężenia badanych związków i czasu ich inkubacji z komórkami. Do izolacji powstających w komórkach metabolitów zastosowałam ekstrakcję 60% zimnym metanolem [Wiśniewska, 2008], która umożliwiła ich dalszą analizę techniką RP-HPLC. Po wykonaniu kilku wstępnych doświadczeń, w których modyfikowałam ilość komórek i stężenia pochodnych imidazoakrydonu, zadowalającą wydajność ekstrakcji oraz odpowiedni obraz chromatograficzny składu wyizolowanych ekstraktów komórkowych otrzymywałam dla:

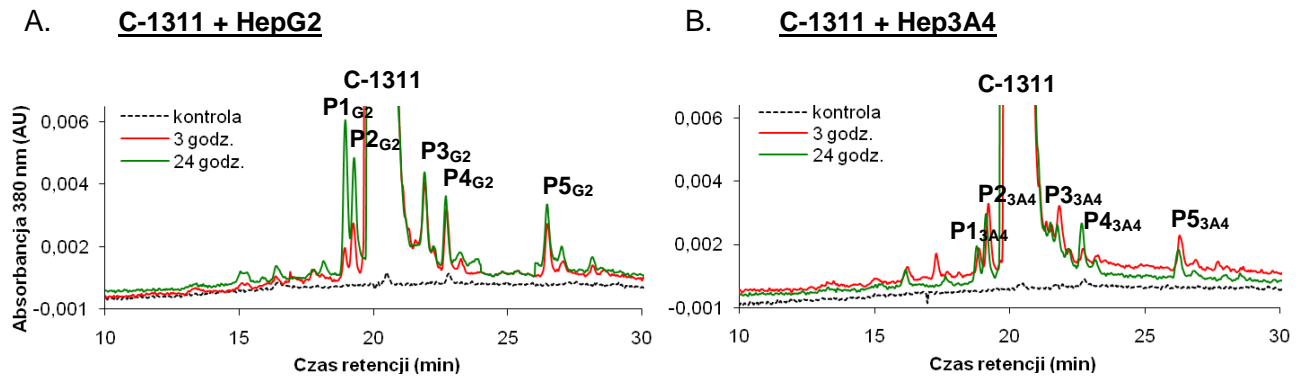
- gęstości komórek: 2×10^6 komórek/cm²,
- stężenia C-1311 (C-1330): 100 μ M,
- czasu inkubacji: 3, 24 i 72 godziny.

IV.4.1.3. Wyniki badań metabolizmu C-1311 w HepG2 i Hep3A4.

Analiza chromatograficzna ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek HepG2 i Hep3A4 wskazała na obecność pięciu produktów metabolizmu C-1311 (Rys.103). Mogłam więc stwierdzić, że C-1311 wnikał do komórek nowotworowych, gdzie ulegał nieznacznym przemianom metabolicznym, w stopniu porównywalnym dla obu linii komórkowych. Po 24

¹³ EC_{50} – stężenie związku, przy którym proliferacja komórek nowotworowych w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych w odniesieniu do czasu trwania eksperymentu – tzw. miara cytotoksyczności.

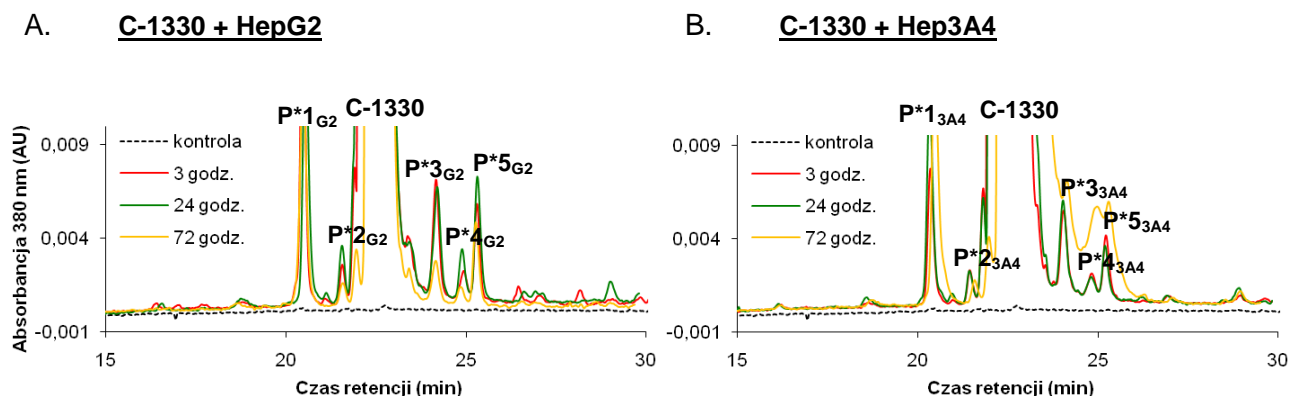
godzinach prowadzenia reakcji poszczególne piki metabolitów stopniowo zanikały, co jak przypuszczam, mogło być spowodowane ich nietrwałością lub śmiercią komórek poddanych działaniu wysokiego stężenia C-1311.



Rys.103. Liniowe obrazy chromatograficzne składu ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek ludzkich nowotworów wątroby (A) HepG2 i (B) Hep3A4 traktowanych 100 μ M C-1311; kontrola – komórki nie traktowane C-1311 [chromatograf HPLC Waters Millennium].

IV.4.1.4. Wyniki badań metabolizmu C-1330 w HepG2 i Hep3A4.

C-1330, podobnie jak C-1311, przenikał do komórek nowotworu wątroby, w których ulegał transformacji metabolicznej do pięciu różnorodnych produktów (Rys.104). W badanych warunkach stopień przemiany C-1330 był wyższy w komórkach HepG2 niż Hep3A4, i odpowiednio wyższy niż stopień przemiany C-1311. Szczególną uwagę zwraca pik metabolitu P*1_{G2/3A4}, którego intensywność wzrastała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji C-1330 zarówno z komórkami HepG2, jak i Hep3A4. Co więcej, był on nadal obecny w mieszaninie po 72 godzinach inkubacji.

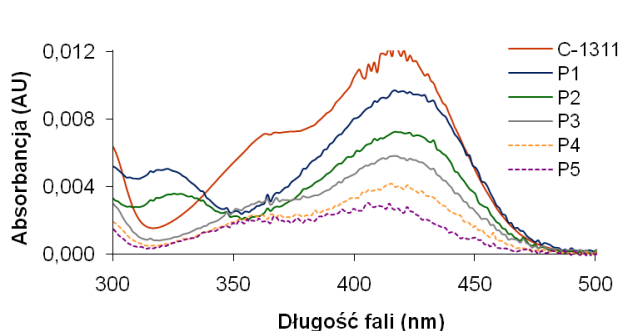


Rys.104. Liniowe obrazy chromatograficzne składu ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek ludzkich nowotworów wątroby (A) HepG2 i (B) Hep3A4 traktowanych 100 μ M C-1330; kontrola – komórki nie traktowane C-1330 [chromatograf HPLC Waters Millennium].

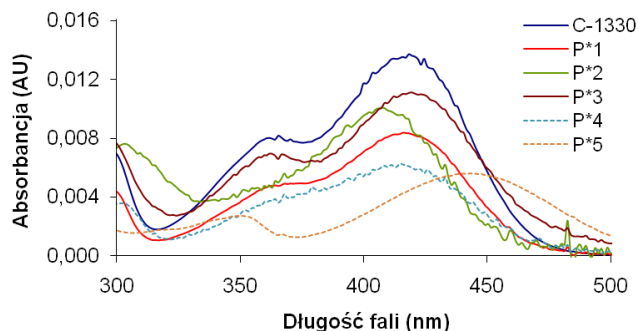
IV.4.1.5. Identyfikacja produktów metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec HepG2 i Hep3A4.

Zebrane podczas analiz chromatograficznych widma UV-vis metabolitów powstających w w komórkach nowotworowych obu linii przedstawiłam na Rys.105. Widma absorpcyjne produktów metabolizmu C-1311: P1_{G2/3A4} i P2_{G2/3A4}, oraz produktów metabolizmu C-1330: P*2_{G2/3A4}, P*4_{G2/3A4} i P*5_{G2/3A4} różnią się wyraźnie od widm UV-vis ich substratów, co sugeruje, iż modyfikacje strukturalne nastąpiły w pierścieniu imidzoakrydonu. Z kolei niezmienny w stosunku do substratów charakter przebiegu widm Uv-vis pozostałych produktów biotransformacji (P3_{G2/3A4}, P4_{G2/3A4}, P5_{G2/3A4}, P*1_{G2/3A4}, P*3_{G2/3A4}) przemawia za tym, że w ich cząsteczkach można spodziewać się zmian w obrębie łańcucha bocznego.

A. **Widma Uv-vis produktów C-1311**



B. **Widma Uv-vis produktów C-1330**

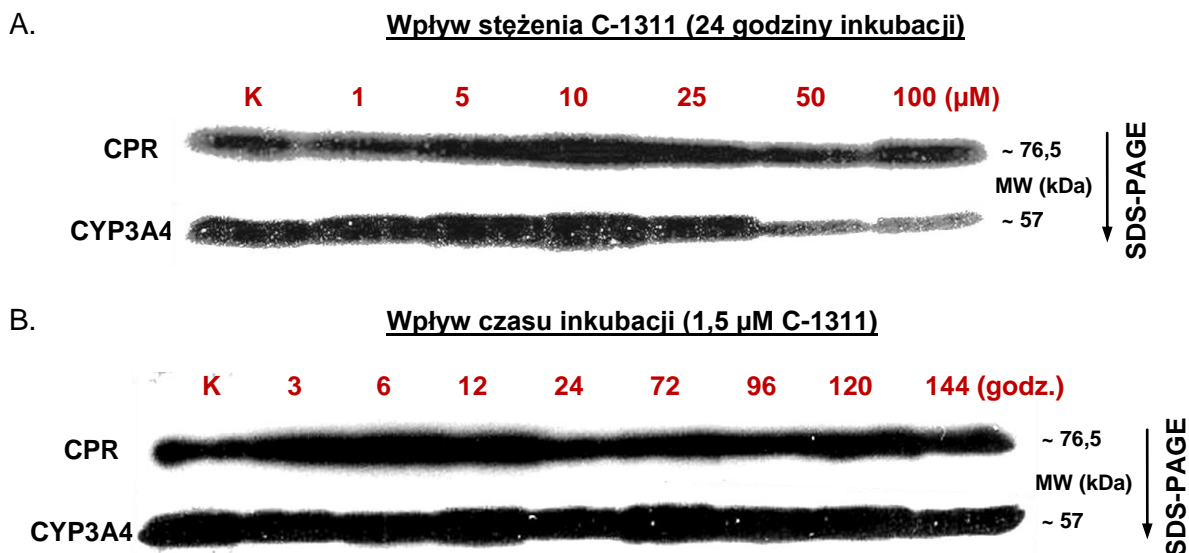


Rys.105. Widma Uv-vis (A) C-1311 i (B) C-1330 oraz produktów ich metabolizmu w komórkach HepG2 i Hep3A4.

Analiza ESI-MS (dane nieprezentowane) pików chromatograficznych produktów P3_{G2/3A4} i P*3_{G2/3A4} wskazała na istnienie jonów masowych o wartościach m/z odpowiednio: 367,1 i 381,1. Ich obecność wykazałam już wcześniej, badając przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec FMO. Przyjmując za kryteria porównawcze widma Uv-vis i czasy retencji produktów P3_{G2/3A4} i P_{FMO} oraz P*3_{G2/3A4} i P*_{FMO} uznałam, iż podczas biotransformacji pochodnych imidzoakrydonu w komórkach nowotworowych także powstają N-tlenki C-1311 i C-1330, co świadczy o aktywnym udziale FMO. Widmo MS pików P*1_{G2/3A4} charakteryzował natomiast jon masowy, którego wartość m/z 351,1 odpowiadała wartości m/z jonu masowego związku C-1311. Wykazałam więc, że w komórkach nowotworu wątroby, podobnie jak wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy, C-1330 ulega transformacji do 8-hydroksylowej pochodnej imidzoakrydonu, czyli związku C-1311.

IV.4.2. Wpływ imidazoakrydonu C-1311 na poziom izoenzymu CYP3A4 w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2.

Wykazanie w warunkach *in vitro* hamującego efektu C-1311 w stosunku do aktywności ludzkich rekombinantowych cytochromów P450 1A2 i 3A4 stało się wskazaniem do zbadania czy potencjalny lek przeciwnowotworowy może wpływać na funkcjonowanie tych białek także w warunkach bardziej zbliżonych do fizjologicznych, a więc w komórkach ludzkiego nowotworu. W celu sprawdzenia tej sugestii, w ramach kolejnego etapu pracy, oznaczyłam poziom izoenzymu CYP3A4 we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z komórek HepG2 traktowanych i nie traktowanych (kontrolnych) C-1311. W tym celu zastosowałam metodę detekcji białek Western blotting (V.4.4.4)



Rys.106. Poziom izoenzymu CYP3A4 we frakcji mikrosomalnej komórek HepG2 kontrolnych (K) i poddanych działaniu C-1311: (A) zależność od stężenia C-1311 dla 24 godzin inkubacji i (B) zależność od czasu inkubacji komórek z 1,5 µM (EC_{50}) C-1311. Ilość białka: 40 µg/studzienkę. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano NADPH-reduktazę cytochromu P450 (CPR).

Poziom białka CYP3A4, w odniesieniu do kontroli (K), nie zmienił się znacząco dla stężenia C-1311 do 25 µM, natomiast w przypadku stosowania bardzo wysokich stężeń imidazoakrydonu (50 µM i więcej), przy 24-godzinnej inkubacji, następował wyraźny zanik prążka odpowiadającego CYP3A4 (Rys.106A). Z kolei po długich czasach inkubacji komórek ze związkami, w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{50} , nie obserwowałam zmian ilości badanego cytochromu P450 (Rys.106B). Przedstawione wyniki badań pozwoliły stwierdzić, iż aktywna przeciwnowotworowo pochodna imidazoakrydonu ma wpływ na proces translacji cytochromu P450 3A4 dopiero w bardzo wysokich stężeniach.

IV.4.3. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.4.

W ostatnim etapie badań, dotyczących obserwacji przemian metabolicznych związków C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4, otrzymałam wyniki stwierdzające, że:

- ❖ Obie pochodne imidazoakrydonu ulegają biotransformacji wobec enzymów obecnych w komórkach nowotworowych HepG2 i Hep3A4.
- ❖ Nadekspresja genu izoenzymu CYP3A4 w komórkach Hep3A4 nie wpłynęła na ilość powstających produktów – transformacja obu związków prowadziła do pięciu metabolitów, wśród których zidentyfikowałam produkty FMO – N-tlenki oraz produkt demetylacji C-1330, czyli C-1311.

Analiza Western blotting frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z komórek HepG2 uwidoczniła także, że:

- ❖ C-1311, w stężeniu przekraczających 25 μM i dla 24 godzin inkubacji komórek ze związkiem, obniżał w nich poziom izoenzymu CYP3A4, natomiast przy stężeniu o wartości EC_{50} , niezależnie od czasu inkubacji, nie zmieniał ilości badanego białka.

V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.

V.1. Materiały.

V.1.1. Badane związki przeciwnowotworowe.

Aktywne przeciwnowotworowo pochodne imidazoakrydonu: 5-dietylaminoetyloamino-8-hydroksyimidazoakrydon, C-1311 ($C_{20}H_{22}N_4O_2$) oraz 5-dietylaminoetyloamino-8-metoksyimidazoakrydon, C-1330 ($C_{21}H_{24}N_4O_2$), w postaci jednowodnych dwuchlorowodoroków, zostały zsyntetyzowane i oczyszczone w zespole naukowym Profesora Jerzego Konopy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej [Chołody i wsp., 1990a].

V.1.2. Związki chemiczne i zestawy.

- Akrylamid, 1-aminobenzotriazol (ABT), bromek 3-[4,5-dimetylo-2-ilo]-2,5-difenyloctetrazolu (MTT), 7-etoksykumaryna, zredukowany L-glutation (GSH), heksacyjanożelazian (III) potasu (żelazycyjanek potasu – $K_3[Fe(CN)_6]$), imipramina, 2-merkpto-1-metyloimidazol (metamizol – MTZ), N,N'-metylenobisakrylamid, monolaurynian polioeksoetyleno(20)sorbitanu (Tween-20), β -merkptoetanol, nadsiarczan amonu (APS), testosteron, N,N,N',N'-tetraetylenodiamina (TEMED), triton X-100 – Sigma-Aldrich Co., USA.
- β -Fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (β -NADPH), sól czterosodowa – Merck Sp. z o.o., Polska.
- Bufor Laemmli, wzorzec wielkości białek Precision Plus Protein™ Standards, zestaw do oznaczania stężenia białka Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit2 – Bio-Rad Laboratories, Inc., USA.
- Zestaw utrwalacza i wywoływacza błony nitrocelulozowej SuperSignal West PICO Chemiluminescent Substrate – Fisher Scientific, Wielka Brytania.

V.1.3. Składniki roztworów.

- 99,8% Alkohol metylowy (CH_3OH), 2-propanol (C_3H_7OH), wodorotlenek potasu (KOH) – Firma Chempur, Polska.
- 96% Alkohol etylowy (C_2H_5OH) – PPH „STANLAB” s.j., Polska.
- Chlorek sodu (NaCl), sulfotlenek dimetylu (DMSO), wodorofosforan (V) sodu dwuwodny ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), wodorotlenek sodu (NaOH) – POCH S. A., Polska.
- Chlorek magnezu sześciowodny ($MgCl_2 \times 6H_2O$), chlorek potasu (KCl), dodecylosiarczan sodu (SDS), dwuwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4), glicyna do elektroforezy, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA; sól dwu- i trój sodowa), kwas solny stężony (HCl), tri-

(hydroksymetylo)aminometan (tris-zasada, Tris-base) oraz jego chlorowodrek (Tris-HCl), sacharoza (C₁₂H₂₂O₁₁), wodorofosforan (V) potasu (K₂HPO₄) – Sigma-Aldrich Co., USA.

- Roztwór A i B – BD Gentest, USA.
- 99,5% Lodowaty kwas octowy (CH₃COOH) – Przedsiębiorstwo Chemiczne ODCZYNNIKI Sp. z o. o., Polska.
- Woda redestylowana (R > 18 MΩ·cm) – Millipore Co., USA.

V.1.4. Odczynniki chemiczne do przygotowania faz ruchomych do analizy RP-HPLC¹⁴.

- Alkohol metylowy (CH₃OH) – Merck Sp. z o.o., Polska.
- Dwuwodorofosforan (V) sodu (NaH₂PO₄), kwas mrówkowy (HCOOH) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Kwas fosforowy (V) (H₃PO₄) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Mrówczan amonu (HCOONH₄) – Fisher Scientific, Wielka Brytania.

V.1.5. Enzymy.

- Frakcje mikrosomalne komórek wątroby szczura i człowieka, rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450 o obniżonej i podwyższonej aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450: CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6, otrzymane w komórkach *Escherichia coli* – XenoTech, USA, za pośrednictwem Tebu-bio, Francja.
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy monoooksygenazy flawinowej: FMO1, FMO3 i FMO5 oraz transferazy glukuronianowej: UGT1A1 i UGT2B7, otrzymane w systemie ekspresji bakulowirus-komórki owadzie – BD Biosciences, USA.
- Oksydaza ksantynowa wyizolowana z maślanki mleka krowiego, β-glukuronidaza (GUS) otrzymana w komórkach *Escherichia coli*, katalaza wyizolowana z wątroby bydłowej – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Frakcje mikrosomalne komórek wątroby myszy WT i HRN zostały otrzymane w Biomedical Research Centre, University of Dundee, Wielka Brytania.

V.1.6. Przeciwciała.

- Owcze monoklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-CYP3A4 oraz królicze poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-CPR otrzymano w Biomedical Research Centre (University of Dundee, Wielka Brytania) i przekazane dzięki uprzejmości dr Colina Hendersona.
- Mysie anti-owcze monoklonalne przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.

¹⁴ Wszystkie odczynniki do chromatografii cieczowej charakteryzowały się wysoką czystością HPLC (HPLC Grade).

- Kozie anty-królicze poliklonalne przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z HRP – Dako Polska Sp. z o. o., Polska.

V.1.7. Linie komórkowe oraz materiały stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej.

- **Linie komórkowe:**

- HepG2 – ludzki nowotwór (wątrobiak) wątroby.
- Hep3A4 – subklon linii HepG2 z nadekspresją genu izoenzymu CYP3A4.

Obie linie komórkowe otrzymano za zgodą prof. Arthura I.Cederbaum z Departament of Pharmacology and Biological Chemistry, The Mount Sinai Medical Center (New York, USA), dzięki uprzejmości dr hab. Adama Hołowni z Zakładu Farmakologii Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

- **Materiały używane do prowadzenia hodowli komórkowej:**

- Płodowa surowica bydlęca (ang. *Fetal Bovine Serum* – FBS) inaktywowana termicznie (30 minut, 56°C), pożywka MEM (ang. *Minimum Essential Medium*), trypsyna-EDTA – GIBCO®, Wielka Brytania.
- Antybiotyki: penicylina G i streptomycyna, wodorowęglan sodu (NaHCO₃) – Sigma-Aldrich Co., USA.

V.1.8. Zwierzęta doświadczalne.

- Myszy WT (POR^{lox/lox}) i HRN (POR^{lox/lox} + Cre^{ALB}) (osobniki męskie w 12 – 16 tygodniu życia) pochodziły z Biomedical Research Centre, University of Dundee, Wielka Brytania. Zwierzęta hodowano w standardowych warunkach z nieograniczonym dostępem do karmy dla gryzoni i wody, w cyklu 12 godzin jasno/12 godzin ciemno. Pokolenie myszy HRN otrzymano wg metody opisanej w [Henderson i wsp., 2003].

V.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.

- Aparat do transferu białek – SCIE PLAS, Wielka Brytania.
- Chromatograf HPLC Agilent sprzężony ze spektrometrem mas LC/MSD (seria 1100) lub LC/QTOF-MS (seria 6500) – Agilent Technologies, USA.
- Chromatograf HPLC Waters – Waters Co., USA.
 - Typ Breeze: inżektor (Rheodyne 7725i), binary HPLC Pump (Waters 1525), dual λ Absorbance Detector (Waters 2487), 717 plus Autosampler.
 - Typ Millennium: inżektor (Rheodyne 7725i), detektor wielodiodowy (Waters 2996), system kontrolny 600E.
- Czytnik płytek Multilabel Counter Victor3TM – PerkinElmer, USA.
- Homogenizator ręczny – Wheaton Science Products, USA.
- Inkubator z atmosferą CO₂ do hodowli komórkowych – NuAire, Inc., USA.

- Kolumny chromatograficzne, typu RP – SUPELCO, USA.
 - kolumna analityczna – Suplex pKb-100, 25 cm × 4,6 mM, 5 µm.
 - prekolumna – Suplex pKb-100, 2 cm.
- Licznik komórek Z1 Coulter Particle Counter – Beckman Coulter, USA .
- Łaźnia ultradźwiękowa Bandelin Sonorex, RK52 – Bandelin Electronic GmbH & Co., Niemcy.
- Łaźnia wodna Fisherbrand, typ PRL TA14 – Fisher Scientific, Wielka Brytania.
- pH-Metr ORION, model 710A – Thermo Orion, USA.
- Spektrometr GENESYS 20 – Thermo Spectronic, USA.
- Spektrofotometr dwuwiązkowy UV-vis CARY 300 Bio – Varian Inc., Australia.
- System do oczyszczania wody MiliQ Integral3 – Millipore Co., USA.
- Termoblok Grant – Grant Instruments Ltd., Wielka Brytania.
- Ultrawirówka Beckman Optima wyposażona w rotor NVTi65 – Beckman Instruments, USA .
- Waga analityczna WA 35, typ PRL TA14 – Kern & Sohn GmbH, Niemcy.
- Waga techniczna KERN EG220-3NM – Kern & Sohn GmbH, Niemcy.
- Wirówki: MiniSpin, Centrifuge 5810R, Centrifuge 5417R – Eppendorf, Niemcy.
- Worteks, model TTS2 – IKA Works Inc., USA.
- Wyciąg laminarny Nuair Biological Safety Cabinets – NuAire, Inc., USA.
- Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System – Bio-Rad Laboratories, Inc., USA.

V.3. Warunki analizy chromatograficznej.

Skład otrzymywanych mieszanin reakcyjnych analizowałam metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, RP-HPLC, z udziałem detektora absorbancji w układzie wielodiodowym (DAD, chromatograf HPLC Waters Millennium), z detekcją punktową (chromatograf HPLC Waters Breeze) lub w tandemie ze spektrometrem masowym, LC/MSD czy LC/QTOF-MS (chromatograf HPLC Agilent). Próbkę badałam bezpośrednio po zmieszaniu wszystkich składników mieszaniny reakcyjnej (start reakcji) oraz po zakończeniu inkubacji w określonych odstępach czasu. Rozpatrywałam czasy retencji pików substratów i produktów reakcji, ich widma absorpcyjne UV-vis oraz jony masowe i fragmentacyjne. Kontrolę dodatkowych składników mieszaniny reakcyjnej prowadziłam na podstawie chromatogramów w formie poziomicowej. Każdą reakcję przeprowadzałam i analizowałam co najmniej dwukrotnie.

Tabela 4. Zmiany składu fazy ruchomej zastosowane w analizach chromatograficznych.

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Skład fazy ruchomej (%)		Krzywa zmian
		A	B	
-	1	85	15	-
25	1	20	80	6
28	1	0	100	6
30	1	85	15	6

W Tabeli 4 zamieściłam stosowany optymalny gradient składu fazy ruchomej, którą stanowiły:

- A: bufor mrówczanowy**¹⁵ o stężeniu 0,05 M, pH~3,4 (3,15 g HCOONH₄/1 l H₂O, pH stabilizowano 88 – 91% kwasem mrówkowym) z 5% dodatkiem alkoholu metylowego o czystości HPLC
lub
bufor fosforanowy o stężeniu 0,05 M, pH~3,5 (3,0 g NaH₂PO₄/0,5 l H₂O, pH stabilizowano 85% kwasem fosforowym (V)) z 5% dodatkiem alkoholu metylowego o czystości HPLC,
B: alkohol metylowy o czystości HPLC z 5% dodatkiem H₂O.

V.4. Metody i techniki doświadczalne.

V.4.1. Przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec różnych enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

V.4.1.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów.

- 0,002 M roztwór C-1311 w buforze reakcyjnym (0,088 mg/0,1 ml buforu).
- 0,002 M roztwór C-1330 w buforze reakcyjnym (0,091 mg/0,1 ml buforu).
- 0,02 M roztwór NADPH w buforze reakcyjnym (1,67 mg /0,1 ml buforu).
- 0,01 M roztwór MTZ w buforze reakcyjnym (0,115 mg/0,1 buforu).
- 0,01 mM roztwór ABT w buforze reakcyjnym (0,135 mg/0,1 buforu).
- 0,025 M roztwór UDPGA w H₂O (roztwór A).
- Frakcja mikrosomalna komórek wątroby szczura i człowieka – 20 mg/ml.
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450, o obniżonej (L) i podwyższonej (H) aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450¹⁶:

CYP	Stężenie (µM)
1A2L / H	8,2 / 10,5
2C9L / H	5,1 / 5,6
2C19L / H	7,1 / 4,9
2D6L / H	5,7 / 6,9
3A4L / H	5,6 / 7,2

- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy monooksygenazy flawinowej: FMO1, FMO3, FMO5 – 5 mg/ml.
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy transferazy glukuronianowej: UGT1A1, UGT2B7 – 5 mg/ml.
- β-Glukuronidaza – aktywność 100 U/µl.
- Oksydaza ksantynowa – w postaci stałej, gdzie 0,09 U/1 mg proszku, 0,6 U/1 mg białka.
- Frakcja mikrosomalna komórek wątroby myszy WT¹⁷ – 11 mg/ml.

¹⁵ Mrówczan amonu zastosowałam do analizy przemian pochodnych imidazoakrydonu wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i człowieka oraz rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450.

¹⁶ Przed użyciem do reakcji roztwór enzymu rozcieńczałam jeszcze pięciokrotnie buforem przeznaczonym do przechowywania rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450.

¹⁷ Frakcje mikrosomalne z komórek wątroby myszy otrzymano metodą wirowania różnicowego [Meehan i wsp., 1988].

- Frakcja mikrosomalna komórek wątroby myszy HRN – 20 mg/ml.

V.4.1.2. Roztwory buforowe.

- **Bufor fosforanowy sodowy** o stężeniu 0,1 M, pH~7,4 (0,1 M roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ zmieszano z 0,006 M roztworem $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ w stosunku 1:1 i dodano Na_2EDTA , pH stabilizowano 1 N roztworem NaOH):
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ o stężeniu 0,1 M (1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ /100 ml H_2O),
 - $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ o stężeniu 0,006 M (0,122 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ /100 ml H_2O),
 - 0,0716 g Na_2EDTA / 100 ml H_2O (0,002 M).
- **Bufor fosforanowy potasowy** (KH_2PO_4) o stężeniu 0,1 M, pH~7,4 lub 8,4 (0,1 M roztwór KH_2PO_4 zmieszano z 0,1 M roztworem K_2HPO_4 w stosunku 1:1, pH stabilizowano 1 N roztworem KOH):
 - KH_2PO_4 o stężeniu 0,1 M (1,36 g KH_2PO_4 /100 ml H_2O),
 - K_2HPO_4 o stężeniu 0,1 M (1,74 g K_2HPO_4 /100 ml H_2O).
- **Bufor TRIS-zasada** o stężeniu 0,15 M, pH~7,4 (1,93 g Tris-zasady/100 ml H_2O , pH stabilizowano 1 N roztworem HCl).
- **Roztwór B** (250 mM Tris HCl , 40 mM MgCl_2 , 0,125 mg/ml alametycyny w H_2O).
- **Bufor do przechowywania rekombinowanych ludzkich izoenzymów cytochromu P450**, pH~7,4 – w 50 ml H_2O rozpuszczono 0,303 g Tris-zasady (50 mM), 0,00448 g Na_2EDTA (0,25 mM) i 4,279 g sacharozy (250 mM), pH stabilizowano 99,5% lodowatym CH_3COOH .
- **Buforowana sól fizjologiczna x 5, PBS** (ang. *phosphate buffered saline*), pH~7,2 (685 mM NaCl , 7 mM KH_2PO_4 , 40 mM Na_2HPO_4 , 13 mM KCl , pH stabilizowano 1 N roztworem HCl).

V.4.1.3. Skład mieszanin reakcyjnych.

Tabela 5. Zestawienie stężeń końcowych poszczególnych składników mieszanin reakcyjnych.

C-1311 / C-1330 (mM)	Rodzaj frakcji mikrosomalnej lub enzym	Kofaktor (mM)	Bufor reakcyjny
0,2	mikrosomy szczurze lub ludzkie: 2 mg/ml	NADPH: 2	0,1 M bufor fosforanowy sodowy, pH~7,4
0,2	CYP: 0,05 / 0,2 / 0,5 μM	NADPH: 2	0,1 M bufor fosforanowy potasowy, pH~7,4
0,1	FMO1, FMO3 lub FMO5: 1 mg/ml	NADPH: 0,3	0,1 M bufor fosforanowy potasowy, pH~8,4
0,1	mikrosomy szczurze: 1 / 2 / 3 mg/ml	NADPH: 2 UDPGA: 1,25 / 2,5 / 3,75	roztwór B w H_2O
0,005	UGT1A1 lub UGT2B7: 1 mg/ml	UDPGA: 2	roztwór B w H_2O
0,1	XO: 1,65 mg/ml	X	0,15 M bufor Tris-zasada, pH~7,4
0,2	mikrosomy myszy WT lub HRN: 2 mg/ml	NADPH: 2	0,1 M bufor fosforanowy sodowy, pH~7,4

V.4.1.4. Przebieg doświadczeń.

V.4.1.4.1. Metabolizm wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, rekombinantowych ludzkich izoenzymów CYP i FMO oraz XO.

Inkubację C-1311 (C-1330) z enzymami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby (szczura, człowieka, myszy WT lub HRN), rekombinantowymi ludzkimi izoenzymami CYP i FMO czy XO prowadziłam w odpowiednim buforze reakcyjnym. Po 5 minutach wstępnej preinkubacji w łaźni wodnej (37°C) do mieszaniny związku i mikrosomów (enzymu) dodawałam kofaktor reakcji enzymatycznej – NADPH (za wyjątkiem reakcji z udziałem XO). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną poddawałam dalszej inkubacji w tej samej temperaturze przez określony czas (0, 30, 60, 90 i 120 minut) po upływie, którego uzyskany roztwór chłodziłam w łaźni lodowej, a następnie dodawałam równoważną ilość schłodzonego alkoholu metylowego w celu zatrzymania reakcji. Uzyskaną mieszaninę chłodziłam ponownie przez 10 minut, po czym wirowałam (5 – 15 minut, 10000 rpm). Powstały supernatant nanosiłam na kolumnę chromatograficzną i analizowałam metodą RP-HPLC z detekcją UV-vis i/lub ESI-MS (w przypadku reakcji wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy zastosowałam analizę LC/MALDI-QTOF-MS/MS).

V.4.1.4.2. Wykazanie udziału FMO w metabolizmie C-1311 wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Mieszaninę frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura (2 mg/ml) inkubowałam w obecności lub przy braku 1 mM MTZ lub 1 mM ABT, z dodatkiem 2 mM NADPH (w 0,1 M buforze fosforanowym potasowym, pH~7,4) przez 30 minut w 37°C. Do mieszaniny inkubacyjnej dodawałam następnie roztwór C-1311 (0,2 mM) i całość inkubowałam przez kolejne 60 minut w 37°C.

Badając wpływ podwyższonej temperatury na aktywność FMO mieszaninę frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura (2 mg/ml), w obecności i przy braku 2 mM NADPH (w 0,1 M buforze fosforanowym potasowym, pH~7,4), inkubowałam w termobloku przez 5 minut w 45°C. Po tym czasie uzupełniałam powyższą mieszaninę roztworem C-1311 (0,2 mM), 2 mM NADPH (tam gdzie był nieobecny) i 1 mM MTZ, po czym całość inkubowałam przez kolejne 60 minut w 37°C.

Po zakończeniu inkubacji postępowалаm dalej zgodnie z opisem zawartym w punkcie V.4.1.4.1.

V.4.1.4.3. Metabolizm wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby oraz rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT.

Po 5 minutach wstępnej preinkubacji w łaźni wodnej (37°C) do mieszaniny C-1311 (C-1330) i frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura dodawałam roztwór NADPH i UDPGA. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną poddawałam dalszej inkubacji w tej samej temperaturze przez 0, 30, 60 i 90 minut.

Mieszaninę C-1311 (C-1330) z rekombinantowymi ludzkimi izoenzymami UGT1A1 lub UGT2B7 oraz UDPGA inkubowałam przez 0 i 60 minut (37°C).

Przemiany metaboliczne pochodnych imidazoakrydonu wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura oraz NADPH i UDPGA, jako kofaktorów FMO i UGT, badałam stosując trzystopniową inkubację. Mieszaninę 0,2 mM C-1311 (C-1330), 2 mg/ml frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i 1 mM NADPH inkubowałam 60 minut (37°C). Następnie dodawałam 2,5 mM UDPGA i inkubowałam przez kolejne 60 minut (37°C), a po upływie tego czasu do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam β -glukuronidazę (10 U/ μ l) na kolejne 60 minut inkubacji (37°C).

Po upływie wskazanych czasów inkubacji postępowałam wg instrukcji przedstawionej w punkcie V.4.1.4.1.

V.4.1.4.4. Badania farmakokinetyczne związku C-1311 u myszy WT i HRN¹⁸.

Badania farmakokinetyczne C-1311 przeprowadzono dwukrotnie stosując w każdym przypadku dwie myszy WT i dwie myszy HRN. Badany związek został podany zwierzętom doświadczalnym dootrzewnowo w pojedynczej dawce 50 mg/kg masy ciała (roztwór 5 mg/ml w PBS x 1, pH~7,4, zastosowano 5 ml/kg). Próbkę krwi, o objętości 10 μ l, zostały pobrane z żyły bocznej ogona myszy po 10, 20, 40, 60 minutach oraz 2, 4 i 6 godzinach od momentu zaaplikowania związku i umieszczone w probówkach zawierających 10 μ l heparyny (15 IU/ml). Od tego momentu przechowywano je w lodzie.

Dwóm dodatkowym myszom z każdego genotypu podano taką samą dawkę C-1311, po czym umieszczono je w specjalnych klatkach metabolicznych. Mocz tych myszy zbierano w temperaturze pokojowej po 4, 6 i 24 godzinach.

Do zebranych próbek krwi i moczu dodano 10 μ l wzorca wewnętrznego, warfaryny (10 μ g/ml w alkoholu metylowym). Po wymieszaniu roztworów przez 1 minutę (worteks), odwirowano je 5 minut, przy 15000 rpm, w 4°C. Po usunięciu supernatantu próbki moczu suszono w strumieniu azotu w 50°C. Osad zawieszono w fazie ruchomej do HPLC. W przypadku próbek krwi supernatant poddano bezpośrednio analizie LC/MALDI-QTOF-MS/MS. Określono tempo eliminacji pochodnej imidazoakrydonu w czasie oraz wyznaczono niektóre parametry farmakokinetyczne.

V.4.2. Badania wpływu C-1311 i C-1330 na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450.

V.4.2.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów.

- Roztwory: C-1311, C-1330 i NADPH przygotowałam jak w punkcie V.4.1.1.
- 0,02 M roztwór 7-etoksykumaryny w DMSO (0,38 mg/0,1 ml DMSO) rozcieńczano w H₂O do stężenia 0,002 M.

¹⁸ Ten etap badań przeprowadziłam pod kierunkiem dr Colina Hendersona w Biomedical Research Centre, University of Dundee, Wielka Brytania.

- 0,02 M roztwór imipraminy w DMSO (0,63 mg/0,1 ml DMSO) rozcieńczano w H₂O do stężenia 0,002 M.
- 0,02 M roztwór testosteronu w DMSO (0,58 mg/0,1 ml DMSO) rozcieńczano w H₂O do stężenia do 0,002 M.
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450 – stężenia jak w punkcie V.4.1.1. (izoenzymy o obniżonej aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450 (L) stosowano w badaniach dla C-1311, izoenzymy o podwyższonej aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450 (H) stosowano w badaniach dla C-1330).

V.4.2.2. Skład mieszanin reakcyjnych.

Tabela 6. Zestawienie stężeń końcowych poszczególnych składników mieszanin reakcyjnych; bufor reakcyjny: 0,1 M bufor fosforanowy potasowy, pH~7,4.

C-1311 / C-1330 (mM)	CYP (μM)	Substrat enzymu (mM)	NADPH (mM)
0,005 / 0,01 / 0,02 / 0,05	CYP1A2: 0,05	7-etoksykumaryna: 0,02	1
0,005 / 0,01 / 0,02 / 0,05	CYP3A4: 0,05	testosteron: 0,02	0,5
0,02	CYP2C19: 0,05	imipramina: 0,02	0,5
0,02	CYP2D6: 0,05	imipramina: 0,02	0,5

V.4.2.3. Przebieg doświadczeń.

Odpowiednią ilość następujących reagentów:

- CYP i C-1311 (C-1330),
- CYP i jego substrat,
- CYP, substrat enzymu i C-1311 (C-1330),

w 0,1 M buforze fosforanowym potasowym, pH~7,4, preinkubowałam 5 minut w 37°C. Do mieszaniny dodawałam następnie NADPH, kofaktor reakcji enzymatycznej. Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników, otrzymaną mieszaninę reakcyjną poddawałam dalszej inkubacji w tej samej temperaturze (0 – 60 minut). Po upływie określonego czasu inkubacji postępowалам wg instrukcji przedstawionej w punkcie V.4.1.4.1.

V.4.3. Badania mechanizmu hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez związek C-1311.

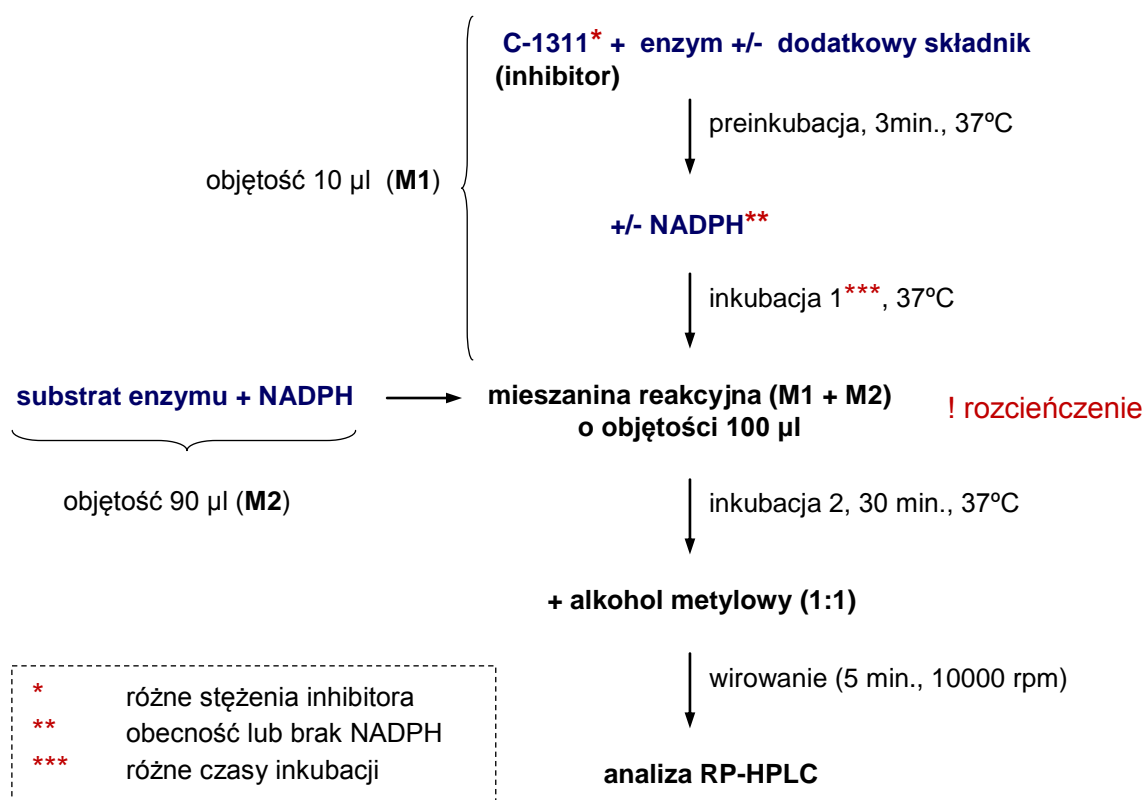
V.4.3.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów.

- Roztwory: C-1311, C-1330 i NADPH przygotowałam jak w punkcie V.4.1.1.

- Roztwory: 7-etoksykumaryny i testosteronu przygotowałam jak w punkcie V.4.2.1.
- 0,01 M roztwór GSH w H₂O (0,31 mg/0,1 ml H₂O)
- 0,04 M roztwór K₃[Fe(CN)₆] w H₂O (0,13 mg/0,1 ml H₂O)
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy CYP1A2H i CYP3A4H – stężenia jak w punkcie V.4.1.1.
- Katalaza – aktywność 20000 U/ml.

V.4.3.2. Przebieg doświadczeń i skład mieszanin reakcyjnych.

Mechanizm obserwowanej inaktywacji izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez imidazoakrydon C-1311 badałam stosując metodę rozcieńczenia wg schematu przedstawionego na Rys.107.



Rys.107. Szczegółowy schemat przebiegu doświadczeń dla określenia czy mechanizm hamowania aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez związek C-1311 jest inhibicją „mechanism-based”.

Wpływ C-1311 na aktywność enzymów cytochromu P450 mierzyłam na podstawie obserwacji metabolizmu ich standardowych substratów. Mieszaninę enzymu, C-1311 i dodatkowego reagenta (w zależności od rodzaju doświadczenia), w 0,1 M buforze fosforanowym potasowym, pH~7,4, preinkubowałam 3 minuty w łaźni wodnej (37°C). Reakcję rozpoczynałam poprzez dodanie NADPH. Po określonym czasie inkubacji 1 mieszaninę reakcyjną M1 rozcieńczałam dziesięciokrotnie mieszaniną M2, czyli roztworem standardowego substratu enzymu i NADPH. Końcową mieszaninę reakcyjną (M1 + M2) inkubowałam przez kolejne 30 minut (37°C), po czym postępowалаm wg instrukcji przedstawionej w punkcie V.4.1.4.1.

Tabela 7. Zestawienie stężeń końcowych poszczególnych składników mieszaniny inkubacyjnej M1 (przed rozcieńczeniem); bufor reakcyjny: 0,1 M bufor fosforanowy potasowy, pH~7,4.

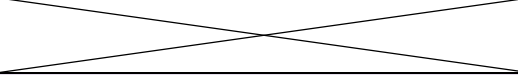
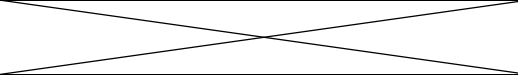
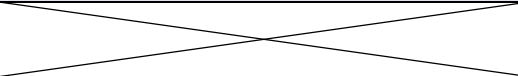
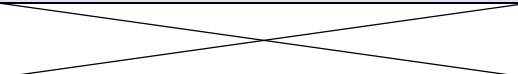
C-1311 (mM)	CYP (μM)	NADPH (mM)	Dodatkowy składnik mieszaniny M1
A. Określenie charakteru inhibicji			
0,2	1	0,5	
B. Wpływ stężenia inhibitora oraz obecności kofaktora NADPH			
0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1	1	0,5	
C. Wpływ czasu inkubacji enzymu z inhibitorem oraz obecności kofaktora NADPH			
0,05 (dla CYP1A2) 0,1 (dla CYP3A4)	1	0,5	
D. Wyznaczenie współczynnika podziału i liczby przemiany			
zakres stężeń: 0,0125 – 2,5	0,5	1	
E. Wpływ obecności standardowych substratów enzymów			
0,05 (dla CYP1A2) 0,2 (dla CYP3A4)	0,5	1	7-etoksykumaryna: 0,05 / 0,1 / 0,4 testosteron: 0,2 / 0,4 / 0,8
F. Wpływ glutationu			
0,05 (dla CYP1A2) 0,2 (dla CYP3A4)	0,5	1	GSH: 1 / 2 / 5 mM
G. Wpływ katalazy			
0,05 (dla CYP1A2) 0,2 (dla CYP3A4)	0,5	1	katalaza: 1000 / 2000 / 5000 U/ml
H. Wpływ żelazicyjanku potasu			
0,05 (dla CYP1A2) 0,2 (dla CYP3A4)	0,5	1	K ₃ [Fe(CN) ₆]: 2 mM

Tabela 8. Zestawienie stężeń końcowych poszczególnych składników mieszaniny inkubacyjnej M2; bufor reakcyjny: 0,1 M bufor fosforanowy potasowy, pH~7,4.

Substrat enzymu (mM)	NADPH (mM)
7-etoksykumaryna: 0,02	0,5
testosteron: 0,02	0,5

Dodatkowe informacje o przebiegu doświadczeń:

- Ad. A. Czas inkubacji 1: 40 minut.
 Ad. B. Czas inkubacji 1: 40 minut.
 Ad. C. Czas inkubacji 1: 10, 20, 30, 40, 50, 60 minut (w przypadku CYP1A2).
 Czas inkubacji 1: 20, 40, 60, 80, 100, 120 minut (w przypadku CYP3A4).

- Ad. D. Czas inkubacji 1: 30 minut (w przypadku CYP1A2).
Czas inkubacji 1: 60 minut (w przypadku CYP3A4).
- Ad. E. Czas inkubacji 1: 10, 20, 30 minut (w przypadku CYP1A2).
Czas inkubacji 1: 20, 40, 60 minut (w przypadku CYP3A4).
Stosunek stężenia C-1311 do stężenia substratu enzymu w mieszaninie M1 wyniósł:
1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 0:1.
- Ad. F i G. Czas inkubacji 1: 10, 20, 30, 40, 50, 60 minut.
- Ad. H. Po 30 minutach inkubacji 1 do mieszaniny reakcyjnej M1 wprowadzałam roztwór $K_3[Fe(CN)_6]$ i całość inkubowałam przez kolejne 15 minut, do czasu rozcieńczenia mieszaniną M2.

V.4.4. C-1311 i C-1330 w komórkach ludzkich nowotworów wątroby, HepG2 i Hep3A4.

V.4.4.1. Hodowla komórek nowotworowych.

Komórki ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i Hep3A4 hodowałam w pożywce MEM z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i antybiotyków (streptomycyna – 100 µg/ml, penicylina G – 100 j/ml), w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Komórki rosły w postaci monowarstwy, a czas ich podwojenia wynosił odpowiednio dla: HepG2 – około 32 godzin, dla Hep3A4 – około 42 godzin. Podczas pasaży oraz w trakcie prowadzonych eksperymentów, do odklejenia komórek z powierzchni naczynia hodowlanego używałam 0,25% roztworu trypsyny-EDTA. W doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych stosowałam związki C-1311 i C-1330 w postaci roztworów przygotowywanych w 50% (v/v) alkoholu etylowym (końcowe stężenie alkoholu etylowego w zawiesinie komórek traktowanych związkiem nie przekraczało 0,05% (v/v)).

V.4.4.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej C-1311 wobec komórek HepG2 i Hep3A4 w oparciu o test MTT.

Test MTT polega na ilościowym kolorymetrycznym oznaczeniu barwnego produktu – formazonu – powstającego po dodaniu MTT (bromku 3-[4,5-dimetylo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazolu] do zawiesiny hodowlanej w obecności badanego związku. Redukcja MTT do formazonu następuje w sposób proporcjonalny do ilości komórek. Proces ten zachodzi jedynie w mitochondriach żywych, aktywnych metabolicznie, komórek. Jeżeli więc komórki zostały wcześniej uszkodzone lub zniszczone przez związek, czy też jego metabolity, reakcja ta jest mniej intensywna lub nie zachodzi w ogóle, co można stwierdzić po zmianie barwy i oznaczyć fotometrycznie.

Oznaczenie aktywności cytotoksycznej imidazoakrydonu C-1311 w stosunku do komórek ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i Hep3A4 prowadziłam po 72 godzinach ciągłej inkubacji komórek ze związkiem w zakresie stężeń końcowych C-1311: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 i 100 µM. Komórki wysiewałam w ilości 20 tys./2 ml pożywki na studzienkę do płytek 24-studzienkowych na 24 godziny przed podaniem związku, w celu przyklejenia komórek do podłoża.

Do każdej studzienki dodałam 20 µl roztworu badanego związku o odpowiednim stężeniu (na każde stężenie związku przeznaczyłam po dwie studzienki). Do komórek kontrolnych (tzn. nietraktowanych C-1311) dodałam równoważną ilość 50% alkoholu etylowego. Po zakończonej inkubacji komórek z C-1311 do każdej studzienki wprowadziłam po 200 µl roztworu MTT (4 mg/ml H₂O, kolor żółty). Po 4-godzinnej inkubacji odessałam supernatant z nadkryształów wytrąconego formazanu (kolor fioletowy) i do każdej studzienki dodałam po 2 ml DMSO. Płytkę z zawiesiną komórek łagodnie wytrząsałam przez 30 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej, w celu rozpuszczenia kryształów formazanu, po czym 200 µl roztworu z każdej studzienki przeniosłam do dwóch nowych studzienek na płytce 96-studzienkowej. Absorbancję roztworów w studzienkach mierzyłam spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm przy użyciu aparatu Multilabel Counter Victor3™ (PerkinElmer, USA). Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji wyliczyłam procent zahamowania wzrostu komórek HepG2 i Hep3A4 w obecności związku C-1311, przyjmując absorbancję roztworu uzyskaną dla komórek kontrolnych za 100%. Korzystając z równań fragmentów prostoliniowych krzywych zahamowania wzrostu komórek w zależności od logarytmu stężenia C-1311, wyznaczyłam wartość EC₅₀, tj. wartość stężenia imidazoakrydonu, przy której proliferacja komórek nowotworowych jest zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych.

V.4.4.3. Izolacja metabolitów z komórek HepG2 i Hep3A4 traktowanych C-1311 i C-1330.

Do izolacji powstających w komórkach nowotworowych metabolitów pochodnych imidazoakrydonu zastosowałam metodę ekstrakcji 60% roztworem alkoholu metylowego w połączeniu z sonifikacją w łaźni ultradźwiękowej [Wiśniewska, 2008].

Po uzyskaniu wzrostu konfluentnego, komórki HepG2 (Hep3A4) wysiewałam w ilości 2 x 10⁶ komórek/cm² na płytce Petriego (60 x 15 mm) na 24 godziny przed podaniem związku, w celu przyklejenia ich do podłoża. Do komórek wprowadzałam następnie 50 µl C-1311 (C-1330) o stężeniu 10 mM (dla uzyskania końcowego stężenia 0,1 mM) na określony czas inkubacji (3, 12, 24, 72 i 96 godzin). Do komórek kontrolnych dodawałam odpowiednią ilość 50% alkoholu etylowego. Po zakończeniu inkubacji zbierałam pożywkę z nad warstwy komórek, przemywałam płytkę dwukrotnie 4 ml PBS x 1 i wirowałam (5 minut, 1000 rpm, 4°C). Po ponownym przemyciu osadu 4 ml PBS x 1 całość jeszcze raz wirowałam w tych samych warunkach, a pellet zawieszałam w 0,05 ml 60% alkoholu metylowego. Z kolei komórki znajdujące się na płytce usunęłam tzw. scraperem w obecności 0,4 ml 60% alkoholu metylowego. Uzyskane ekstrakty metanolowe łączyłam ze sobą. Otrzymaną zawiesinę komórek poddawałam sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez 15 minut, a po 1-godzinnej inkubacji w lodzie ponownie wirowałam (20 minut, 13000 rpm, 4°C). Końcowy roztwór odparowywałam z nadmiaru alkoholu etylowego w strumieniu powietrza atmosferycznego. Supernatant nanosiłam na kolumnę chromatograficzną i analizowałam metodą RP-HPLC z detekcją UV-vis i ESI-MS.

V.4.4.4. Immunodetekcja białka CYP3A4 metodą Western blotting.

V.4.4.4.1. Przygotowanie odczynników i roztworów.

- **Bufor do izolacji frakcji mikrosomalnej (KCI-KPB)** – 10 mM KHPO₄, pH~7,4, 150 mM KCl, 0,1 mM Na₂EDTA.
- **Bufor do przechowywania frakcji mikrosomalnej** – 250 mM roztwór sacharozy w KCI-KPB.
- **30% Akrylamid** – 14,6 g akrylamidu do elektroforezy i 0,4 g N,N'-metylenobisakrylamidu rozpuszczono w 40 ml H₂O, wymieszano i uzupełniono H₂O do objętości 50 ml.
- **0,5 M Tris-HCl**, pH~6,8 – 3 g Tris-zasady rozpuszczono w 40 ml H₂O, pH stabilizowano 1 N roztworem HCl, całość uzupełniono H₂O do objętości 50 ml.
- **1,5 M Tris-HCl**, pH~8,8 – 9,07 g Tris-zasady rozpuszczono w 40 ml H₂O, pH stabilizowano 1 N roztworem HCl, całość uzupełniono H₂O do objętości 50 ml.
- **10% SDS** (1 g SDS/10 ml H₂O).
- **10% APS** (0,1 g APS/1 ml H₂O).

Tabela 9. Przygotowanie żeli do elektroforezy SDS-PAGE.

Składnik	Żel zagęszczający 5%	Żel rozdzielający 12%
	ml	
H ₂ O	5,7	3,4
30% Akrylamid	1,7	4,0
Bufor Tris-HCl	0,5 M, pH~6,8: 2,5	1,5 M, pH~8,8: 2,5
10% SDS	0,1	0,1
10% APS	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,005

- **Bufor obciążający do elektroforezy** – bufor Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH~6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,01% błękit bromofenolowy) i β-merkaptoetanol zmieszano w stosunku 19:1.
- **Bufor do elektroforezy** – 25 mM Tris-zasada, pH~8,3, 192 mM glicyna, 0,1% SDS.
- **Bufor do transferu** – 25 mM Tris-zasada, pH~8,3, 192 mM glicyna, 20% (v/v) alkohol metylowy.
- **Bufor blokujący** – 20 mM Tris-zasada, pH~7,4, 150 mM NaCl, 10% (w/v) odtłuszczone mleko w proszku.
- **Bufor płuczący (TBST)** – 10 mM Tris-zasada, pH~7,4, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20.
- **Bufor SB** (ang. *stripping buffer*) – 150 mM glicyna, pH~2,2, 0,1% (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween-20.

V.4.4.4.2. Izolacja frakcji mikrosomalnej z komórek HepG2.

Komórki HepG2, znajdujące się w fazie wzrostu odpowiadającej 80% konfluencji, inkubowałam ze związkami C-1311 w odpowiednim stężeniu i przez określoną ilość godzin. Po zakończonej inkubacji, komórki zbierałam przez trypsynowanie i wirowałam (5 minut, 1000 rpm, 4°C). Otrzymany osad przemywałam buforem PBS x 1, ponownie wirowałam w tych samych warunkach i zawieszałam w

buforze KCl-KPB (w zależności od wielkości pelletu stosowałam 0,5 – 1 ml buforu). Od tego czasu próbki przechowywałam w lodzie. Lizę komórek przeprowadzałam w ręcznym homogenizatorze (około 2 – 3 minut), otrzymaną zawiesinę ponownie wirowałam (20 minut, 12000 rpm, 4°C). Supernatant przenosiłam do probówki ultrawirówkowej (16 x 38 mm) i poddawałam ultrawirowaniu (1 godzina, 45000 rpm, 4°C). Uzyskany pellet zawieszałam w buforze do przechowywania frakcji mikrosomalnej i przechowywałam w temperaturze -80°C, do czasu przeprowadzenia eksperymentu. Stężenie białka całkowitego we frakcji mikrosomalnej oznaczałam metodą Bradford [Bradford, 1976], przy użyciu zestawu Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

V.4.4.4.3. Elektroforeza SDS-PAGE.

Próbki zawierające 40 µg białka całkowitego łączyłam z dwukrotną ilością buforu obciążającego do elektroforezy, denaturowałam przez 5 minut w temperaturze 100°C, odwirowywałam (2 minuty, 1200 x g), po czym poddawałam elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (5% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający). Elektroforezę prowadziłam przez 15 minut przy napięciu 90 V, a następnie przez 120 minut przy 120 V w buforze do elektroforezy.

V.4.4.4.4. Immunobarwienie (immunoblotting).

Po zakończonej elektroforezie przeprowadziłam transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową stosując metodę tzw. elektrotransferu półsuchego. Transfer białek, po uprzednim nasączeniu żelu, membrany oraz bibuły Whatman 3 mm w buforze do transferu, prowadziłam przez 1 godzinę przy stałym natężeniu prądu 40 mA. Po skończonym transferze blokowałam potencjalne miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał poprzez umieszczenie błony nitrocelulozowej w buforze blokującym na 2 godziny w temperaturze pokojowej z łagodnym wytrząsaniem. Następnie, membranę płukałam trzykrotnie po 15 minut w buforze TBST i inkubowałam z przeciwciałem pierwszorzędowym zawieszonym w buforze TBST z 5% (w/v) dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku, przez noc w temperaturze 4°C. Po kolejnym trzykrotnym 15-minutowym płukaniu membrany w TBST membranę inkubowałam dalej w buforze TBST zawierającym przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową. Inkubację prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, łagodnie wytrząsając. Lokalizację białek na błonie nitrocelulozowej przeprowadziłam stosując substrat luminescencyjny dla HRP (zestaw SuperSignal West PICO Chemiluminescent Substrate, Fisher Scientific, Wielka Brytania) z detekcją sygnału po odpowiednim czasie ekspozycji kliszy fotograficznej Hyperfilm (Kodak, Polska). W celu weryfikacji równomiernego napełnienia studzienek podczas elektroforezy oznaczyłam poziom NADPH-reduktazy cytochromu P450. W tym celu po zakończonej detekcji membranę płukałam trzykrotnie buforem TBST przez 10 minut, a następnie inkubowałam w buforze SB przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym trzykrotnie płukałam buforem TBST przez 10 minut. Tak przygotowaną membranę blokowałam w buforze blokującym i powtarzałam przedstawioną powyżej procedurę inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami. Przeciwciała pierwszorzędowe zostały użyte w

następujących rozcieńczeniach: anty-CYP3A4 – 1:2500, anty-CPR – 1:2500. Przeciwciała drugorzędowe zostały użyte w rozcieńczeniach: 1:7000 dla anty-CYP3A4, 1:2000 dla anty-CPR.

VI. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI.

Zrealizowana przeze mnie praca stanowi kontynuację, prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, badań nad poznaniem molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych związku C-1311, będącego najbardziej aktywną przeciwnowotworowo pochodną z grupy imidazoakrydonów, która pod nazwą Symadex™, znalazła się w drugiej fazie badań klinicznych.

Dla racjonalnego stosowania leków niezmiernie istotne jest ustalenie sposobu ich oddziaływania ze składnikami żywego organizmu, w wyniku czego dochodzi do wyzwolenia efektu farmakologicznego. Wyniki dotychczasowych badań, zmierzających do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania imidazoakrydonów, wyłoniły hipotezę, iż metaboliczna aktywacja może być etapem wstępnym ich biochemicznego działania na poziomie komórkowym. Wykazano bowiem, że wyjątkowa zdolność do kowalencyjnego międzyłańcuchowego sieciowania DNA komórek nowotworowych przez tę grupę związków była obserwowana wyłącznie w żywych komórkach, a więc była uzależniona od aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych. Z drugiej strony, przekształcenie związków z formy latentnej w aktywną w warunkach *in vitro* okazało się niezbędne dla bezpośredniego ich wiązania się z DNA [Mazerska i wsp., 2001].

Badania przemian metabolicznych 2-hydroksyakrydonu, związku referencyjnego dla pochodnych imidazoakrydonu, a także C-1311, w modelowym układzie utleniającym wobec peroksydaz (m.in. HRP i ludzkiej MPO) [Mazerska, 2003; Mazerska i wsp., 2003] po raz pierwszy wskazały, iż związki te są podatne na aktywację enzymatyczną. Związek C-1311 ulegał w tych warunkach m.in. dealkilacji, w wyniku której powstawał produkt z jedną grupą etylową na atomie azotu w łańcuchu bocznym cząsteczki. Transformacja tej pochodnej prowadziła również do zmian w strukturze chromoforu z utworzeniem produktu posiadającego dodatkową grupę hydroksylową w jednym z pierścieni imidazoakrydonu. Wyniki tych badań, jak również badania produktów reakcji elektro- i fotochemicznych [Mazerska i wsp., 1997, 2002] wytyczyły możliwe kierunki przemian aktywacyjnych i miejsca reaktywne w cząsteczce badanej pochodnej imidazoakrydonu. Otrzymane produkty metabolizmu stały się związkami wzorcowymi w dalszych pracach, które dotyczyły transformacji metabolicznych C-1311 wobec enzymów zawartych we frakcji cytozolowej i mikrosomalnej komórek wątroby szczura i człowieka [Wiśniewska i wsp., 2007].

Od przebiegu biotransformacji leków zależy, m.in. stężenie substancji czynnej we krwi, droga eliminacji z ustroju, toksyczność i dostępność biologiczna w miejscu działania. Występowanie istotnych różnic w aktywności poszczególnych enzymów metabolizujących i

poziomie ekspresji kodujących je genów wśród populacji, jak również pomiędzy tkanką zdrową a nowotworową, powoduje, iż ocena przydatności terapeutycznej potencjalnego leku przeciwnowotworowego wymaga dodatkowo uwzględnienia wiedzy na temat molekularnych podstaw jego metabolizmu. Wiedzę tą można wykorzystać w planowaniu terapii ukierunkowanej i projektowaniu struktur nowych pochodnych o korzystnych właściwościach farmakologicznych. Wobec powyższego, kontynuowanie badań przemian metabolicznych zsyntetyzowanej w zespole Profesora Konopy przeciwnowotworowej pochodnej imidzoakrydonu, C-1311, było szczególnie uzasadnione, zważywszy, że związek ten znajduje się w zaawansowanych badaniach klinicznych.

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zmierzały w dwóch głównych kierunkach:

Po pierwsze, miały wskazać, które grupy enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby biorą udział w metabolizmie C-1311 oraz jego analogu strukturalnego, oznaczonego jako C-1330, posiadającego grupę metoksyłową zamiast hydroksyłowej w pozycji 8 pierścienia heterocyklicznego i wykazującego niższą niż C-1311 aktywność przeciwnowotworową. Badania te dążyły do poznania całościowych przemian, tzn. aktywacji i detoksykacji, jakim związki te, stanowiące potencjalne leki, będą ulegały w organizmie pacjenta.

Po drugie, miały na celu poznanie wpływu C-1311 na aktywność enzymów metabolizujących pierwszej fazy biotransformacji, głównie z rodziny cytochromu P450. Biorąc pod uwagę fakt, iż chemoterapia nowotworów jest zwykle terapią wielolekową wyniki tych badań określiłyby potencjalne interakcje C-1311 z innymi lekami w organizmie pacjenta.

Obserwując przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby różnego pochodzenia stwierdziłam, iż oba związki były wrażliwe zarówno wobec szczurzych, jak i ludzkich enzymów mikrosomalnych, chociaż wykazały zróżnicowaną zdolność do transformacji. Różnice dotyczyły głównie stężenia, a nie liczby powstających metabolitów, która dla każdego ze związków wynosiła cztery. Wynik ten pozwolił stwierdzić, iż mikrosomy szczurze, obok mikrosomów ludzkich, są również odpowiednim modelem do badania i przewidywania przemian metabolicznych badanych związków, jakie mogą zachodzić w organizmie człowieka.

W następstwie powyższych badań postanowiłam określić udział w metabolizmie C-1311 i C-1330 wybranych enzymów zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, co umożliwiłoby stworzenie pełnego i konsekwentnego obrazu odnośnie ich przemian metabolicznych w komórce. Głównymi składnikami frakcji mikrosomalnej komórek wątroby (ponad 60%), i najbardziej zaangażowanymi w reakcje biotransformacji ksenobiotyków (w tym leków), są enzymy z rodziny cytochromu P450 [Guengerich, 2006]. I o ile obie pochodne

imidzoakrydonu ulegały przemianom metabolicznym w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych komórek wątroby, to w kolejnym etapie pracy nie zaobserwowałam istotnej reaktywności C-1311 i C-1330 wobec żadnego z zastosowanych rekombinantowych ludzkich białek P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4, otrzymanych w komórkach *Escherichia coli*.

Ten nieoczekiwany rezultat pozwolił, podążając za danymi literaturowymi, na sformułowanie kilku możliwych wyjaśnień otrzymanego wyniku. Z jednej strony, można było podejrzewać, że C-1311 i C-1330, z powodu swojej struktury chemicznej, nie stanowią substratu dla żadnego z badanych izoenzymów cytochromu P450. Stąd powstało przypuszczenie, że to nie cytochromy P450, a inne enzymy metabolizujące zawarte w mieszaninie białek mikrosomalnych komórek wątroby, mogą pełnić kluczową rolę w metabolizmie badanych pochodnych imidzoakrydonu. Istniało również prawdopodobieństwo, że także metabolizm zachodzący poza komórkami wątroby może mieć istotne znaczenie w aktywacji metabolicznej obu związków. Nie można było również wykluczyć wpływu natywnej, a prawdopodobnie zmetabolizowanej (aktywnej), postaci związku na obniżenie aktywności katalitycznej enzymów cytochromowych. Hipoteza ta wydawała się szczególnie atrakcyjna, ze względu na niebezpieczeństwo występowania niepożądanych oddziaływań pomiędzy lekami. Przedstawione założenia zweryfikowałam w trakcie prowadzonych badań.

W pierwszej części swojej pracy skupiałam się na scharakteryzowaniu grup enzymów metabolizujących pierwszej i drugiej fazy metabolizmu uczestniczących w transformacjach C-1311 i C-1330, które obserwowałam wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Badania rozpocząłam od określenia czy druga ważna grupa enzymów metabolizujących obecnych w pęcherzykach mikrosomalnych komórek wątroby, monooksygenazy flawinowe (FMO), indukuje przemiany metaboliczne C-1311 i C-1330. Są to enzymy pierwszej fazy metabolizmu, pełniące zasadniczą funkcję detoksykacyjną, wykazujące aktywność utleniającą w stosunku do heteroatomów swoich substratów [Cashman, 2005]. Wykazałam, iż rekombinantowe ludzkie izoenzymy FMO1 i FMO3, ale nie FMO5, biorą udział w biotransformacji badanych związków, chociaż wydajność odpowiednich reakcji była zróżnicowana. W przypadku obydwu imidzoakrydonów otrzymywałam też pojedynczy produkt ich metabolizmu.

Najbardziej intensywne przemiany zarówno C-1311, jak i C-1330, zachodziły wobec FMO1, około 1,5 razy słabiej wobec FMO3, mimo że aktywność tych izoenzymów w stosunku do ich standardowego substratu podana przez producenta (BD Biosciences, USA) wskazywała na zależność odwrotną. Przyczynę takiej różnicy można upatrywać w tym, iż podczas reakcji FMO ze standardowym substratem reaktywnym heteroatomem jest atom

siarki, natomiast w przypadku C-1311 i C-1330 jest to atom azotu. Innym wytłumaczeniem różnic w reaktywności izoenzymów FMO wobec badanych związków może też być odmienne miejsce ich naturalnego występowania w organizmie. FMO1 jest enzymem dominującym spośród wszystkich izoform FMO występujących w ludzkiej wątrobie płodowej. Enzym ten zidentyfikowano także w nerkach, jelitach, przełyku i śluzówce nosa. Pomimo tego uważa się jednak, iż zasadniczo nie bierze on udziału w detoksykacji ksenobiotyków chyba, że występuje w bardzo wysokim stężeniu [Krueger i wsp., 2006]. Uzyskane przeze mnie wartości stopnia przereagowania C-1311 i C-1330 wobec FMO1 (odpowiednio około 23% i 37% po 90 minutach inkubacji) wskazują na prawdopodobną niesłuszność takiego przekonania w stosunku do badanych związków. Z kolei w wątrobie osób dorosłych przeważa ilość izoenzymu FMO3, uważanego za najbardziej aktywną formę FMO [Cashman, 2004]. Stopień przemiany badanych związków wobec FMO3, po 90 minutach inkubacji, był jednak niższy niż w obecności FMO1: 15% dla C-1311 i 25% dla C-1330. Wyniki badań reaktywności C-1311 i C-1330 wobec trzeciego z izoenzymów, FMO5, okazały się zgodne z danymi literaturowymi, które podają, iż enzym ten pozbawiony jest typowych cech oraz aktywności charakterystycznych dla FMO [Cashman, 2004]. W przypadku C-1311 zaobserwowałam przemiany metaboliczne o bardzo niskiej intensywności, natomiast C-1330 w ogóle nie był metabolizowany przez FMO5.

Analiza obrazów chromatograficznych składu mieszanin reakcyjnych, widm absorpcyjnych UV-vis oraz widm masowych pików chromatograficznych uzyskanych metabolitów pozwoliła zaproponować strukturę produktu C-1311 i C-1330 otrzymanego wobec FMO (P_{FMO} i P^*_{FMO}) jako N-tlenku na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym badanych związków. Jest to typ produktu, znany z literatury, charakterystyczny dla katalizowanych przez FMO przemian detoksykacyjnych amin trzeciorzędowych. Co ciekawe, tożsamy metabolit otrzymywałam także w reakcji obu związków wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby (odpowiednio P3 i P*4 na Rys.24). Udział FMO, a jednocześnie wyeliminowanie wpływu cytochromów P450, w powstawaniu N-tlenku potwierdziłam wykonując kilka dodatkowych doświadczeń, które opierały się na istnieniu różnic we właściwościach kinetycznych oraz mechanizmie działania monooksygenaz flawinowych i enzymów cytochromowych.

Należy zaznaczyć, że aktywność FMO, w przeciwieństwie do aktywności cytochromów P450, nie jest indukowana, ani zazwyczaj nie ulega hamowaniu przez leki [Cashman, 2005]. W tym aspekcie, stosowanie leków metabolizowanych przez ten enzym w terapii wielolekowej, a są nimi także badane pochodne imidazoakrydonu, byłoby korzystnym posunięciem w kierunku wyeliminowania niekorzystnych farmakokinetycznych oddziaływań lek-lek.

Spośród innych enzymów mikrosomalnych komórek wątroby, mogących uczestniczyć w przemianach metabolicznych C-1311 i C-1330 w układach biologicznych, zwróciłam też uwagę na transferazy glukuronianowe (UGT), stanowiące rodzinę enzymów detoksykacyjnych drugiej fazy metabolizmu. W wyniku przeprowadzonych badań mogłam stwierdzić, że enzymy frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczurzej i ludzkiej, zastosowane w obecności UDPGA (substratu dla zawartych w nich izoenzymów UGT) są aktywne w stosunku do związku C-1311, przy czym wyższą aktywność wobec C-1311 wykazały białka mikrosomalne komórek wątroby szczura, niż człowieka. Natomiast badania wobec wybranych rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT wskazały, iż związek ten jest substratem izoenzymu UGT1A1, nie wykazuje natomiast reaktywności wobec UGT2B7. Przyczynę tej odmienności można upatrywać w różnicy specyficzności substratowej obu enzymów. UGT1A1 jest ponadto dominującym izoenzymem UGT, występującym w wątrobie ludzkiej, katalizującym reakcję sprzęgania wielu leków przeciwnowotworowych [Fisher i wsp., 2001].

Rezultatem katalizowanej przez UGT reakcji biotransformacji C-1311 był jeden produkt o zmienionym w stosunku do substratu widmie UV-vis (P_{UGT}). Na podstawie analizy widm MS przyjąłam, iż jest on wynikiem sprzężenia cząsteczki imidazoakrydonu z resztą kwasu glukuronowego. Wyniki badań, w których związek C-1330, 8-metoksylowa pochodna C-1311 z zablokowaną aktywną grupą hydroksylową, nie był metabolizowany ani wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, ani przez żaden z zastosowanych rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT wskazały, że musi to być pochodna O-glukuronidu na atomie tlenu z grupy hydroksylowej w pozycji 8 cząsteczki imidazoakrydonu. Obecność O-glukuronidu C-1311 potwierdziłam ostatecznie poprzez zastosowanie β -glukuronidazy, enzymu bakteryjnego, który katalizuje reakcję hydrolizy wiązania pomiędzy heteroatomem a resztą kwasu glukuronowego.

Przeprowadziłam też badania określające wzajemną relację pomiędzy FMO i UGT w przemianach metabolicznych imidazoakrydonów wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Wcześniejsze wyniki wskazały, że FMO jest odpowiedzialna za powstawanie produktu pierwszej fazy metabolizmu, zarówno w przypadku związku C-1311, jak i C-1330. Próba przeprowadzona wobec białek mikrosomalnych komórek wątroby szczura z udziałem kofaktorów obu enzymów: NADPH (także kofaktora cytochromów P450) i UDPGA, wskazała, że produkt utlenienia C-1311 pierwszej fazy metabolizmu (N-tlenek) jest dalej przekształcany do postaci O-glukuronidu, podczas gdy metabolit fazy pierwszej związku C-1330 nie ulegał dalszym transformacjom. Spostrzeżenie to potwierdziło sugestię, iż kluczowa dla reakcji glukuronidacji jest zatem obecność grupy hydroksylowej na atomie węgla C8 rdzenia imidazoakrydonu. Być może zdolność do tworzenia koniugatów przyczynia

się do obniżonej toksyczności C-1311 w porównaniu z innymi pochodnymi imidazoakrydonu, nie posiadającymi podstawnika hydroksylowego w układzie pierścieniowym.

Powyższe obserwacje stanowią też mocne wsparcie dla poglądu, że w żywym organizmie istnieje relacja pomiędzy pierwszą, a drugą fazą metabolizmu. W ich następstwie na drodze przemian detoksykacyjnych imidazoakrydonu C-1311 powstały dwa produkty, pochodne O-glukuronidu, których właściwości fizykochemiczne pozwalają na ich łatwe usunięcie z ustroju.

Poszukując innych niż cytochromy P450 enzymów zaangażowanych w metabolizm pochodnych imidazoakrydonu, przeprowadziłam też badania transformacji metabolicznych C-1311 z udziałem oksydazy ksantynowej (XO). Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały, że C-1311 nie stanowi substratu dla XO, mimo że badany związek zawiera pierścień imidazolowy obecny także w ksantynie, która jest naturalnym substratem stosowanego enzymu.

Uzupełnieniem badań metabolizmu przeciwnowotworowych pochodnych imidazoakrydonu stała się próba wyjaśnienia jaką rolę w transformacjach metabolicznych C-1311 i C-1330 spełnia NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450 (CPR), której obecność i odpowiedni poziom w komórkach wątroby warunkuje prawidłowe działanie fizjologiczne izoenzymów cytochromu P450. Doniesienia literaturowe wskazują, iż aby powstał funkcjonalnie aktywny kompleks cytochromu P450 i jego reduktazy stosunek tych komponentów powinien wynosić co najmniej 1:1. W błonie retikulum endoplazmatycznego ludzkich komórek wątroby, jak sprawdzono, ilość CPR jest jednak około 4 razy niższa niż cytochromu P450, dlatego uważa się, że jej obecność jest czynnikiem limitującym dla wielu reakcji zależnych od tego enzymu [Nadler i Strobel, 1991]. Fakt ten potwierdziły obserwacje, iż wprowadzenie dodatkowych cząsteczek CPR do mikrosomów może prowadzić do wzrostu aktywności cytochromów P450 [Kitada i wsp., 1979].

Chcąc określić czy i w jakim stopniu CPR determinuje przemiany metaboliczne obu pochodnych imidazoakrydonu przeprowadziłam reakcje C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy o prawidłowym poziomie ekspresji genu CPR (typ WT) i komórek z nokautem tego genu (typ HRN). Wykazałam, że obie pochodne imidazoakrydonu ulegały przemianom metabolicznym w obecności enzymów badanych frakcji mikrosomalnych, przy czym związek C-1311 był mniej reaktywny niż jego analog metoksyłowy, C-1330. Dla każdego związku obserwowałam powstawanie tych samych produktów niezależnie od typu zastosowanej frakcji mikrosomalnej, choć różnice dotyczyły ich intensywności. Poza tym, badania farmakokinetyczne związku C-1311 wskazały, że był on tylko nieznacznie wolniej usuwany z krwi i moczu myszy HRN, aniżeli myszy WT. Przedstawione wyniki dość silnie potwierdziły więc wcześniejsze przypuszczenie,

że to nie izoenzymy cytochromu P450 wraz z CPR odgrywają kluczową rolę w transformacjach metabolicznych badanych pochodnych imidazoakrydonu oraz wskazały, że funkcje te mogą spełniać inne enzymy obecne w pęcherzykach mikrosomalnych komórek wątroby lub nawet enzymy metabolizujące znajdujące się w komórkach innych organów. Wobec tego, metabolizm w komórkach wątroby wydaje się nie być, jak dotąd sądzono, jedyną drogą przemian metabolicznych tych związków.

Na obrazach chromatograficznych składu otrzymywanych mieszanin reakcyjnych transformacji C-1311 i C-1330 wobec enzymów mikrosomalnych komórek wątroby myszy WT i HRN zaobserwowałam obecność kilku różnorodnych produktów. Jeden z metabolitów zidentyfikowałam jako produkt przyłączenia atomu tlenu epoksydowego w pierścieniu heterocyklicznym (P1_{WT/HRN} i P*1_{WT/HRN}). Strukturę produktu przemian C-1330 otrzymanego tylko w obecności mikrosomów myszy WT zaproponowałam jako pochodną substratu posiadającą grupę hydroksylową w szkielecie imidazoakrydonu (P*2_{WT}). Można przypuszczać, iż powstaje on przy udziale jednego z izoenzymów cytochromu P450 współdziałającego z funkcjonalną CPR. Dla badanych pochodnych imidazoakrydonu zaobserwowałam też, po inkubacji z enzymami obu frakcji mikrosomalnych, produkt deetylacji w łańcuchu bocznym (P0_{WT/HRN} i P*4_{WT/HRN}). W obecności mikrosomów WT, a w niewielkim stopniu również wobec mikrosomów HRN, otrzymywałam kolejny metabolit związku C-1330, a mianowicie produkt demetylacji do grupy hydroksylowej na atomie węgla C8 cząsteczki imidazoakrydonu (P*3_{WT/HRN}). Okazało się więc, że związek ten ulega przemianie metabolicznej do C-1311. W świetle tych wyników można przewidywać, że C-1330 mógłby być podawany pacjentom chorym na nowotwory łagodne piersi i jelita grubego, gdy zachodziłaby potrzeba zastosowania leku o działaniu opóźnionym w czasie, aktywowanego powoli, dłużej pozostającego w formie aktywnej we krwi. Mogłaby to być użyteczna alternatywa dla terapii związkiem C-1311. Pojawienie się nowych metabolitów, których nie obserwowałam podczas przemian związków wobec enzymów szczurzych i ludzkich mikrosomów, bardzo wyraźnie podkreśliło znany z literatury fakt występowania mniejszych i większych różnic w zdolności związków do przemian metabolicznych w obecności białek mikrosomalnych komórek wątroby pochodzących od różnych gatunków ssaków.

Z uwagi na stwierdzenie braku reaktywności C-1311 i C-1330 wobec kilku wybranych rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450, w kolejnym etapie pracy sprawdziłam czy i w jakim stopniu badane związki wpływają na aktywność tych enzymów. Dodatkowo, chciałam też rozstrzygnąć czy obecność grupy metoksylowej, zamiast hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, wpływa na sposób oddziaływania imidazoakrydonów z izoenzymami cytochromu P450. Uzyskane przeze mnie wyniki

wskazały, że:

- Zarówno C-1311, jak i C-1330 zahamowały reakcje katalizowane przez izoenzymy CYP1A2 i CYP3A4, odpowiednio O-deetylację 7-etoksykumaryny oraz 6 β -hydroksylację testosteronu, przy czym inhibicja działania CYP1A2 indukowana przez oba związki była silniejsza niż CYP3A4.
- Obie pochodne imidazoakrydonu nie miały znaczącego wpływu na aktywność izoenzymów CYP2C19 i CYP2D6 uczestniczących w metabolizmie imipraminy.

W ten sposób potwierdziłam słuszność postawionej wstępnie hipotezy o możliwości inhibicji aktywności izoenzymów cytochromu P450 przez badane związki, wykazując jednocześnie istnienie selektywności w tym procesie.

Analiza zależności pomiędzy strukturą chemiczną, a aktywnością biologiczną C-1311 *in vitro*, jak i *in vivo* wykazała, że obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia heterocyklicznego, to warunek konieczny dla aktywności przeciwnowotworowej tego związku [Mazerska i wsp., 1996]. Dotychczasowe badania przemian metabolicznych C-1311 zasygnalizowały też, że obecność tej grupy funkcyjnej w cząsteczce związku jest istotna w przypadku jego aktywacji przez enzymy metabolizujące [Mazerska i wsp., 2001, 2003]. Jednakże, podobieństwo mechanizmu oddziaływania z CYP1A2 i CYP3A4 dwóch pochodnych imidazoakrydonu o różnych podstawnikach w pozycji 8 pierścienia świadczy, że ten element struktury związków nie odgrywa kluczowej roli w ich zdolności do wiązania się z izoenzymami CYP1A2 i CYP3A4, a w konsekwencji do hamowania ich aktywności. Wynika więc stąd, że wymagania strukturalne dla procesu hamowania aktywności enzymów są różne niż dla metabolizmu imidazoakrydonów przez enzymy.

Uwagę zwrócił także fakt, iż obydwa imidazoakrydony nie obniżyły aktywności żadnego enzymu z rodziny CYP2 cytochromu P450, miały zaś wpływ na aktywność izoenzymu CYP1A2, który zwykle metabolizuje związki kancerogenne oraz CYP3A4, izoenzymu uczestniczącego w metabolizmie większości leków, także przeciwnowotworowych (np. irinotekanu, docetakselu). Wyjaśnienie otrzymanych wyników wymagało szerszych badań oddziaływań związków z białkami. Na tym etapie pracy wysunęłam przypuszczenie, że przyczyną inhibicji może być kowalencyjne wiązanie się aktywnej (zmetabolizowanej) formy związku do białka w takim miejscu jego struktury, które jest kluczowe również dla katalizy metabolizmu typowych substratów tych enzymów, 7-etoksykumaryny i testosteronu.

W trzeciej części pracy podjęłam zatem badania zmierzające do przybliżenia prawdopodobnego mechanizmu obserwowanej inhibicji aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez imidazoakrydon C-1311. Na wstępie ustaliłam, iż utrata aktywności obu enzymów zachodziła w sposób nieodwracalny. Informacja ta, wraz z wcześniejszymi obserwacjami, zwróciła moją uwagę na typ inhibicji opartej na mechanizmie działania

cytochromu P450, znanej pod nazwą inhibicji „mechanism-based” (MBI), który został dotychczas poznany dla szeregu leków, w tym dla przeciwnowotworowego leku alkilującego, tiotepy [Richter i wsp., 2005]. Na podstawie doniesień innych autorów [Hutzler i wsp., 2006] mogłam spodziewać się, że za efektywne działanie C-1311 jako inhibitora izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 odpowiedzialna jest nie tyle obecność grupy funkcyjnej w pierścieniu imidzoakrydonu, lecz raczej dietyloaminyloaminowy łańcuch boczny lub heterocykliczny pierścień imidazolowy. Postuluje się, że liczne trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne [Murray i Field, 1992], leki przeciwhistaminowe [Murray i Murray, 2003] oraz antybiotyki makrolidowe [Periti i wsp., 1992], posiadające ugrupowanie dialkiloaminoalkilowe, generują najczęściej reaktywne pochodne nitrozowe, które są przyczyną unieczynnienia funkcji katalitycznej enzymu. Jednak najnowsze doniesienia ukazują, iż hamowanie aktywności cytochromów P450 może nastąpić poprzez utworzenie reaktywnej pochodnej alkilenoaminowej [Barbara i wsp., 2009]. Z kolei związki o charakterze azoli mogą tworzyć kompleks z hemem cytochromu P450 poprzez atom azotu ugrupowania imidazolowego [Itokawa i wsp., 2007].

Funkcję C-1311 jako inhibitora „mechanism-based” izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 zaproponowałam na podstawie następujących obserwacji:

- Stopień inaktywacji obu cytochromów P450 obniżał się proporcjonalnie do wzrastającego stężenia inhibitora i czasu inkubacji enzymu z inhibitorem.
- Spadek aktywności enzymów był silniejszy w obecności ich egzogenego kofaktora, NADPH, w środowisku reakcyjnym, co wskazywało na konieczność wcześniejszej enzymatycznej aktywacji C-1311 dla uzyskania efektu inhibicji.
- Obecność standardowego substratu cytochromu P450 w mieszaninie inhibitora i enzymu częściowo zapobiegała inaktywacji białka – przyjmuje się, że taki efekt spowodowany jest kompetycją cząsteczek substratu z C-1311 o miejsce wiązania w centrum aktywnym enzymu, co wpływa na zmniejszenie liczby cząsteczek reaktywnych metabolitów pośrednich C-1311 zdolnych w następnym etapie do hamowania aktywności izoenzymów cytochromu P450.
- Dodatek glutationu (GSH), tzw. „pułapki” nukleofilowej, do mieszaniny reakcyjnej nie przywrócił aktywności CYP1A2, a w przypadku CYP3A4 po części spowolnił inaktywację enzymu – można wobec tego przypuszczać, że nastąpiła nieodwracalna modyfikacja miejsca aktywnego enzymu przez reaktywny intermediat C-1311.
- Dodatek katalazy do mieszaniny inhibitora i enzymu nie zapobiegał utracie właściwości katalitycznych białek, co wykluczyło udział reaktywnych form tlenu w wywoływaniu efektu inhibicji.

- Katalityczne funkcje izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 nie zostały też przywrócone wobec utleniającego działania żelazicyjanku potasu, $K_3[Fe(CN)_6]$, co stanowiło dodatkową przesłankę za uznaniem C-1311 jako nieodwracalnego, a nie quasi-nieodwracalnego, inhibitora „mechanism-based” obydwu cytochromów P450.

Analiza powyższych wyników, jak również porównanie wartości otrzymanych parametrów inhibicji, współczynnika podziału oraz liczby przemiany, uwidoczniły, że C-1311 jest silniejszym inhibitorem izoenzymu CYP1A2 niż CYP3A4. Pozwala to domniemywać, iż inhibicja aktywności obu enzymów indukowana przez C-1311 zachodzi w nieco odmienny sposób. Różnice mogą polegać na związaniu inhibitora w innym miejscu centrum aktywnego enzymów, jak również wynikać z występowania odmiennych struktur i właściwości centrum aktywnego obu izoenzymów. Charakterystyczną cechą miejsca aktywnego CYP1A2 jest to, iż otwiera się ono bezpośrednio ponad układem czterech pierścieni pirolowych hemu, podczas gdy w przypadku większości cytochromów P450, także 3A4, jeden z nich zostaje osłonięty helisą białka. Miejsce aktywne CYP3A4 jest z kolei bardzo elastyczne i może przyjmować różne konformacje w zależności od wiązanego substratu. Zdolność ta tłumaczyłaby szeroki zakres specyficzności substratowej tego enzymu [Smith i wsp., part 1, 1997; de Groot i Ekins, 2002]. Niewykluczone też, że obok głównego mechanizmu MBI, na powstanie efektu inhibicji mogą wpływać dodatkowe oddziaływania C-1311 z cytochromem P450.

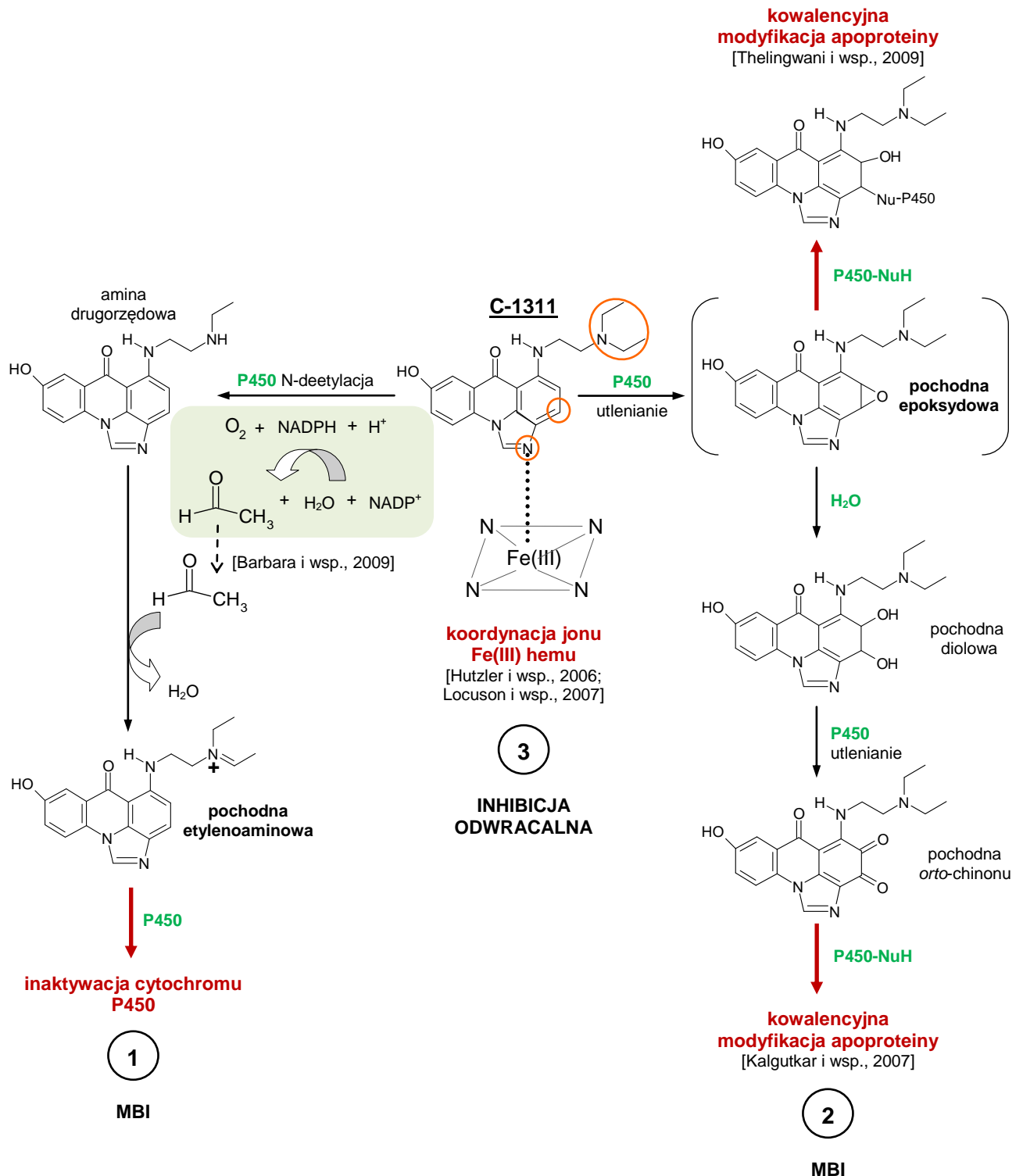
Mając na uwadze fakt wywoływania przez C-1311 inhibicji aktywności rekombinantowych ludzkich izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4, podjęłam także próbę określenia wpływu związku na poziom jednego z tych cytochromów P450 w modelu przybliżającym środowisko fizjologiczne, a więc w komórkach ludzkiego nowotworu. Poziom izoenzymu CYP3A4 we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z komórek HepG2 traktowanych i nie traktowanych (kontrolnych) C-1311 oznaczyłam stosując metodę detekcji białek Western blotting. Interesujące jest, że poziom białka CYP3A4, w odniesieniu do kontroli, praktycznie nie zmienił się dla stężenia C-1311 do 25 μ M, przy 24-godzinnej inkubacji, i niezależnie od czasu inkubacji komórek ze związkiem, przy stężeniu C-1311 odpowiadającym wartości EC_{50} . Natomiast w przypadku wysokich stężeń C-1311 i po 24 godzinach inkubacji synteza białka została wyraźnie zahamowana, co koresponduje z wynikami inhibicji aktywności CYP3A4 uzyskanymi w warunkach modelowych. Powyższe wyniki, dotyczące badań hamowania aktywności CYP3A4 w warunkach *in vitro* i w komórkach nowotworowych sugerują więc, że C-1311 hamuje aktywność cytochromu P450 3A4 oddziałując z jego centrum aktywnym, nie ingeruje zaś, przynajmniej w biologicznie istotnych stężeniach, w proces syntezy tego białka.

Przeprowadzone dotychczas badania nie dały ostatecznej odpowiedzi, co do charakteru reaktywnego metabolitu pośredniego C-1311 oraz miejsca i sposobu jego wiązania się w

cząsteczce białka P450. Wzorując się na wynikach wcześniejszych badań struktur produktów przemian metabolicznych imidzoakrydonów i wskazanych przez MetaSite propozycjach miejsc reaktywnych C-1311, które mogą podlegać transformacji wobec CYP1A2 i CYP3A4, i po starannym przestudiowaniu danych literaturowych dotyczących różnych inhibitorów izoenzymów cytochromu P450, głównie „mechanism-based”, mogę zaproponować trzy możliwe sekwencje zdarzeń prowadzących do unieczynnienia funkcji obydwu enzymów (Rys.107).

(1) Po pierwsze, związki zawierające ugrupowanie dialkiloaminoalkilowe, obecne także w cząsteczce C-1311, bardzo często powodują MBI cytochromów P450. Dla tego typu struktur zaproponowano mechanizm, wg którego pochodna nitrozowa, będąca produktem końcowym następujących po sobie i katalizowanych przez cytochrom P450 reakcji dealkylacji, utleniania i hydrolizy (Rys.18), tworzy koordynacyjny kompleks z jonem Fe(II) grupy prostetycznej enzymu, tzw. MIC. Możliwość rozpadu tego adduktu, poprzez działanie $K_3[Fe(CN)_6]$, wskazuje na charakter quasi-nieodwracalny inhibicji. Wyniki moich badań nie potwierdziły wystąpienia tego efektu, stąd mogę przypuszczać, że w obrębie ugrupowania dietyloaminyloaminowego C-1311 nastąpiły przemiany aktywacyjne prowadzące do reaktywnego metabolitu pośredniego hamującego aktywność białka w sposób najprawdopodobniej nieodwracalny, a zatem nie poprzez tworzenie MIC. W ślad za wynikami badań uzyskanymi dla diltiazemu [Barbara i wsp., 2009], posiadającego ugrupowanie dimetyloaminoetylowe, można spekulować, iż za efekt inhibicji odpowiada być może pochodna etylenoaminy, utworzona na skutek kondensacji cząsteczki aminy drugorzędowej (powstałej z C-1311 na drodze N-deetylacji) z cząsteczką aldehydu (będącego produktem ubocznym katalizowanej przez cytochrom P450 reakcji N-deetylacji). Zaproponowany mechanizm nie został jeszcze dokładnie poznany i nie rozstrzyga w jaki sposób reaktywny intermediat wiąże się z cząsteczką enzymu, ale w mojej opinii jest on bardziej prawdopodobny niż klasyczny mechanizm przebiegający z udziałem pochodnej nitrozowej.

(2) Drugi szlak przemian aktywacyjnych C-1311 w obecności izoenzymów cytochromu P450 może prowadzić do powstania pochodnej epoksydowej. Dalsze przemiany tego metabolitu pośredniego mogą też zachodzić, poprzez pochodną diolową, w kierunku tworzenia *orto*-chinonu. Region epoksydu oraz *orto*-chinon ze względu na właściwości elektrofilowe są podatne na atak nukleofilowych atomów reszt aminokwasowych znajdujących się w centrum aktywnym białek P450. Przyczyną zahamowania aktywności enzymów w tym wypadku jest zatem nieodwracalna kowalencyjna modyfikacja apoproteiny [Kalgutkar i wsp., 2007; Thelingwani i wsp., 2009].



Rys.107. Proponowane mechanizmy oddziaływania C-1311 z CYP1A2 i CYP3A4 (objaśnienia w tekście, opracowanie własne).

(3) Związki o budowie imidazoli mogą również hamować aktywność enzymów z grupy cytochromu P450 w sposób odwracalny. Sugeruje się, że elementem ich struktury, odpowiedzialnym za efekt inhibicji, jest nukleofilowy atom azotu pierścienia imidazolowego (N-2 w cząsteczce C-1311), który wiąże się koordynacyjnie z jonem Fe(III) grupy

prostetycznej enzymu [Itokawa i wsp., 2007]. Tego typu oddziaływanie związku-inhibitora z białkiem wywołuje wyraźne zmiany w widmie UV-vis cytochromu P450, które określa się mianem widma typu II. Wśród leków przeciwgrzybiczych z grupy azoli, które inaktywują funkcje katalityczne izoenzymu CYP3A4 wg opisanego mechanizmu znajdują się, m.in. ketokonazol i klotrimazol (pochodne imidazolu) oraz itrakonazol (pochodna triazolu) [Locuson i wsp., 2007]. Na udział tego typu inhibicji, obok MBI, indukowanej przez C-1311, wskazuje obserwowane, szczególnie w przypadku CYP3A4, częściowe przywrócenie aktywności enzymu w obecności GSH czy katalazy.

Reasumując, otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że istnieje selektywność w inhibicji izoenzymów cytochromu P450 przez badane pochodne imidazoakrydonu. Poza tym wskazały, że hamowanie aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311, przebiegające w różnym stopniu dla obu enzymów, jest procesem nieodwracalnym, który prawdopodobnie zachodzi poprzez mechanizm MBI. Jest to nowy element molekularnego mechanizmu działania pochodnych imidazoakrydonu. Wiedza ta może być pomocna w przewidywaniu wpływu tych potencjalnych chemoterapeutyków na aktywność enzymów metabolizujących również inne leki, co wnosi istotne informacje ułatwiające w przyszłości planowanie terapii wielolekowej z ich udziałem, ograniczając występowanie niepożądanych interakcji lek-lek_{inhibitor danego enzymu}. Należy jednak pamiętać, że oddziaływania te mogą być odmienne w warunkach *in vivo*.

Ostatni etap pracy dotyczył obserwacji przemian metabolicznych C-1311 i C-1330 w jednym z miejsc ich oczekiwanego działania w terapii, czyli w komórkach nowotworowych. W prowadzonych badaniach, jako modele eksperymentalne, posłużyły komórki ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i Hep3A4. Jednym z argumentów przemawiającym za wyborem linii HepG2 był fakt, iż jest ona bogata w liczne enzymy metabolizujące pierwszej (CYP: 1A, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4) i drugiej fazy metabolizmu (UGT, NAT, transferazy S-glutationowej – GST) [Wilkening i Bader, 2003]. Druga linia komórkowa, Hep3A4, charakteryzowała się wyższą niż w innych komórkach nowotworowych ekspresją genu izoenzymu CYP3A4. Odrębnym zagadnieniem, będącym jednak konsekwencją opisanych dotychczas wyników badań, było bowiem określenie wpływu nadprodukcji białka CYP3A4 na cytotoksyczność i metabolizm imidazoakrydonów w komórkach nowotworowych.

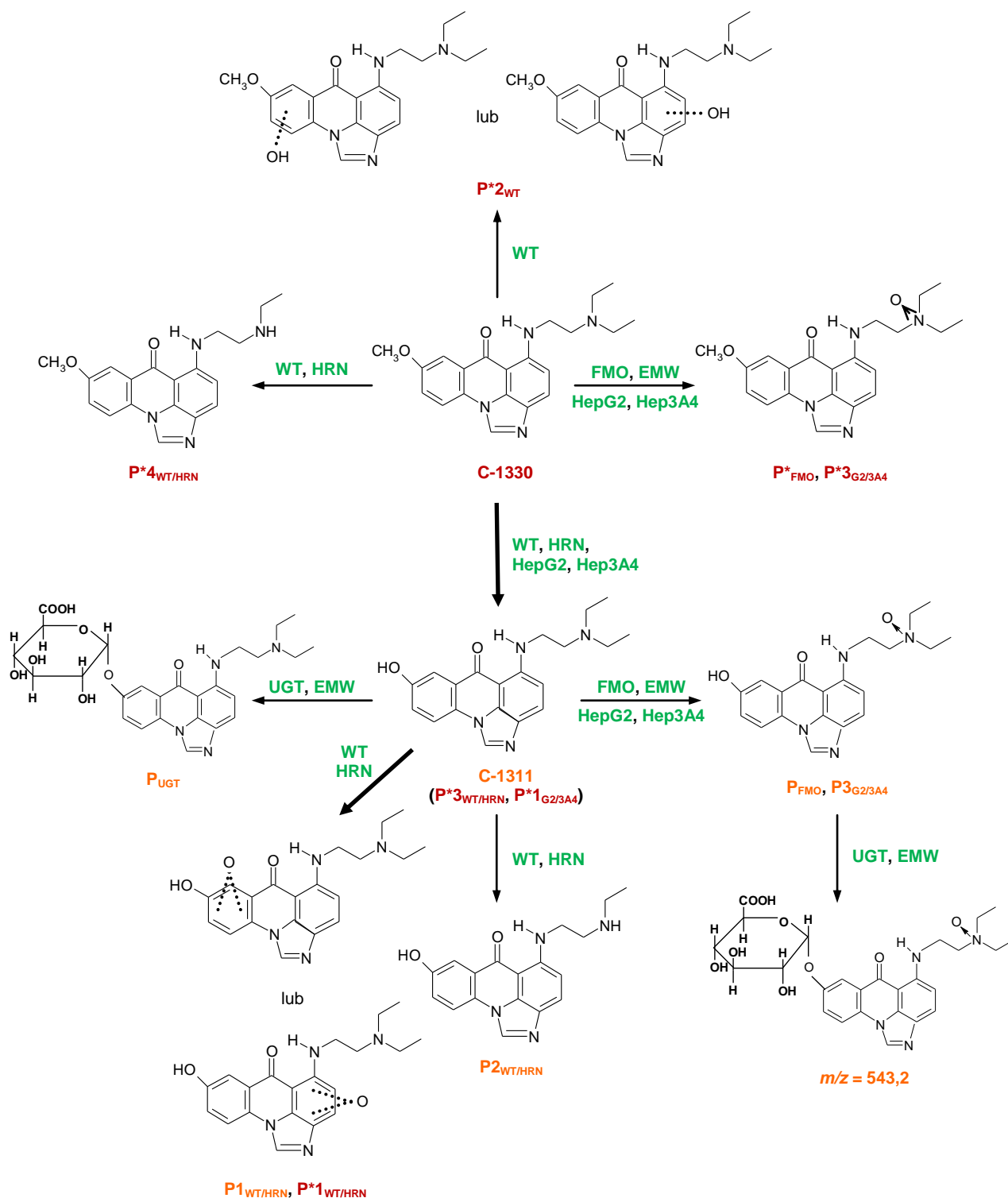
Już na wstępie, ocena cytotoksyczności C-1311 wskazała, iż komórki obu linii charakteryzowały się porównywalną wrażliwością na działanie pochodnej C-1311. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, iż oba badane związki wnikały do komórek nowotworowych i tam ulegały procesowi biotransformacji do szeregu produktów, przy czym C-1311 ulegał przemianom metabolicznym w stopniu zbliżonym dla obu linii komórkowych. Poza tym, wyniki badań biotransformacji pochodnych imidazoakrydonu w komórkach

ludzkiego nowotworu wątroby, różniących się nadekspresją genu izoenzymu CYP3A4, wskazały na brak zaangażowania tego cytochromu w tym procesie. Dodatkowo wykazałam, że nokaut genu NADPH-reduktazy cytochromu P450, przeprowadzony selektywnie tylko w komórkach wątroby, nie zmienił istotnie farmakokinetyki eliminacji C-1311 z organizmu myszy, co świadczy o tym, że cytochromy P450 nie odgrywają kluczowej roli w metabolizmie związku w wątrobie.

Wydaje się, że porównywalna zdolność badanych związków do metabolizmu wobec enzymów zawartych w komórkach nowotworowych HepG2 i Hep3A4, jak również niewielkie różnice cytotoksyczności C-1311 w stosunku do komórek obu linii, mogą być efektem równoczesnego działania kilku czynników. Być może zwiększony poziom CYP3A4, a tym samym reaktywnych metabolitów pośrednich związków, przyczynia się do hamowania aktywności innych enzymów metabolizujących lub białek regulujących cykl życiowy komórki oraz wpływa na indukcję procesów, takich jak apoptoza, katastrofa mitotyczna czy starzenie komórkowe [Augustin i wsp., 2010], co w konsekwencji obniża efekty cytotoksyczne.

Analiza HPLC/ESI-MS ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek inkubowanych C-1311 i C-1330 wykazała, że niektóre z metabolitów obserwowane były już wcześniej podczas przemian związków w innych układach enzymatycznych. Wśród produktów C-1311 potwierdziłam obecność produktu FMO, czyli N-tlenku ($P3_{G2/3A4}$), a w zbiorze metabolitów C-1330 obok N-tlenku ($P^*3_{G2/3A4}$) wyodrębniłam także związek C-1311 ($P^*1_{G2/3A4}$).

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki badań przemian metabolicznych C-1311 i jego analogu 8-metoksyowego, związku C-1330, wobec enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby i w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby pozwoliły na kompleksowe poznanie szlaków biotransformacji jakim te potencjalne chemoterapeutyki mogą ulegać w organizmie pacjenta. Kierunki takich przemian przedstawiłam na Rys.108.



Rys.108. Proponowane struktury chemiczne głównych metabolitów związków C-1311 i C-1330 powstających wobec enzymów metabolizujących w modelowych układach enzymatycznych *in vitro* i w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby.

Objaśnienia zastosowanych symboli:

P_n – produkt metabolizmu C-1311 (n = 1, 2,3...) z odpowiednim indeksem dolnym

P*_n – produkt metabolizmu C-1330 (n = 1,2,3...) z odpowiednim indeksem dolnym

FMO – rekombinantowe ludzkie izoenzymy monooksygenazy flawinowej lub monooksygenaza flawinowa obecna we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura lub człowieka (indeks dolny produktu: FMO)

HepG2 lub **Hep3A4** – enzymy obecne w komórkach nowotworowych HepG2 lub Hep3A4 (indeks dolny produktu: G2 lub 3A4)

EMW – enzymy frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i człowieka

UGT – transferaza glukuronianowa (indeks dolny produktu: UGT)

WT lub **HRN** – enzymy frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT lub HRN (indeks dolny produktu: WT lub HRN)

Podsumowując, wykazałam, że potencjalne leki przeciwnowotworowe z grupy imidazoakrydonów, C-1311 i C-1330, będąc metabolizowanymi w mieszaninie enzymów mikrosomalnych komórek wątroby nie są substratami cytochromów P450, a główny produkt ich transformacji w mikrosomach wynika z udziału FMO. Efekt taki obserwowałam także w komórkach nowotworu wątroby. Ponadto, C-1311 okazał się też substratem, zawartych w mieszaninie białek mikrosomalnych, enzymów z rodziny UGT. Stwierdziłam też, że istnieje selektywność w inhibicji aktywności cytochromów P450 przez C-1311 i C-1330. Ustaliłam, że C-1311 hamował aktywność izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 w sposób nieodwracalny, w znacznym stopniu wg mechanizmu inhibicji „mechanism-based”. Związek ten w wysokich stężeniach obniżał także poziom białka P450 3A4 w komórkach nowotworowych.

Omówione wyniki pociągają za sobą konsekwencje istotne z farmakologicznego punktu widzenia:

- Ze względu na to, że cytochromy P450 występują zazwyczaj w kilku odmianach polimorficznych, brak metabolizmu pochodnych imidazoakrydonu wobec tych enzymów pozwala na lepsze opracowanie odpowiedniej, jednolitej dla pacjentów, dawki leku, ponieważ można pominąć międzysobnicze różnice w sposobie biotransformacji leków, wynikające ze zjawiska polimorfizmu genetycznego.
- Zastosowanie metabolizowanych przez FMO chemoterapeutyków w terapii wielolekowej może przynieść korzyść w wyeliminowaniu występowania niekorzystnych interakcji pomiędzy lekami, gdyż jest to enzym, który rzadko ulega indukcji i inhibicji przez leki.
- C-1330, jako prolek C-1311, może być użyteczny w terapii, gdyby zaistniała potrzeba zastosowania leku o działaniu opóźnionym w czasie, aktywowanego powoli i dłużej pozostającego w formie aktywnej we krwi.
- Stwierdzenie hamowania aktywności izoenzymu CYP3A4, wykazującego największe zaangażowanie w metabolizmie powszechnie stosowanych chemoterapeutyków, przez przeciwnowotworowe pochodne imidazoakrydonu, wnosi istotne informacje ułatwiające w przyszłości planowanie terapii wielolekowej z ich udziałem, ograniczając możliwość występowania niepożądanych interakcji lek-lek.

VII. STRESZCZENIE.

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy była najbardziej aktywna przeciwnowotworowo pochodna należąca do grupy imidazoakrydonów, tj. C-1311, i jej analog 8-metoksyowy, związek C-1330, zsyntetyzowane w zespole Profesora Jerzego Konopy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

Metabolizm, proces złożony z szeregu reakcji enzymatycznych, determinuje właściwości farmakokinetyczne leku, m.in. jego stężenie, formę, rozprzestrzenianie, toksyczność i aktywność w miejscu działania. Poznanie szlaku przemian metabolicznych potencjalnego leku jest więc niezbędne do uzyskania informacji o tym jak przyszli pacjenci, wykazujący międzyosobnicze różnice w sposobie biotransformacji, zareagują na dany lek. Pozwala także przewidzieć wpływ związku na metabolizm innych leków, co ma ogromne znaczenie w terapii wielolekowej. Biorąc pod uwagę istotne znaczenie przedstawionych faktów prezentowana praca stanowi kontynuację badań zmierzających do poznania molekularnych podstaw metabolizmu pochodnych imidazoakrydonu.

Wstępne badania wykazały brak wyraźnej reaktywności C-1311 i C-1330 wobec wybranych rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450, mimo iż pochodne te ulegały przemianom metabolicznym w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura i człowieka. Uzyskane na podstawie literatury informacje pozwoliły sformułować kilka hipotez roboczych interpretujących otrzymany wynik, które zweryfikowałam realizując kolejne zadania badawcze. Celem pracy było, z jednej strony, określenie, które enzymy metabolizujące, poza cytochromami P450, obecne w mieszaninie białek mikrosomalnych komórek wątroby są odpowiedzialne za biotransformację C-1311 i C-1330. Z drugiej strony, badania dążyły do poznania wpływu badanych związków na aktywność wybranych enzymów z rodziny cytochromu P450.

Dla realizacji powyższych celów badawczych stosowałam różne metody i techniki doświadczalne. Poszukując enzymów metabolizujących frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, mogących uczestniczyć w transformacjach C-1311 i C-1330, wybrałam rekombinantowe ludzkie monooksygenazy flawinowe (FMO) oraz transferazy glukuronianowe (UGT). Podatność pochodnych imidazoakrydonu na metabolizm wobec FMO zbadalam także stosując frakcję mikrosomalną hepatocytów, zaś sprzężanie z kwasem glukuronowym analizowałam w tym samym układzie, ale dodatkowo zawierającym UDPGA, substrat obecnych w mikrosomach enzymów UGT. Przeprowadziłam także próbę transformacji metabolicznej C-1311 wobec oksydazy ksantynowej (XO), głównie ze względu na podobieństwo strukturalne standardowego substratu tego enzymu, ksantyny, do

pochodnej imidazoakrydonu. Dla poznania roli NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 (CPR), której obecność jest niezbędna dla prawidłowego działania izoenzymów cytochromu P450, w metabolizmie obu pochodnych imidazoakrydonu przeprowadziłam reakcje C-1311 i C-1330 wobec enzymów frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy o prawidłowym poziomie ekspresji genu CPR (typ WT) i komórek z nokautem tego genu (typ HRN). Frakcje mikrosomalne otrzymałam metodą wirowania różnicowego [Meehan i wsp., 1988]. Następnie dla związku C-1311 przeprowadziłam badania farmakokinetyczne u myszy obu genotypów. Uzupełnieniem badań metabolizmu w warunkach *in vitro* była obserwacja transformacji metabolicznych imidazoakrydonów w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, o niezmienionej i podwyższonej ekspresji genu izoenzymu CYP3A4. Do izolacji powstających w komórkach metabolitów zastosowałam ekstrakcję 60% zimnym metanolem [Wiśniewska, 2008].

Wpływ C-1311 i C-1330 na aktywność wybranych cytochromów P450 określiłam na podstawie obserwacji zmiany stopnia przereagowania typowych substratów enzymów w reakcji z udziałem i bez badanych pochodnych imidazoakrydonu. Stwierdzenie inhibicji aktywności dwóch izoenzymów cytochromu P450 było wskazaniem do przeprowadzenia dodatkowych badań pozwalających na przybliżenie prawdopodobnego mechanizmu obserwowanej inaktywacji enzymów. Uczyniłam to w oparciu o tzw. metodę rozcieńczenia. Efekt inhibicji indukowanej przez C-1311 sprawdziłam także w komórkach nowotworowych stosując technikę immunodetekcji białek Western blotting.

Metoda obserwacji składu mieszanin reakcyjnych opierała się na analizie chromatograficznej, RP-HPLC, z detekcją absorpcyjną UV-vis. W celu określenia struktur chemicznych produktów metabolizmu badanych związków powstających w stosowanych układach enzymatycznych zastosowałam sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (HPLC/ESI-MS lub LC/MALDI-QTOF-MS/MS).

Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że rekombinantowe ludzkie izoenzymy FMO1 i FMO3, ale nie FMO5, okazały się skutecznymi katalizatorami transformacji metabolicznych obydwu badanych związków, z których C-1330 okazał się lepszym niż C-1311 substratem dla tej grupy enzymów. Ponadto, wykazałam, że główny produkt metabolizmu wobec FMO był identyczny jak jeden z metabolitów otrzymanych wobec enzymów mikrosomalnych komórek wątroby, a analiza spektroskopowa wskazała, iż jest to, charakterystyczny dla katalizowanych przez FMO przemian detoksykacyjnych, N-tlenek na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym badanych związków. Badając metabolizm drugiej fazy pochodnych imidazoakrydonu wykazałam, że tylko C-1311 był efektywnie sprzężany z UDPGA do O-glukuronidu, w przeciwieństwie do C-1330, który będąc analogiem metoksylowym C-1311 nie reagował w tych warunkach. Podobne wyniki otrzymałam

stosując rekombinantowy ludzki izoenzym UGT1A1, podczas gdy UGT2B7 nie katalizował przemian żadnego z badanych imidazoakrydonów. Ostatecznie pokazałam, że w następstwie przemian detoksykacyjnych imidazoakrydonu C-1311, katalizowanych przez FMO i UGT, powstały dwie pochodne O-glukuronidu. Badając transformacje metaboliczne C-1311 wobec XO nie zaobserwowałam żadnej istotnej reaktywności związku. Następnie stwierdziłam, iż obie badane pochodne imidazoakrydonu ulegają, choć w różnym stopniu, biotransformacji zarówno wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy WT, jak i HRN. Liczba powstających produktów dla każdego związku była taka sama, niezależnie od zastosowanej frakcji mikrosomalnej, ale występowały one w różnych stężeniach. Wśród nich zidentyfikowałam produkty deetylacji w łańcuchu bocznym oraz posiadające dodatkową grupę hydroksylową (produkt identyczny dla obu związków) lub epoksydowy atom tlenu w układzie heterocyklicznym. Okazało się także, że jeden z metabolitów C-1330, produkt demetylacji do grupy hydroksylowej, to imidazoakrydon C-1311. Badania farmakokinetyczne C-1311 wskazały z kolei, że związek ten był tylko nieznacznie wolniej usuwany z krwi i moczu myszy HRN, niż myszy WT. Badania metabolizmu pochodnych imidazoakrydonu w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i Hep3A4 uwidoczniły, iż oba związki wnikały do komórek nowotworowych, gdzie ulegały biotransformacji do kilku różnorodnych produktów, z których N-tlenki (metabolity C-1311 i C-1330 z FMO) i C-1311 (metabolit C-1330) obserwowane były już wcześniej podczas przemian związków w innych układach enzymatycznych *in vitro*. Komórki obu linii, mimo różnic w ekspresji genu izoenzymu CYP3A4, charakteryzowały się też porównywalną wrażliwością na działanie pochodnej C-1311.

Badając wpływ C-1311 i C-1330 na funkcjonowanie wybranych cytochromów P450 stwierdziłam istnienie selektywności w inhibicji aktywności tych enzymów przez pochodne imidazoakrydonu. Oba związki hamowały bowiem funkcje katalityczne izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4, natomiast ich obecność nie powodowała znaczących zmian w metabolizmie imipraminy, substratu dla dwóch izoenzymów, CYP2C19 i CYP2D6. Ponadto, inhibicja działania CYP1A2 indukowana przez imidazoakrydony była silniejsza niż CYP3A4. Interesujące jest to, że w wysokich stężeniach (po 24 godzinach inkubacji) C-1311 obniżał także poziom białka CYP3A4 w komórkach nowotworowych HepG2. W toku dalszych badań wykazałam, że stopień utraty aktywności katalitycznej obu cytochromów P450 istotnie zależał od stężenia C-1311, jak i czasu preinkubacji C-1311 z enzymem oraz od obecności samego NADPH, kofaktora reakcji enzymatycznej, co sugerowało konieczność wcześniejszej aktywacji imidazoakrydonu dla uzyskania efektu inhibicji. Poza tym, wielokrotne rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej nie przywracało aktywności żadnego z enzymów. Obserwacje te wskazały na indukowanie przez C-1311 inhibicji nieodwracalnej typu „mechanism-based” (MBI) izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4, której obecność

potwierdziłam eksperymentalnie wykazując współistnienie kilku charakterystycznych dla tego procesu zależności.

Podsumowując, wyniki badań, zrealizowanych w ramach prezentowanej pracy, poszerzyły aktualną wiedzę na temat metabolizmu potencjalnych leków przeciwnowotworowych, jakimi są C-1311 i C-1330, który może zachodzić w organizmie pacjenta. Pozwoliły one uchwycić różnice w szlakach przemian metabolicznych dwóch pochodnych imidazoakrydonu, co umożliwia dalsze określenie roli tych przemian w końcowym efekcie ich działania. Uzyskane dane eksperymentalne pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

- ❖ Wbrew wcześniejszemu przeświadczeniu to nie cytochromy P450, a monooksygenazy flawinowe i transferazy glukuronianowe, zawarte we frakcji mikrosomalnej hepatocytów, lub nawet enzymy obecne poza komórkami wątroby (np. w komórkach nerek i jelit), są głównymi katalizatorami transformacji metabolicznych badanych związków.
- ❖ Występowanie inhibicji aktywności izoenzymów CYP1A2 i CYP3A4 przez C-1311 i C-1330 wydaje się być prawdopodobną przyczyną obserwowanej oporności związków na działanie tych dwóch enzymów. Proces ten, zachodzący w różnym stopniu dla obu cytochromów P450, przebiegał nieodwracalnie, w znacznym stopniu wg mechanizmu inhibicji „mechanism-based”. C-1311 w bardzo wysokich stężeniach obniżał również poziom białka P450 3A4 w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2, co wskazuje, że imidazoakrydon inaktywuje enzym oddziałując z jego centrum aktywnym.
- ❖ Postuluje się, że kluczową rolę w indukcji procesu hamowania aktywności enzymów może odgrywać heterocykliczny pierścień imidazolowy lub dietyloaminyloaminowy łańcuch boczny, obecne zarówno w cząsteczce C-1311, jak i C-1330, natomiast wyklucza się udział grupy hydroksylowej w mechanizmie inhibicji. Wynika więc stąd, że inne elementy struktury cząsteczki są istotne dla procesu inaktywacji enzymów, a inne dla aktywności przeciwnowotworowej związków.

W aspekcie farmakologicznym brak metabolizmu C-1311 i C-1330 wobec cytochromów P450, charakteryzujących się dużą zmiennością polimorficzną, stwarza perspektywy dla planowania skutecznej terapii przeciwnowotworowej u pacjentów wykazujących zróżnicowaną ekspresję genów enzymów metabolizujących. Podatność imidazoakrydonów na metabolizm wobec FMO, enzymu nieindukowalnego przez leki, umożliwia z kolei opracowanie terapii wielolekowej z ich udziałem pozbawionej niepożądanych oddziaływań lek-lek. C-1330 może też stanowić użyteczną alternatywę dla terapii związkiem C-1311, gdyż jest jego prolekiem. Z kolei selektywność w hamowaniu aktywności cytochromów P450,

szczególnie izoenzymu CYP3A4, przez pochodne imidazoakrydonu może być pomocna w przewidywaniu wpływu tych potencjalnych chemoterapeutyków na aktywność enzymów metabolizujących również inne leki, co ma istotne znaczenie w terapii wielolekowej, w której istnieje niebezpieczeństwo niekorzystnych wzajemnych interakcji pomiędzy chemoterapeutykami.

VIII. LITERATURA

- **Ashok** BT, Tadi K, Banerjee D, Konopa J, Iatropoulos J, Tiwari RK (2006) Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine derivative (C-1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs. *Life Sci* 79: 1334 – 1342.
- **Auclair** C 1987 Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch Biochem Biophys* 259: 1 – 14.
- **Augustin** E, Konopa J (1996) Imidazoacridinones induce apoptosis in murine leukemia L1210 cells. *Fol Cytochem Cytobiol* 34 (Suppl 2) Abst 56.
- **Augustin** E, Wheatley DN, Lamb J, Konopa J (1996) Imidazoacridinones arrest cell-cycle progression in the G2 phase of L1210 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 38: 39 – 44.
- **Augustin** E, Demusiak M, Koprowska J, Potęga A, Hołownia A, Mazerska Z (2010) Influence of CYP3A4 expression on metabolism and cellular response of antitumor C-1311 in hepatocellular carcinoma cells. Wysłana do *Cell Biol and Toxicol*.
- **Barbara** JE, Buckley DB, Kazmi F, Yerino P, Ogilvie B, Horrigan M, Toren P, Parkinson A (2009) Metabolite inhibitory complex formation by alkylamines may not involve formation of a nitroso metabolite. ISSX Meeting, Baltimore, USA, Poster 195 (www.xenotechllc.com).
- **Berger** B, Marquardt H, Westendorf J (1996) Pharmacological and toxicological aspects of new imidazoacridinone antitumor agents. *Cancer Res* 56: 2094 – 2104.
- **Bertelsen** KM, Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Obach RS, Greenblatt DJ (2003) Apparent Mechanism-based Inhibition of Human CYP2D6 *in Vitro* by Paroxetine: Comparison with Fluoxetine and Quinidine. *Drug Metab Dispos* 31: 289 – 293.
- **Blobaum** AL, Lu Y, Kent UM, Wang S, Hollenberg PF (2004) Formation of novel reversible cytochrome P450 spectral intermediate. Role of threonine 303 in P450 E1 inactivation. *Biochemistry* 43: 11945 – 11952.
- **Blobaum** AL, Harris DL, Hollenberg PF (2005) P450 active site and reversibility: Inactivation of cytochromes P450 2B4 and P450 2B4 T302A by *tert*-butyl acetylenes. *Biochemistry* 44: 3831 – 3844.
- **Blobaum** AL (2006) Mechanism-based inactivation and reversibility: Is there a new trend in the inactivation of cytochrome P450 enzymes? *Drug Metab Dispos* 34: 1 – 6.
- **Bolton** JL, Acay NM, Vukomanovic V (1994) Evidence That 4-Allyl-o-quinones Spontaneously Rearrange to Their More Electrophilic Quinone Methides: Potential Bioactivation Mechanism for the Hepatocarcinogen Safrole. *Chem Res Toxicol* 7: 443 – 450.
- **Bull** S, Catalani P, Garle M, Coecke S, Clothier R (1999) Imipramine for cytochrome P450 activity determination: a multiple species metabolic probe. *Toxicol In Vitro* 13: 537 – 541.
- **Burger** AM, Double J, Konopa J, Bibby MC (1996) Preclinical evaluation of novel imidazoacridinone derivatives with potent activity against experimental colorectal cancer. *Br J Cancer* 74: 1369 – 1374.
- **Bradford** MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248 – 254.
- **Byrns** MC, Predecki DP, Peterson LA (2002) Characterization of Nucleoside Adducts of *cis*-2-Butene-1,4-dial, a Reactive Metabolite of Furan. *Chem Res Toxicol* 15: 373 – 379.

- **Cashman** JR (2004) The implications of polymorphisms in mammalian flavin-containing monooxygenases in drug discovery and development. *Drug Discovery Today* 9: 574-581.
- **Cashman** JR (2005) Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *BBRC* 338: 599 – 604.
- **Chen** LJ, Hecht SS, Peterson LA (1997) Characterization of Amino Acid and Glutathione Adducts of *cis*-2-Butene-1,4-dial, a Reactive Metabolite of Furan. *Chem Res Toxicol* 10: 866 – 874.
- **Chołody** WM, Martelli S, Łukowicz J, Konopa J (1990a) 5-[(Aminoalkyl)amino]imidazo[4,5,1-*de*]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J Med Chem* 33: 49 – 52.
- **Chołody** WM, Martelli S, Konopa J (1990b) 8-Substituted 5-[(aminoalkyl)amino]-6H-*v*-triazolo[4,5,1-*de*]acridin-6-ones as potential antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J Med Chem* 33: 2852 – 2856.
- **Chołody** WM, Martelli S, Konopa J (1992) Chromophore-modified antineoplastic imidazoacridinones. Synthesis and activity against murine leukemias. *J Med Chem* 39: 378 – 382.
- **Chołody** WM, Horowska B, Paradziej-Łukowicz J, Martelli S, Konopa J (1996) Structure-activity relationship for antineoplastic imidazoacridinones: synthesis and antileukemic activity *in vivo*. *J Med Chem* 39: 1028 – 1032.
- **Chrapkowska** A, Piątek E, Wiśniewska A, Konopa J, Mazerska Z (2006) The studies of imidazoacridinone antitumor agent, C-1311, in the field of metabolic transformations with cytochrome P450 isoenzymes. *Acta Bioch Pol* 53 (Suppl 1): 86.
- **Chung** W, Park C, Roh H, Lee W, Cha Y (2000) Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn J Pharmacol* 84: 213 – 220.
- **Cruciani** G, Carosati E, De Boeck B, Ethirajulu K, Mackie C, Howe T, Vianello R (2005) MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. *J Mol Chem* 48: 6970 – 6979.
- **De Groot** MJ, Ekins S (2002) Pharmacophore modeling of cytochromes P450. *Advances Drug Delivery Reviews* 54: 367 – 383.
- **Degtyarenko** KN, Archakov AI (1993) Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett* 332: 1 – 8.
- **Dessertenne** F (1966) La tachycardie ventriculaire a deux foyers opposes variables. *Arch Mal Coeur Vaiss* 59: 263 – 272.
- **Dobrek** Ł, Szcześniak P, Thor P, Orszulak-Michalak D (2008) Aktualne kierunki w poszukiwaniach nowych leków przeciwnowotworowych. *Geriatrics* 2: 37 – 46.
- **Dresser** GK, Spence JD, Bailey IX (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 38: 41 – 57.
- **Duong-Ha** N, Dijols S, Macherey AC, Goldstein JA, Dansette PM, Mansuy D (2001) Ticlopidine as a Selective Mechanism-Based Inhibitor of human cytochrome P450 2C19. *Biochemistry* 40: 12112 – 12122.
- **Enoch** HG, Strittmatter P (1979) Cytochrome *b*₅ reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 254: 8976 – 8981.
- **Eswaramoorthy** S, Bonanzo JB, Burley SK, Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 26: 9832 – 9837.

- **Fisher** MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA (2001) The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 33: 273 – 297.
- **Foroozesh** M, Primrose G, Guo Z, Bell LC, Alworth WL, Guengerich FP (1997) Aryl acetylenes as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450-dependent monooxygenase enzymes. *Chem Res Toxicol* 10: 91 – 102.
- **Franklin** MR (1991) Cytochrome P450 metabolic intermediate complexes from macrolide antibiotics and related compounds. *Methods Enzymol* 206: 559 – 573.
- **Gerber** NC, Sligar SG (1992) Catalytic mechanism of cytochrome P450: evidence for a distal charge relay. *J Am Chem Soc* 114: 8742 – 8743.
- **Gniazdowski** M, Szmigiero L (1995) Nitracrine and its congeners: an overview. *Gen Pharmacol* 26: 473 – 481.
- **Gonzalez** FJ (1992) Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13: 346 – 352.
- **Gotoh** O (1993) Evolution and differentiation of P450 genes. *Cytochrome P450*, 2nd ed 255 – 272.
- **Guengerich** FP (1990) Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P450 IIIA4 by gestodene. *Chem Res Toxicol* 3: 363 – 371.
- **Guengerich** FP (1995) Human cytochrome P450 enzymes in *Cytochrome P450 Structure Mechanism and Biochemistry*, 2nd ed Plenum Press, New York, USA 473 – 535.
- **Guengerich** FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* 8: 101 – 111.
- **Guo** Z, Raeissi S, White RB, Stevens JC (1997) Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 25: 390 – 393.
- **Halpert** JR (1995) Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 29 – 53.
- **He** K, Woolf TF, Hollenberg PF (1999) Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450-3A4 by Mifepristone (RU486). *J Pharmacol Exp Ther* 288: 791 – 797.
- **Henderson** CJ, Otto DME, Carrie D, Magnuson MA, McLaren AW, Rosewell I, Wolf CR (2003) Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 278: 13480 – 13486.
- **Henderson** C J, Pass G J, Wolf C R (2006) The hepatic cytochrome P450 reductase null mouse as a tool to identify a successful candidate entity *Toxicol Lett* 162: 111 – 117
- **Hille** R, Nishino T (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal* 9: 995 – 1003.
- **Hollenberg** PF, Kent UM, Bumpus NN (2008) Mechanism-based inactivation of human cytochromes P450s: experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 21: 189 – 205.
- **Honig** PK, Woosley RI, Zamani K, Conner DP, Cantilena LR (1992) Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clin Pharmacol Ther* 52: 231 – 238.
- **Horecker** BL (1950) Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver. *J Biol Chem* 183: 593 – 605.

- **Hrabowska M**, Mazerska Z, Łukowicz J, Onoszko K, Ledóchowski A (1982) Antitumor activity of 1-nitro-9-aminoacridine derivatives. *Arzneim-Forsch* 32: 1013 – 1016.
- **Hutzler JM**, Steenwyk RC, Smith EB, Walker GS, Wienkers LC (2004) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2D6 by 1-[(2-ethyl-4-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-[4-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]piperazine: kinetic characterization and evidence for apoprotein adduction. *Chem Res Toxicol* 17: 174 – 184.
- **Hutzler JM**, Melton RJ, Rumsey JM, Schnute ME, Locuson CW, Wienkers LC (2006) Inhibition of cytochrome P450 by Pyrimidineimidazole: evidence for complex heme interactions. *Chem Res Tox* 19: 1650 – 1659.
- **Hyży M**, Bożko P, Konopa J, Skąłdanowski A (2005) Antitumor imidazoacridinone C-1311 induces cell death by mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 69: 801 – 809.
- **Itokawa D**, Nishioka T, Fukushima J, Yasuda T, Yamauchi A, Chuman H (2007) Quantitative Structure-Activity Relationship study of binding affinity of azole compounds with CYP2B and CYP3A. *QSAR Comb Sci* 18: 828 – 836.
- **Jacobson PA**, Green K, Birnbaum A, Remmel RP (2002) Cytochrome P450 isoenzymes 3A4 and 2B6 are involved in the *in vitro* human metabolism of thiotepa to tepa. *Cancer Chemother Pharmacol* 49: 461 – 467.
- **Jędrzejczak WW** (2003) Poszukiwanie postępu w chemioterapii nowotworów. *Współczesna Onkologia* 7: 6 – 10.
- **Joosten V**, van Berkel WJH (2007) Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol* 11: 195 – 202.
- **Kalgutkar AS**, Obach RS, Maurer TS (2007) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions. *Current Drug Metabolism* 8: 407 – 447.
- **Kan HE**, Thomas F, Hollenberg W, Hollenberg PF (1999) Mechanism-based inactivation of cytochrome P-450-3A4 by mifepristone (RU486). *J Pharmacol Exp Ther* 288: 791 – 797.
- **Kanamitsu S-I**, Kiyomi I, Green C, Tyson Ch, Shimada N, Sugiyama Y (2000) Prediction of *in vivo* interaction between triazolam and erythromycin based on *in vitro* studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4. *Pharm Res* 17: 419 – 426.
- **Kashuba DM**, Bertino JS (2001) Mechanisms of drug interactions in *Drug Interactions in Infectious Disease, 2ed ed* Humana Press, New York, USA 13 – 39.
- **Kent UM**, Jushchyshyn MI, Hollenberg PF (2001) Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P450 structure and function. *Curr Drug Metab* 2: 215 – 243.
- **Khojasteb-Bakht SC**, Koenigs LL, Peter RM, Trager WF, Nelson SD (1998) (R)-(+)-Menthofuran is a potent mechanism-based inactivator of human liver cytochrome P450 2A6. *Drug Metab Dispos* 26: 701 – 704.
- **Kitada M**, Kitagawa H, Kamataki T (1979) The effects of incorporation into microsomes of purified NADPH-cytochrome c (P-450) reductase on drug oxidations. *Biochem Pharmacol* 28: 2670 – 2673.
- **Knodell RG**, Browne DG, Gwozdz GP, Brian WR, Guengerich FP (1991) Differential inhibition of individual human liver cytochromes P450 by cimetidine. *Gastroenterology* 101: 1680 – 91.
- **Ko JW**, Sukhova N, Thacker D, Chen P, Flockhart DA (1997) Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 25: 853 – 862.

- **Konopa J**, Ledóchowski A, Matuszkiewicz A, Jereczek-Morawska E (1969) *In vitro* studies on the cytotoxic properties of 9-aminoacridine derivatives. *Neoplasma* 16: 171 – 179.
- **Konopa J** (2001) Antitumor acridines with diaminoalkylo pharmacophoric group. *Pure Appl Chem* 73: 1421 – 1428.
- **Krauser JA**, Guengerich FP (2005) Cytochrome P450 3A4-catalysed testosterone 6 β -hydroxylation stereochemistry, kinetic deuterium isotope effects, and rate-limiting steps. *J Biol Chem* 280: 19496 – 19506.
- **Krueger SK**, Vandyke JE, Williams DE (2006) The role of flavin-containing monooxygenase (FMO) in the metabolism of tamoxifen and other tertiary amines. *Drug Metab Rev* 38: 139 – 147.
- **Kunze KL**, Trager WF (1993) Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem Res Toxicol* 6: 649 – 656.
- **Kuśmierczyk H**, Chołody WM, Łukowicz J, Radzikowski C, Konopa J (1994) Experimental antitumor activity and toxicity of selected triazolo- and imidazoacridinones. *Arch Immunol Ther Exper* 42: 415 – 423.
- **Laine K**, Anttila M, Helminen A, Karnani H, Huupponen R (1999) Dose linearity study of selegiline pharmacokinetics after oral administration: Evidence for strong drug interaction with female sex steroids. *Br J Clin Pharmacol* 47: 249 – 254.
- **Lamb J**, Wheatley DN (1996) Cell killing by novel imidazoacridinone antineoplastic agent, C-1311, is inhibited at high concentrations and coincident in dose-differentiated cell cycle perturbation. *Brit J Cancer* 74: 1359 – 1368.
- **Lightning LK**, Jones JP, Friedberg T, Pritchard MP, Shou M, Rushmore TH, Trager WF (2000) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by L-754 394. *Biochemistry* 39: 4276 – 4287.
- **Lin JH**, Lu AYH (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 35: 361 – 390.
- **Lin H-L**, Kent UM, Hollenberg PF (2002) Mechanism-Based Inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 α -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301: 160 – 167.
- **Lown JW** (1993) Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol Therapeutics* 60: 185 – 214.
- **Lang DH**, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R, Itagaki K, Philpot RM, Rettie AE (1998) Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* 56: 1005 – 1012.
- **Locuson CW**, Hutzler JM, Tracy TS (2007) Visible spectra of type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that “incomplete” heme coordination is common. *Drug Metab Dispos* 35: 614 – 622.
- **Ma B**, Prueksaritanont T, Lin JH (2000) Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos* 28: 125 – 130.
- **Maanen MJ**, Smeets JM, Beijnen JH (2000) Chemistry pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (thioTEPA). *Cancer Treat Rev* 26: 257 – 268.
- **Mackenzie PI**, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15: 677 – 685.

- **Mani C**, Kupfer D (1991) Cytochrome P-450-mediated activation and irreversible binding of the antiestrogen tamoxifen to proteins in rat and human liver: possible involvement of flavin-containing monooxygenases in tamoxifen activation. *Cancer Res* 51: 6052 – 6058.
- **Mazerska Z**, Augustin E, Dzięgielewski J, Chołody WM, Konopa J (1996) QSAR of acridines. III. Structure-activity relationship of antitumor imidazoacridinones and intercalation between *in vitro* and *in vivo* tests. *Anticancer Drug Des* 11: 73 – 88.
- **Mazerska Z**, Zamponi S, Marassi R, Martelli S, Konopa J (1997) Electrochemical oxidation of antitumor imidazoacridinone derivatives and the reference 2-hydroxyacridinone. *J Electroanal Chem* 427: 71 – 78.
- **Mazerska Z**, Dzięgielewski J, Konopa J (2001) Enzymatic activation of a new antitumour drug 5-diethylaminoethylamino-8-hydroxyimidazo-acridinine, C-1311, observed after its intercalation into DNA. *Biochem Pharmacol* 61: 685 – 694.
- **Mazerska Z**, Zamponi S, Marassi R, Sowiński P, Konopa J (2002) The products of electro- and photochemical oxidation of 2-hydroxyacridinone, the reference compound of antitumor imidazoacridinone derivatives. *J Electroanal Chem* 521: 144 – 154.
- **Mazerska Z** (2003) Similarity between enzymatic and electrochemical oxidation of 2-hydroxyacridinone, the reference compound of antitumor imidazoacridinones. *Acta Bioch Pol* 50: 515 – 525.
- **Mazerska Z**, Sowiński P, Konopa J (2003) Molecular mechanism of the enzymatic oxidation investigated for imidazoacridinone antitumor drug C-1311. *Biochem Pharmacol* 66: 1727 – 1736.
- **McCarter JD**, Withers SG (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4: 885 – 892.
- **McConnell DJ**, Lin YS, Allen K, Kunze KL, Thummel KE (2004) Differences in the inhibition of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by metabolite-inhibitor complex-forming drugs. *Drug Metab Dispos* 32: 1083 – 1091.
- **McKinnon R**, Evans A (2000) Cytochrome P450. 3. Clinically Significant Drug Interactions. *Aust J Hosp Pharm* 30: 146 – 149.
- **McManus ME**, Stupans I, Burgess W, Koenig JA, de la Hall PM, Birkett DJ (1987) Flavin-containing monooxygenase activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 15: 256 – 261.
- **McMurry TJ**, Groves JT (1986) Cytochrome P-450. *Plenum Press*, New York, USA 1 – 28.
- **Meech R**, Mackenzie PI (1997) Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 907 – 915.
- **Meehan RR**, Stevenson K, Forrester LM, Hastie ND, Buchmann A, Kunz HW, Wolf CR (1988) Regulation of phenobarbital-inducible cytochrome P-450s in rat and mouse liver following dexamethasone administration and hypophysectomy. *Biochem J* 254:789 – 797.
- **Meunier B**, de Visser SP, Shaik S (2004) Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem Rev* 104: 3947 – 3980.
- **Mueller GC**, Miller JA (1948) The metabolism of 4,4-dimethylaminoazobenzene by rat liver homogenates. *J Biol Chem* 176: 535 – 544.
- **Murray M**, Field SL (1992) Inhibition and metabolite complexation of rat hepatic microsomal cytochrome P450 by tricyclic antidepressants. *Biochem Pharmacol* 43: 2065 – 2071.
- **Murray M** (1997) Drug-mediated inactivation of cytochrome P450. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 465 – 470.

- **Murray M, Murray K (2003)** Mechanism-based inhibition of CYP activities in rat liver by fluoxetine and structurally similar alkylamines. *Xenobiotica* 10: 973 – 987.
- **Nadler SG, Strobel HW (1991)** Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 290: 277 – 284.
- **Narayanan R, Tiwari P, Inoa D, Ashok BT (2005)** Comparative analysis of mutagenic potency of 1-nitro-acridine derivatives. *Life Sci* 77: 2312 – 2323.
- **Nebert D, Nelson D (1991)** P450 gene nomenclature based on evolution *Methods Enzymol* 206: 3 – 11.
- **Nelson DR (2009)** The cytochrome P450 homepage. *Human Genomics* 4: 59 – 65.
- **Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT (2006)** Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 80: 565 – 581.
- **Newton DJ, Wang RW, Lu AYH (1995)** Cytochrome P450 inhibitors Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 23: 154 – 158.
- **Notley LM, Crewe KH, Taylor PJ, Lennard MS, Gillam EMJ (2005)** Characterization of the human cytochrome P450 forms involved in the metabolism of tamoxifen to its α -hydroxy and $\alpha,4$ -dihydroxy derivatives. *Chem Res Toxicol* 18: 1611 – 1618.
- **Okita RT, Masters BSS (1998)** The cytochromes P-450. *Biotransformations* 23: 981 – 997.
- **Omiecinski CJ, Remmel RP, Hosagrahara VP (1999)** Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Tox Sci* 48: 151 – 156.
- **Ortiz de Montellano PR, Mathews JM, Langry KC (1984)** Autocatalytic inactivation of cytochrome P450 and chloroperoxidase by 1-aminobenzotriazole and other aryne precursors. *Tetrahedron* 40: 511 – 519.
- **Ortiz de Montellano PR (1985)** Alkenes and alkynes in *Bioactivation of Foreign Compounds* Academic Press, New York, USA 121 – 155.
- **Ortiz de Montellano PR (1991)** Mechanism-based inactivation of cytochrome P450: isolation and characterization N-alkyl heme adducts. *Methods Enzymol* 206: 533 – 540.
- **Ortiz de Montellano PR, Correia M A (1995)** *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, 2nd ed* Plenum Press, New York, USA 305 – 364.
- **Otton SV, Inaba T, Kalow W (1984)** Competitive inhibition of sparteine oxidation in human liver by β -adrenoceptor antagonists and other cardiovascular drugs. *Life Sci* 34: 73 – 80.
- **Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR (2005)** Role of hepatic cytochrome P450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: studies with the hepatic cytochrome P450 reductase null mouse. *Cancer Res* 65: 4211 – 4217.
- **Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A (1992)** Pharmacokinetic drug interactions of macrolides. *Clin Pharmacokinet* 23: 106 – 131.
- **Ping L, Schrag ML, Slaughter DE, Raab CE, Shou M, Rodrigues D (2003)** Mechanism-based inhibition of human liver microsomal cytochrome P450 1A2 by zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor. *Drug Metab Dispos* 31: 1352 – 1360.
- **Polasek TM, Miners JO (2007)** *In vitro* approaches to investigate mechanism-based inactivation of CYP enzymes. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 321 – 329.

- **Radzikowski C** (1976) Ledakrin – a new polish antitumor drug. *Materia Med Polona* 8: 56 – 57.
- **Ram PA, Waxman DJ** (1992) Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 267: 3294 – 301.
- **Rando RR** (1984) Mechanism-based enzymes inactivators. *Pharmacol Rev* 36: 111 – 142.
- **Richter T, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM** (2005) Inhibition of human CYP2B6 by N,N', N''-triethylenethiophosphoramidate is irreversible and mechanism-based. *Biochem Pharmacol* 69: 517 – 524.
- **Richter WJ, Alt KO, Dieterle W, Faigle JW, Kriemler HP, Mory H, Winkler T** (1975) C-glucuronides, a novel type of drug metabolites. *Helv Chim Acta* 58: 2512 – 2517.
- **Riley RJ, Grime K, Weaver R** (2007) Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 51 – 66.
- **Ring BJ, Patterson BE, Mitchell MI, Vandenbranden M, Gillespie J et al** (2005) Effect of Tadalafil on Cytochrome P450 3A4-mediated Clearance: Studies *in Vitro* and *in Vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 77: 63 – 75.
- **Rendic S, Di Carlo FJ** (1997) Human cytochrome P450 enzyme: a status report summarizing their reactions, substrates, induction, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 29: 413 – 580.
- **Schacter BA, Nelson EB, Marver HS, Masters, BS** (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J Biol Chem* 10: 3601 – 3607.
- **Segel IH** (1975) Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. *Wiley-Interscience* Malden MA.
- **Sequeira D, Strobel HW** (1995) High-performance liquid chromatographic method for the analysis of imipramine metabolism *in vitro* by liver and brain microsomes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 673: 251 – 258.
- **Showalter HDH, Johnson JL, Werbel LM, Leopold WR, Jackson RC, Elslager EF** (1984) 5-[(Aminoalkyl)amino]-substituted anthra [1,9-*cd*]pyrazol-6(2H)-ones as novel anticancer agents: synthesis and biological evaluation. *J Med Chem* 27: 253 – 255.
- **Składanowski A, Pilsov SY, Konopa J, Larsen L** (1996) Inhibition of DNA topoisomerase II by imidazoacridinones, new antineoplastic agents with strong activity against solid tumors. *Mol Pharmacol* 49: 772 – 780.
- **Skwarska A, Augustin E, Konopa J** (2007) Sequential induction of mitotic catastrophe followed by apoptosis in human leukemia MOLT4 cells by imidazoacridinone C-1311. *Apoptosis* 12: 2245 – 2257.
- **Smith DA, Ackland MJ, Jones BC** (1997) Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates. Part 1: active sites characteristics. *DDT* 2: 406 – 414.
- **Smith DA, Ackland MJ, Jones BC** (1997) Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P450 substrates. *DDT* 2: 479 – 486.
- **Sridar C, Kent UM, Notley LM, Gillam EMJ, Hollenberg PF** (2002) Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome P450 2B6. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 945 – 952.
- **Stiborova M, Volker MA, Henderson CJ, Wolf CR, Kotrbova V, Moserova M, Hudecek J, Philips DH, Frei E** (2008) Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug

ellipticine: Studies with the hepatic NADPH:Cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 318 – 327.

- **Tadi** K, Chen Y, Ashok BT, Banerjee D, Konopa J, Tiwari RK (2005) Induction of androgen receptor by a novel nitroacridine C-1748: implication for its role as a chemotherapeutic agent in hormone independent prostate cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 46 Abst 5885.
- **Thelingwani** RS, Zvada SP, Dolgos H, Ungell AL, Masimirembwa CM (2009) *In vitro* and *in silico* identification and characterization of thiabendazole as a mechanism-based inhibitor of CYP1A2 and simulation of possible pharmacokinetic drug-drug interactions. *DMD* 37: 1286 – 1294.
- **Wang** Y, Jones DR, Hall SD (2005) Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 33: 664 – 671.
- **Wienkers** LC, Heath TG (2005) Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 825 – 833.
- **Wilkening** S, Bader A (2003) Influence of culture time on the expression of drug-metabolising enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17: 207 – 213.
- **Williams** DA, Lemke TL (2002) in *Foye's Principles of Medical Chemistry, 5th ed* Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 174 – 233.
- **Wiśniewska** A, Chrapkowska A, Kot-Wasik A, Konopa J, Mazerska Z (2007) Metabolic transformations of antitumor imidazoacridinone, C-1311, with microsomal fractions of rat and human liver. *Acta Bioch Pol* 54: 831 – 838.
- **Wiśniewska** A (2008) Rozprawa doktorska pt: Metaboliczna transformacja *in vitro* przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w aspekcie ich działania przeciwnowotworowego i toksyczności ogólnej. Część doświadczalna: 5.7.8.3. 214 – 215.
- **Wrighton** SA, Stevens JC (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 22: 1 – 21.
- **Wu** D, Otton SV, Inaba T, Kalow W, Sellers EM (1997) Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol* 53: 1605 – 1612.
- **Yamazaki** H, Shimada T (1998) Comparative studies of *in vitro* inhibition of cytochrome P450 3A4-dependent testosterone 6-hydroxylation by roxithromycin and its metabolites, troleandomycin, and erythromycin. *Drug Metab Dispos* 26: 1053 – 1057.
- **Yamazaki** H, Tanaka M, Shimada T (1999) Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for coumarin 7-hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation by human liver cytochrome P450 enzymes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 721: 13 – 19.
- **Yan** Z, Caldwell GW (2001) Metabolism profiling and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. *Curr Top Med Chem* 1: 403 – 425.
- **Yano** KJ, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout DC, Johnson EF (2004) The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 205-Å Resolution. *J Biol Chem* 279: 38091 – 38094.
- **Yeo** KR, Yeo WW (2001) Inhibitory effects of verapamil and diltiazem on simvastatin metabolism in human liver microsomes. *Brit J Clin Pharmacol* 51: 461 – 470.
- **Yeung** CK, Adman ET, Rettie AE (2007) Functional characterization of genetic variants of human FMO3 associated with trimethylaminuria. *Arch Biochem Biophys* 464: 251-259.

- **Zaffaroni N**, De Marco C, Villa R, Riboldi S, Double J (2001) Cell growth inhibition G2M cell cycle arrest and apoptosis induced by the imidazoacridinone C-1311 in human tumor cell lines. *Eur J Canc* 37: 1953 – 1962.
- **Zhou S-F**, Xue C, Yu X-Q, Li C, Wang G (2007) Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 29: 687 – 710.
- **Zhou Z-W**, Zhou S-F (2009) Application of mechanism-based CYP inhibition for predicting drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 579 – 605.