

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

**METABOLICZNA TRANSFORMACJA *IN VITRO*  
PRZECIWNOWOTWOROWYCH POCHODNYCH  
9-AMINO-1-NITROAKRYDYNY W ASPEKCIE ICH DZIAŁANIA  
PRZECIWNOWOTWOROWEGO I TOKSYCZNOŚCI OGÓLNEJ**

mgr inż. Anita Wiśniewska

Promotor: dr hab. inż. Zofia Mazerska

Gdańsk 2008

*Pragnę serdecznie podziękować Pani Doktor Zofii Mazerskiej za umożliwienie przeprowadzenia badań naukowych, za wiedzę, którą mi przekazała, okazaną życzliwość oraz troskę, a także za cenne i życzliwe uwagi podczas prowadzenia eksperymentów i redagowania niniejszej pracy.*

*Pani Doktor Ewie Augustin za życzliwe rady i miłą atmosferę pracy Annie Skwarskiej i Magdalenie Ślisz za wspólnie spędzony czas, wiele wspólnych dyskusji oraz duchowe wsparcie przez cały okres prowadzenia badań.*

*Karolinie Jagiełło, Agnieszce Chrapkowskiej i Magdalenie Niemira za pomoc w prowadzeniu eksperymentów.*

*Dorocie Nowak-Ziatyk i Joannie Koprońskiej oraz pozostałym koleżankom z zespołu za życzliwość i miłą atmosferę pracy.*

*Moim Kochanym Rodzicom za miłość i podtrzymywanie wiary w osiągnięcie zamierzonego celu.*

*Mojemu Kochanemu mężowi, Mariuszowi oraz córeczce Magdalenie za miłość, cierpliwość i zrozumienie.*

## SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP .....	1
2.	ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	4
3.	CZĘŚĆ TEORETYCZNA .....	6
3.1	Ogólne informacje o cytochromie P450.....	6
3.2	Struktura enzymów cytochromu P450.....	8
3.3	Mechanizm działania enzymów cytochromu P450.....	10
3.4	Funkcje fizjologiczne izoenzymów cytochromu P450.....	13
3.5	Typy reakcji katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 .....	18
3.5.1	Reakcje monooksygenacji.....	18
3.5.2	Reakcje izoenzymów cytochromu P450 różne od monooksygenacji .....	24
3.5.3	Nietypowe reakcje izoenzymów cytochromu P450 .....	31
3.6	Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie ksenobiotyków .....	36
3.6.1	Polimorfizm enzymów i jego znaczenie w terapii .....	44
3.6.2	Indukcja izoenzymów cytochromu P450 .....	47
3.7	Reduktaza cytochromu P450 (CPR) .....	48
3.7.1	Ogólne informacje o CPR.....	48
3.7.2	Struktura reduktazy cytochromu P450 .....	50
3.7.3	Kompleks reduktazy cytochromu P450 z kofaktorami i z NADPH.....	50
3.7.4	Zmiany w strukturze CPR w czasie procesu katalizy .....	51
3.7.5	Mechanizm redukcji katalizowany przez CPR.....	53
3.7.6	Kompleks cytochromu P450 z reduktazą cytochromu P450 .....	56
3.7.7	Wybrane reakcje reduktazy cytochromu P450 .....	59
3.8	Nowa hipoteza na temat cyklu katalizycznego izoenzymów cytochromu P450 .	62
3.9	Podsumowanie .....	63
4.	OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	65
4.1	Metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych .....	65
4.1.1	Przemiany związku C-857 (Capridine $\alpha$ ).....	65
4.1.2	Przebieg przemian związku C-1748 (Capridine $\beta$ ) .....	69
4.1.3	Przebieg reakcji Ledakrinu wobec frakcji enzymów mikrosomalnych indukowanych w wątrobie szczurów.....	72
4.2	Badanie produktów przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w modelowym układzie redukcji chemicznej w obecności ditionitroitu (DTT) .....	77
4.2.1	Określenie struktur wybranych produktów związku C-857 z DTT .....	78
4.2.2	Analiza HPLC z detekcją widm UV-VIS i ESI-MS dla pozostałych produktów .....	92
4.2.3	Barwny produkt redukcji związku C-857.....	103
4.2.4	Produkty reakcji związku C-1748 .....	105
4.3	Identyfikacja produktów metabolizmu pochodnych C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów .....	120
4.3.1	Metabolity związku C-857.....	120
4.3.2	Metabolity związku C-1748.....	126
4.4	Badanie przemian metabolicznych związków C-857 i C-1748 obserwowanych pod wpływem różnych enzymów mikrosomalnych wątroby człowieka .....	130
4.4.1	C-857 wobec enzymów mikrosomalnych .....	130
4.4.2	C-857 wobec reduktazy cytochromu P450, CPR .....	132

4.4.2.1	Przemiany metaboliczne wobec CPR .....	133
4.4.2.2	Reduktaza cytochromu P450, a enzymy mikrosomalne w metabolizmie pochodnej C-857 .....	135
4.4.3	Biotransformacja związku C-857 wobec rekombinantowych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 .....	137
4.4.4	Przemiany związku C-1748 (Capridine $\beta$ ) wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych.....	142
4.4.5	C-1748 wobec reduktazy cytochromu P450 (CPR).....	143
4.4.5.1	Przemiany metaboliczne związku C-1748 wobec CPR.....	144
4.4.5.2	Reduktaza cytochromu P450, a enzymy mikrosomalne w metabolizmie pochodnej C-1748 .....	145
4.4.6	Związek C-1748 (Capridine $\beta$ ) wobec wybranych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4.....	147
4.4.7	Biotransformacja pochodnych 1-nitroakrydyny wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych z zastosowaniem tzw. Reaction Phenotyping Kit, RPK...	149
4.4.7.1	Badanie przemian związku C-857 i C-1748 wobec RPK.....	150
4.5	Biotransformacja związków C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyzolowanych z wątroby myszy o obniżonym poziomie ekspresji genu NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 .....	157
4.5.1	Transformacja C-857.....	157
4.5.2	Transformacja C-1748.....	159
4.5.2.1	Eliminacja związku C-1748 z organizmu myszy o normalnym, WT i obniżonym poziomie reduktazy P450 .....	161
4.6	Wpływ struktury chemicznej 1-nitroakrydyn na przemiany metaboliczne w wybranych układach enzymatycznych.....	162
4.6.1	Biotransformacja Ledakrinu w obecności izoenzymów cytochromu P450 z różnym poziomem koekspresji reduktazy cytochromu P450.....	163
4.6.2	Przemiany metaboliczne Ledakrinu w obecności mysich enzymów mikrosomalnych o normalnej, WT i obniżonej, HRN, ekspresji genu NADPH – reduktazy cytochromu P450. ....	166
4.6.3	Metabolizm związku C-450 w obecności ludzkich rekombinantowych izoenzymów CYP1A2, 2C19 i CYP3A4.....	167
4.6.4	Przemiany metaboliczne związku C-450 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN .....	170
4.6.5	Podsumowanie. Rola struktury łańcucha bocznego.....	171
4.6.6	Podsumowanie. Rola grupy metylowej.....	175
4.7	Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2.....	180
4.7.1	Badania wstępne – cytotoksyczność i opracowanie metody otrzymywania i izolacji metabolitów.....	180
4.7.2	Przemiany metaboliczne Ledakrinu.....	183
4.7.3	Metabolizm związku C-857 ( Capridine $\alpha$ ).....	185
4.7.4	Przemiany związku C-1748 ( Capridine $\beta$ ) .....	187
4.7.5	Obserwacje metabolitów pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny powstałych w komórkach HepG2, przy wykorzystaniu techniki mikroskopii.....	189
5.	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	194
5.1	Badane związki.....	194
5.2	Odczynniki chemiczne i kofaktory .....	195
5.3	Enzymy.....	195
5.4	Komórki ludzkiej linii nowotworu wątroby hepatoma, HepG2.....	196
5.5	Roztwory buforowe.....	197

5.6	Aparatura.....	198
5.7	Procedury .....	199
5.7.1	Metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów o różnej ekspresji izoenzymów cytochromu P450.....	199
5.7.2	Redukcja chemiczna związków C-857 i C-1748 w obecności ditionitritolu, DTT.....	201
5.7.2.1	Analiza chromatograficzna w skali analitycznej.....	201
5.7.2.2	Analiza chromatograficzna półpreparatywna i izolacja głównych produktów redukcji związków C-857. i C-1748 .....	202
5.7.2.3	Barwny produkt przemian związku C-857 .....	204
5.7.3	Przemiany pochodnych 1-nitroakrydyny wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych.....	205
5.7.4	Przemiany metaboliczne wobec CPR .....	207
5.7.4.1	Analiza spektrofotometryczna .....	207
5.7.4.2	Analiza chromatograficzna .....	207
5.7.5	Biotransformacja Ledakrinu i związków C-857, C-1748 oraz C-450 wobec wybranych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 .....	209
5.7.6	Biotransformacja związków C-857 i C-1748 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych z zastosowaniem tzw. Reaction Phenotyping Kit, RPK... ..	210
5.7.7	Przemiany pochodnych 1-nitroakrydyny wobec mysich enzymów mikrosomalnych z prawidłowym WT i obniżonym, HRN poziomem ekspresji genu NADPH-reduktazy cytochromu P450 .....	210
5.7.7.1	Izolacja frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy.....	210
5.7.7.2	Oznaczanie stężenia białka w enzymach mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy. ....	211
5.7.7.3	Inkubacja enzymów ze związkami C-857, C-1748, C-450 oraz z Ledakrinem .....	212
5.7.8	Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, hepatoma, HepG2.....	213
5.7.8.1	Hodowla komórek HepG2 .....	213
5.7.8.2	Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec komórek nowotworowych HepG2 metodą MTT .....	213
5.7.8.3	Izolacja metabolitów z komórek HepG2 traktowanych Ledakrinem, związkiem C-857 i C-1748.....	214
5.7.8.4	Obserwacje komórek HepG2 traktowanych pochodnymi 1-nitroakrydyny przy zastosowaniu techniki mikroskopii .....	216
6.	DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI.....	218
7.	STRESZCZENIE .....	229
8.	LITERATURA.....	235

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

C	stężenie powstających produktów przemian metabolicznych
C <sub>L</sub>	produkt metabolizmu Ledakrinu wobec CYPs (n = 1, 2...)
C <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
C <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu C-1748 wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
C <sub>L</sub>	produkt metabolizmu Ledakrinu wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
C <sub>L</sub> '	produkt metabolizmu Ledakrinu wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
CPR	NADPH zależna reduktaza cytochromu P450
<i>cpr</i>	gen kodujący NADPH-reduktazę cytochromu P450
CYP H i L	izoenzymy cytochromu P450 z wysokim i niskim poziomem koekspresji NADPH-reduktazy cytochromu P450
DMSO	dimetylosulfotlenek
D <sub>n</sub>	produkt reakcji C-857 z ditionitrolem (n = 1, 2...)
D <sub>n</sub> '	produkt reakcji C-1748 z ditionitrolem (n = 1, 2...)
DTT	ditionitrol
E	enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby szczurów, którym podano leki podwyższające ekspresję z wybranych grup izoenzymów cytochromu P450
EC	numer enzymu przypisany przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemicznej i Biologii Molekularnej
EC <sub>50</sub>	stężenie związku przy którym proliferacja komórek nowotworowych została zahamowana w 50%
ESI-MS	„Electrospray Ionization Mass Spectrometry” – technika spektrometrii masowej z jonizacją próbki
FMO	monooksygenazy flawinoadeninowe
GST	S-transferazy glutationowe
HR-MS	„High Resolution Mass Spectrometry”-spektrometria mas wysokiej rozdzielczości
HRN	frakcja mikrosomalna wyizolowana z komórek wątroby myszy z nokautem genu kodującego NADPH-reduktazę cytochromu P450
K <sub>n</sub> '	produkty metabolizmu C-1748 powstające w komórkach HepG2
MS	„Mass Spectrometry” - spektrometria masowa
M <sub>L</sub>	frakcja ludzkich enzymów mikrosomalnych

M <sub>m</sub>	enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby myszy
M <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych (n = 1, 2...)
M <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu C-1748 w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych (n = 1, 2...)
M <sub>S</sub>	enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby szczura
MS/MS	tandemowa spektrometria masowa
MTT	barwnik stosowany do oznaczenia aktywności cytotoksycznej związków w komórkach.
N <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
N <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
N <sub>L</sub>	produkt metabolizmu Ledakrinu wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
N <sub>L</sub> '	produkt metabolizmu C-450 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
NAT	N-acetylotransferaza
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance” - Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego
L <sub>n</sub>	Produkt metabolizmu Ledakrinu wobec enzymów mikrosomalnych z podwyższonym poziomem ekspresji wybranych izoenzymów cytochromu P450
P <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura (n = 1, 2...)
P <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura (n = 1, 2...)
Pa <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów, którym podano związki podnoszące poziom izoenzymów z wybranych rodzin enzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
Pa <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów, którym podano związki podwyższające poziom izoenzymów z wybranych rodzin enzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
ppm	jednostka stężenia – jedna część na 100000.0
R <sub>n</sub>	produkt metabolizmu C-857 w obecności reduktazy cytochromu P450 (n = 1, 2...)

$R_n'$	produkt reakcji C-1748 w obecności reduktazy cytochromu P450 ( $n = 1, 2...$ )
RPK	„Reaction Phenotyping Kit” - zbiór próbek enzymów mikrosomalnych wątroby pobranych od różnych pacjentów
$RP_n$	produkt biotransformacji C-857 wobec RPK ( $n = 1, 2...$ )
$RP_n'$	produkt biotransformacji C-1748 wobec RPK ( $n = 1, 2...$ )
S	substrat
$S_s$	Stopień przereagowania substratu
UGT	UDP-gluronylotransferaza
WT	frakcja mikrosomalna wyizolowana z komórek wątroby myszy typu dzikiego



## 1. WSTĘP

Nowotwory stanowią obecnie jedną z najgroźniejszych chorób nękających ludzkość. Liczba zachorowań stale rośnie, a jest to głównie spowodowane zmianami cywilizacyjnymi środowiska oraz wydłużeniem średniego wieku życia ludzi. Według danych National Cancer Institute, Bethesda, USA, z roku 2007 [1], liczba chorych w tym kraju przekroczyła już 1,5 miliona, z czego jedna trzecia przypadków rocznie kończy się śmiercią. Dlatego wciąż trwają badania w dziedzinie terapii nowotworów, mające na celu przede wszystkim opracowanie skuteczniejszych metod profilaktyki, diagnozowania, ale przede wszystkim leczenia tych chorób.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, w zespole kierowanym przez prof. Jerzego Konopę od wielu lat trwają poszukiwania nowych związków przeciwnowotworowych, a także kontynuowane są badania nad znanymi już związkami o właściwościach przeciwnowotworowych.

Jedną z interesujących grup związków przeciwnowotworowych są zsyntetyzowane w naszym zespole, pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, które wykazywały wysoką aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową. Czołowym przedstawicielem tej grupy związków, który znalazł kliniczne zastosowanie w terapii nowotworów był pierwszy oryginalny polski lek przeciwnowotworowy – Ledakrin, Nitracrine<sup>R</sup> [2-10]. Wysoka toksyczność tego leku po kilku latach wykluczyła go jednak z listy dopuszczalnych preparatów leczniczych. Obiecującą pochodną 1-nitroakrydyny był związek o symbolu C-857, różniący się od Ledakrinu strukturą łańcucha bocznego, który wykazywał lepsze właściwości farmakologiczne, ale nie został poddany badaniom klinicznym [11]. Poszukiwania nowych, mniej toksycznych analogów 1-nitroakrydyny doprowadziły do wyłonienia nowej generacji pochodnych – związków z dodatkowym podstawnikiem w pierścieniu akrydyny, grupą metylową w pozycji 4 [12]. Jeden z nich, związek C-1748, wykazał wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do kilku ksenoprzeszczepów ludzkich raków prostaty u bezgrasiczych myszy: LnCAP, JCA, PC-3, TSU oraz ludzkiego raka jelita grubego HCT-8 [12,14]. Badania przedkliniczne związku C-1748 dowiodły, że jest on aktywny nie tylko w stosunku do raka gruczołu prostaty, który według najnowszych danych stanowi drugą po nowotworze płuc przyczynę zgonów mężczyzn w USA [1], ale także wobec: komórek białaczki, raka płuc, jajnika, nerki, jelita grubego oraz komórek czerniaka [15]. Aktywność przeciwnowotworowa wobec ciągle trudnych w terapii wymienionych powyżej nowotworów litych, niższa aktywność mielosupresyjna w porównaniu z innymi stosowanymi chemoterapeutykami przeciwnowotworowymi oraz słabsze działanie mutagenne [15-18], pozwoliły wyselekcjonować związek C-1748 ( Capridine  $\beta$  ) do I fazy badań klinicznych. Istotną

cechą tego związku jest wykazana znacznie obniżona w stosunku do Ledakrinu i C-857 toksyczność ogólna na zwierzętach [15].

Badania nad mechanizmem działania pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny pozwoliły m.in. sformułować hipotezę, iż ulegają one w organizmie metabolicznej aktywacji [5-7]. Aktywacja ta prowadzi do powstania analogów o silniejszym działaniu biologicznym, które następnie zdolne są do bezpośredniej reakcji z biomolekułami np. z DNA, przy czym przebieg tego ostatniego etapu jest odpowiedzialny za końcowy efekt biologiczny. Oddziaływanie pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny z DNA w warunkach redukcyjnych, enzymatycznych i chemicznych prowadzi do kowalencyjnego wiązania się tych związków do DNA. Obserwuje się również międzylańcuchowe wiązanie sieciujące DNA [7]. Wobec powyższego stanu wiedzy o aktywności biologicznej i biochemicznym mechanizmie działania pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz udziału w tym mechanizmie procesów metabolicznej aktywacji, przedmiotem niniejszej pracy są badania przemian metabolicznych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w różnych układach modelowych.

Badanie metabolicznej aktywacji potencjalnych leków, a w szczególności związków przeciwnowotworowych, zmierzają do poznania chemicznych i biochemicznych szlaków przemian tych związków oraz do określenia chemicznych struktur powstających metabolitów, które mogą powstawać w organizmie człowieka. Jednak realizacja takiego celu w skomplikowanym układzie biologicznym wymaga wstępnych badań modelowych ponieważ:

- a) produkty aktywacji metabolicznej czyli tzw. reakcji metabolicznych I fazy odpowiedzialne za mechanizm działania leku są zwykle bardzo reaktywne, a ilości ich nie pozwalają na przeprowadzenie pełnych badań strukturalnych
- b) wyizolowanie trwałych produktów detoksykacji ksenobiotyków powstających w wyniku reakcji II fazy metabolizmu, które są pochodnymi kwasów glukuronowych czy konjugatami z glutationem, pozwala na wysunięcie jedynie pośrednich wniosków o strukturach reaktywnych metabolitów.

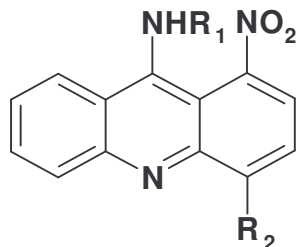
Wobec tego, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, badania nad przemianami metabolicznymi leków prowadzi się w kilku etapach począwszy od prostych układów modelowych do skomplikowanych układów w organizmie człowieka [19,20]. Przemiany metaboliczne bada się :

1. w obecności wyizolowanych specyficznych enzymów
2. w obecności różnych czynników chemicznych
3. z zastosowaniem wyizolowanych frakcji enzymów komórek wątroby
4. w komórkach hodowanych *in vitro*, np. hepatocytach czy komórkach nowotworowych
5. w organizmie zwierząt i człowieka

Wyniki badań chemicznych i strukturalnych otrzymane w pierwszych dwóch etapach 1 i 2 pozwalają zgromadzić wstępną wiedzę na temat przemian metabolicznych zachodzących w bardziej skomplikowanych układach określonych w punktach 3, 4 i 5. Z kolei badania wobec frakcji enzymatycznych komórek wątroby i bezpośrednio w komórkach wskazują, które produkty metabolizmu badanych związków są ważne dla ich działania i dla których należy określić strukturę chemiczną. Wówczas pełną strukturę chemiczną powstających metabolitów określa się po ich wyizolowaniu z układów modelowych, pkt. 1 i 2.

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Dotychczas przeprowadzono badania molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych Ledakrinu.



$R_1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2$	$R_2 = H$	<b>Ledakrin</b>
$R_1 = (CH_2)_2OH$	$R_2 = H$	<b>C-857</b>
$R_1 = (CH_2)_2OH$	$R_2 = CH_3$	<b>C1748</b>

Rys. 1. Struktury pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

Wyzolowano głównie produkty przemian powstające z udziałem czynnika chemicznego ditiotretolu, DTT i porównano z metabolitami otrzymanymi w obecności enzymów mikrosomalnych. Uzyskane wyniki wyjaśniły, że metabolizm Ledakrinu przebiega w sposób nietypowy, jak dla aromatycznych nitrozwiązków. W wyniku redukcji Ledakrinu następuje nie tylko redukcja grupy nitrowej w pozycji 1, ale także aktywacja pierścienia akrydyny, o czym świadczą produkty z dodatkowym pierścieniem pięciocłonowym oraz produkty nukleofilowego podstawienia w pierścieniu akrydyny [21,22]. Można przypuszczać, że wyjątkowy szlak redukcyjnych przemian enzymatycznych i chemicznych Ledakrinu oraz jego wysoka reaktywność podczas tych przemian mogą być przyczyną wysokiej toksyczności tego leku. Synteza nowej generacji pochodnych 1-nitroakrydyny, z grupą metylową podstawioną w pozycji 4 pierścienia, w tym związku C-1748, który w badaniach na zwierzętach okazał się znacznie mniej toksyczny niż Ledakrin i związek C-857, skłoniła do kontynuowania badań nad metabolizmem tej grupy aktywnych przeciwnowotworowo związków. Powstało pytanie: Jaka jest rola grupy metylowej w mechanizmie aktywności biologicznej pochodnych 9-amino-1-nitro-4-metyloakrydyn? Co jest przyczyną obniżonej toksyczności związku C-1748 w porównaniu z C-857? Można postawić hipotezę, że grupa metylowa w pozycji 4 pierścienia akrydyny zmienia istotnie reaktywność pochodnych 1-nitro w przemianach metabolicznej aktywacji, co może decydować o obniżonej toksyczności ogólnej pochodnej C-1748.

Celem niniejszej pracy jest weryfikacja powyższej hipotezy poprzez zbadanie mechanizmu przemian metabolicznych związku C-1748 o obniżonej toksyczności

i jego bezpośredniego analogu bez grupy metylowej - pochodnej C-857. Realizacja tego celu wymagała porównania przebiegu przemian metabolicznych związków C-1748 i C-857 zachodzących w różnych enzymatycznych i nieenzymatycznych układach modelowych oraz w komórkach nowotworowych.

W metabolizmie wielu leków i ksenobiotyków biorą udział enzymy mikrosomalne, a w szczególności izoenzymy cytochromu P450. Poziom tych izoenzymów jest nie tylko cechą indywidualną każdego człowieka, ale także różni się w komórkach zdrowych i nowotworowych, co istotnie wpływa na skuteczność stosowanych terapii medycznych. Dlatego kolejnym celem niniejszej pracy było określenie, które izoenzymy cytochromu P450 odpowiedzialne są za metabolizm związków C-857 i C-1748, co było elementem poszukiwania selektywności działania tych białek wobec obu badanych związków.

Z białkami cytochromu P450 ściśle współpracuje reduktaza cytochromu P450, która jest składnikiem kompleksu cytochromu P450 i bierze udział w transporcie elektronów w procesach utleniania i redukcji katalizowanych przez ten enzym. Ścisła współpraca tych białek w procesach metabolizowania leków utrudnia poznanie roli każdego z tych enzymów. Dlatego z jednej strony zbadano reakcje metabolizmu wobec wyizolowanej i rekombinantowej reduktazy cytochromu P450, z drugiej zaś wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy, pozbawionych genu reduktazy cytochromu P450. W ostatnim etapie badań podjęłam próbę obserwacji metabolizmu obu związków zachodzącego bezpośrednio w komórkach nowotworu wątroby HepG2.

Zaplanowane badania pozwolą określić wpływ grupy metylowej w pozycji 4, na metabolizm związku C-1748, a więc pozwolą zweryfikować postawioną powyżej hipotezę o roli metabolicznej aktywacji w procesach odpowiedzialnych za toksyczność tego związku. Dodatkowo, otrzymane wyniki mogą w przyszłości ułatwić planowanie terapii tym potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym u pacjentów o różnej ekspresji poszczególnych izoenzymów cytochromu P450. Poza tym poznanie molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych nowej generacji pochodnych 1-nitroakrydyn będzie miało znaczenie poznawcze ukierunkowując planowanie dalszych korzystnych modyfikacji struktury chemicznej dla otrzymania nowych generacji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny o lepszych właściwościach farmakologicznych.

### 3. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

#### 3.1 Ogólne informacje o cytochromie P450

Pod nazwą cytochrom P450 kryje się liczna i wszechstronnie działająca rodzina podobnych do siebie enzymów wykazujących aktywność monooksygenazy. Enzymy cytochromu P450 zostały odkryte w 1958 roku [23], chociaż o istnieniu „nieznanego barwnika” wiążącego tlenek węgla donoszono już znacznie wcześniej [24]. Od tego czasu wiedza na temat białek cytochromu P450 nieustannie się rozrasta. Wiele ośrodków naukowych na całym świecie prowadzi systematyczne badania nad poznaniem właściwości i roli izoenzymów cytochromu P450 w organizmach żywych, dostarczając każdego roku cennych informacji. Licząca zatem ok. 50 lat historia izoenzymów cytochromu P450 jest bardzo bogata i cały czas się rozwija.

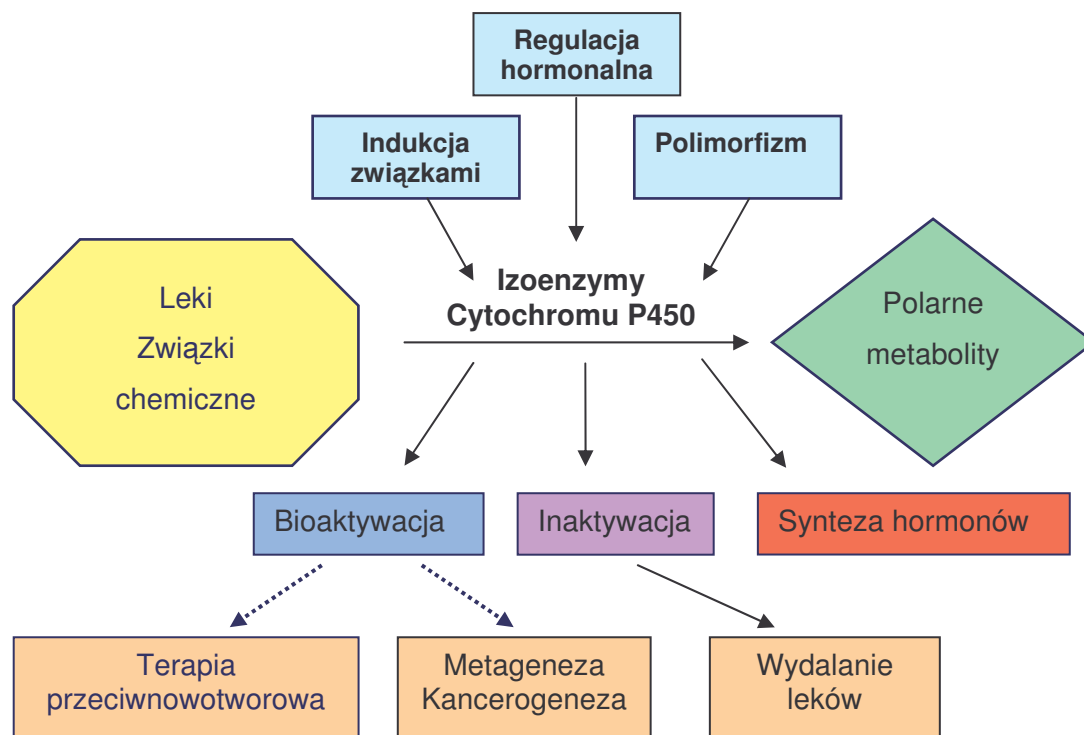
Izoenzymy Cytochromu P450 zawdzięczają swoją nazwę zdolności pochłaniania światła przy długości fali ok. 450 nm. Początkowo opisywano te białka jako pigment, który w kompleksie z tlenkiem węgla wykazywał maksimum absorpcji przy ok. 450 nm [23,25].

Do lat 70-tych znano tylko 6 izoenzymów cytochromu P450, dopiero ok. roku 1980, kiedy wyizolowano cDNA cytochromu P450 wykazano, że jest to liczna i zróżnicowana grupa białek spełniających różne funkcje w komórkach. [25,26]. Poszczególne formy cytochromu P450 różnią się maksimum absorpcji między 446 a 452 nm [27].

Izoenzymy cytochromu P450 należą do białek hemowych, szeroko rozpowszechnionych we wszystkich organizmach żywych począwszy od bakterii, przez drożdże, grzyby, rośliny, zwierzęta do ludzi [19,28,29]. Występują one we wszystkich typach komórek ssaków, za wyjątkiem dojrzałych czerwonych ciałek krwi i komórek mięśni szkieletowych [27]. Szczególnie dużą liczbę różnorodnych izoenzymów cytochromu P450 znaleziono w siateczce śródplazmatycznej komórek wątroby. Izoenzymy te występują także w komórkach różnych innych narządów tj: płuc, nerek, serca, jelit, mózgu czy skóry, ale ich ogólna zawartość jest tam mniejsza, niż w wątrobie [26,29].

Izoenzymy cytochromu P450 są zaangażowane w wiele różnorodnych szlaków metabolicznych tj. w:

1. biosyntezę hormonów sterydowych,
2. metabolizm kwasów tłuszczowych i ich pochodnych;
3. inaktywację lub aktywację leków;
4. metabolizm innych związków obcych wprowadzonych do organizmu: (kancerogenów, związków zanieczyszczających środowisko).



Rys. 2. Funkcje i regulacja izoenzymów cytochromu P450 wg [30].

W oparciu o sekwencję aminokwasów w łańcuchu peptydowym enzymy te zostały sklasyfikowane w rodziny i podrodziny. Enzymy należące do tej samej rodziny np. CYP1 wykazują podobieństwo w budowie, w co najmniej 40%, a członkowie podrodziny np. CYP1A w ponad 55% [23,25,31].

Dotychczas zidentyfikowano ok. 300 różnych rodzin cytochromu P450 podzielonych na ponad 500 podrodzin [32], z których większość to białka roślinne, a zaledwie 5% to izoenzymy występujące u człowieka [33]. Dla porównania, genom izoenzymów cytochromu P450 występujących w pospolitej roślinie, ryżu składa się z 324 genów, podczas gdy ludzkie izoenzymy cytochromu P450 kodowane są tylko przez 58 genów. Ludzkie izoenzymy zostały podzielone na 18 rodzin i 42 podrodziny [23,25,34,35]. Z funkcjonalnego punktu widzenia białka cytochromu P450 można podzielić na dwie klasy:

1. Izoenzymy biorące udział w przemianach wielu endogennych cząstek tj. nienasyconych i nasyconych kwasów tłuszczowych, eikozanoidów, steroli, steroidów, witamin.
2. Izoenzymy metabolizujące różne ksenobiotyki, w tym leki i związki zanieczyszczające środowisko.

Druga z wymienionych grup białek cytochromu P450 rozwinęła się prawdopodobnie w wyniku ewolucji z izoenzymów metabolizujących substraty endogenne [32].

Zdolność cytochromu P450 do metabolizowania dużej liczby związków wynika nie tylko z dużej liczby różnych izoform tego białka, ale również z faktu, że konkretny izoenzym może rozpoznawać różne substraty. Wiele izoenzymów cytochromu P450

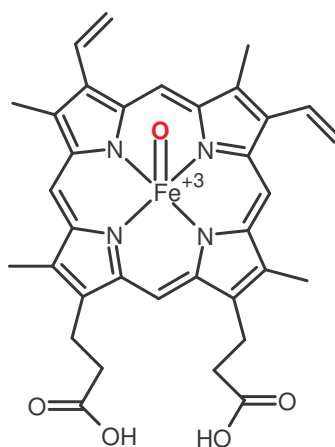


charakteryzuje się szeroką specyficnością substratową, chociaż pojedyncze izoformy wykazują często ścisłą regio- i stereospecyficzność w stosunku do poszczególnych związków [36]. Zrozumienie strukturalnych podstaw takiej specyficzności odgrywa ważną rolę w poznaniu funkcji i mechanizmu działania enzymu. Może to również pomóc w przewidywaniu dróg metabolizmu zarówno leków, w tym leków przeciwnowotworowych, jak i związków toksycznych, a w szczególności rakotwórczych.

Izoenzymy cytochromu P450 katalizujące szereg reakcji redox są niezbędne dla prawidłowego rozwoju ssaków. Pozwalają one utrzymać wewnętrzną równowagę w organizmie, a przede wszystkim chronią go przed szkodliwym działaniem nie tylko ksenobiotyków szeroko rozpowszechnionych w naszym życiu codziennym, ale również przed negatywnym wpływem akumulowanych w organizmie naturalnych produktów [37].

### 3.2 Struktura enzymów cytochromu P450

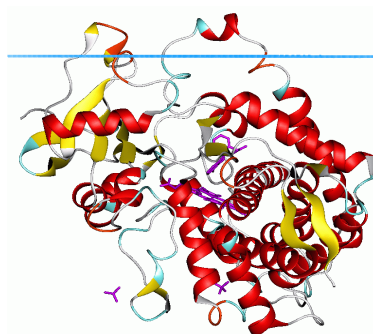
Cytochrom P450 to białka transmembranowe składające się z sześciu podjednostek o masie cząsteczkowej około 50-55 kDa każda. Atom żelaza obecny w centrum aktywnym izoenzymów cytochromu P450 związany jest z czterema atomami azotu pierścienia porfirynowego i dwoma osiowymi ligandami, z których jeden jest grupą tiolową cysteiny [37]. Enzymy te różnią się sekwencją aminokwasów, które odpowiedzialne są za topografię miejsca aktywnego tych białek. W stanie spoczynkowym izoenzymy występują głównie jako mieszanina sześciokoordynowanego niskospinowego jonu Fe (III) z cząsteczką wody w pozycji trans do endogennego ligandu cysteinowego i pięciokoordynowanego wysokospinowego jonu Fe (III) z cysteiną jako jedynym osiowym ligandem [25,38].



Rys. 3. Centrum porfirynowo-żelazowe cytochromu P450.



Krystalograficzna struktura izoenzymów cytochromu P450 została po raz pierwszy określona w 1985 roku dla izoenzymu bakterii z rodzaju *Pseudomonas putida* [39]. Pierwszym eukariotycznym enzymem P450, dla którego wyznaczono całkowitą sekwencję aminokwasową był izoenzym wyizolowany z komórek wątroby szczura po uprzedniej indukcji fenobarbitem [40]. Strukturę przestrzenną izoenzymów występujących u ssaków poznano dopiero 15 lat później w 1999 r. Określono wówczas strukturę enzymu P450 2C5 uzyskanego na drodze rekombinacji genetycznej, czyli poprzez ekspresję genów kodujących te enzymy u *E coli*. [24]. Enzymy eukariotyczne w przeciwieństwie do bakteryjnych są białkami nierozpuszczalnymi. Zawierają one na N-końcu białka sekwencję hydrofobową zwaną „sygnałową sekwencją kotwiczącą”, która składa się z 25 reszt aminokwasowych i pozwala na ich zakotwiczenie w błonie [41]. Dzięki technikom inżynierii genetycznej, poprzez mutację w genomie izoenzymów cytochromu P450 występujących u ssaków, uzyskano bardziej rozpuszczalne formy tych enzymów, dzięki czemu możliwe były ich badania krystalograficzne zmierzające do poznania struktury przestrzennej tych białek [23]. Obecnie znamy strukturę przestrzenną kilku głównych enzymów P450 biorących udział w metabolizmie leków i ksenobiotyków o symbolach 2C8, CYP2C9, 3A4, 1A2 i 2D6 [23,42]. Analiza porównawcza znanych struktur chemicznych sugeruje, że wszystkie enzymy cytochromu P450 mają taką samą strukturę trzeciorzędową i zawierają 11 łańcuchów aminokwasowych o strukturze  $\alpha$  helisy i 4 łańcuchy o strukturze  $\beta$  kartki [42]. Izoenzymy te mają w swej strukturze sześć różnych miejsc wiążących substraty. Wszystkie znane izoformy P450 posiadają miejsca aktywne o właściwościach hydrofobowych i w pobliżu katalitycznego hemu co najmniej jeden aminokwas aromatyczny, który zdolny jest do oddziaływań typu  $\pi$ - $\pi$  z substratami [43]. Inne reszty aminokwasowe, bardziej odległe od centrum katalitycznego, mogą brać udział w dalszym wiązaniu substratu poprzez dodatkowe oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe lub oddziaływania par jonowych [44]. Wykonane w 2006 roku badania krystalograficzne enzymu P450 2D6 (rys. 4) wykazały, że układ hemowy stabilizowany jest przez wiązania wodorowe z następującymi aminokwasami: Arg101, Trp 128, Arg 132, His 376, Ser 437 i Arg 441. Atom żelaza tworzy wiązanie pięciokoordynacyjne z cysteiną Cys 443 [42, 45].

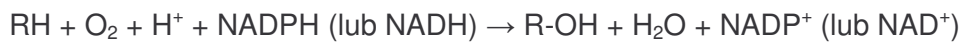


Rys. 4. Struktura przestrzenna izoenzymu 2D6 wg. [46].

### 3.3 Mechanizm działania enzymów cytochromu P450

Rodzina enzymów cytochromu P450 to białka błonowe występujące głównie w mikrosomach retikulum endoplazmatycznego oraz w strukturach błonowych mitochondrium [47].

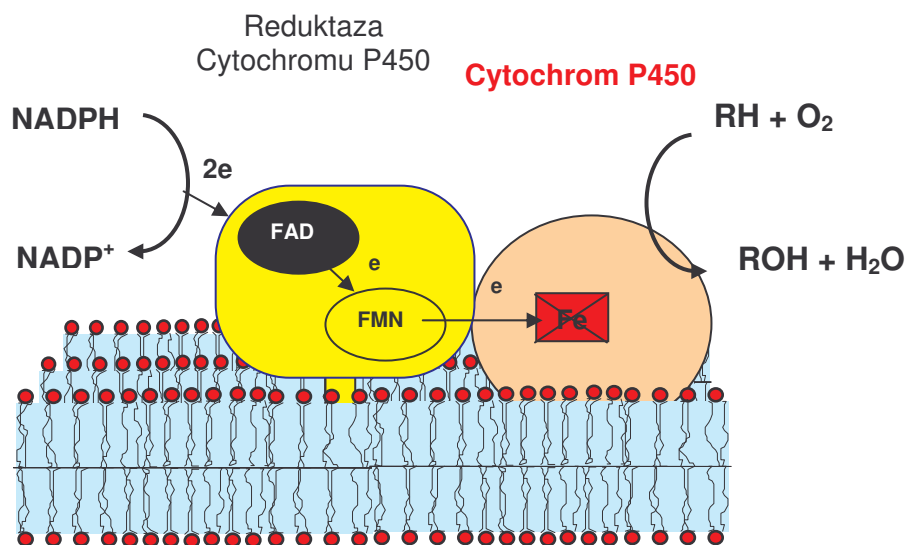
Jedną z zasadniczych funkcji tej rodziny enzymów jest katalizowanie reakcji utleniania szerokiej gamy związków endo- i egzogennych. Reakcja ta określana jest, jako monooksygenacja, ponieważ tylko jeden z dwóch atomów cząsteczki tlenu wbudowywany jest do cząsteczki substratu [48,49]. Reakcję tą można zapisać w postaci następującego równania ogólnego:



gdzie:

RH – substrat, ROH – produkt

W reakcji monooksygenacji izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub czasem z NADH poprzez inne przenośniki elektronów, sprzężone z tymi białkami i występującymi wraz z nimi w błonach komórkowych, co schematycznie przedstawia rys. 5.



Rys. 5. Kompleks cytochromu P450 z NADPH - zależną Reduktazą Cytochromu P450.

Transfer elektronów z NADPH na cytochrom P450 u człowieka jest realizowany przez dwa systemy transportu. W siateczce śródplazmatycznej NADPH przekazuje

elektrony na flawoproteinę zwaną NADPH - zależną reduktazą cytochromu P450. Enzym ten, o czym będzie mowa jeszcze w dalszej części pracy, zawiera dwie główne grupy prostetyczne: dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN). Dwa elektrony z cząsteczki NADPH są przenoszone na FAD, a następnie na FMN, skąd po jednym elektronie są dostarczane na hem cytochromu P450, który ulega stopniowej redukcji przenosząc elektron na substrat (rys. 5). Tak więc domena FAD w reduktazie służy jako punkt wejściowy dla elektronów z NADPH, a FMN jako wyjściowy, przenosząc elektrony pojedynczo na hem cytochromu P450 [50]. W pewnych reakcjach katalizowanych przez mikrosomalne izoenzymy cytochromu P450 transfer drugiego elektronu może zachodzić nie bezpośrednio z reduktazy cytochromu P450, ale z cytochromu  $b_5$ , małego białka hemowego o masie około 17 kDa, które również obecne jest w retikulum endoplazmatycznym [37,51].

Cytochrom  $b_5$  redukowany jest przez NADPH zależną reduktazę cytochromu P450 albo inną flawoproteinę mikrosomalną – NADH reduktazę cytochromu  $b_5$ . Rola tego białka nie jest ustalona, ale uważa się, że w zależności od rodzaju izoenzymu cytochromu P450 oraz jego substratu cytochrom  $b_5$  może stymulować, hamować lub też nie mieć wpływu na reakcje katalizowane przez enzym cytochromu P450 [51].

Cytochrom  $b_5$  stymuluje metabolizm endogennych substratów tj. prostaglandyn, kwasów tłuszczowych, witamin i steroidów oraz oksydację wielu leków i kancerogenów np. metoksyfluorenu, bezenu, nitrozoamin i p-nitrosoli [52]. Wykazano, że cytochrom  $b_5$  stymuluje aktywność dwóch znanych izoenzymów: CYP2B1 i CYP2E1 [53]. W przypadku reakcji katalizowanej przez izoenzym CYP2B4 białko  $b_5$  konkuruje z reduktazą cytochromu P450 o miejsce wiązania w izoenzymie cytochromu P450 w procesie przenoszenia drugiego elektronu koniecznego dla zajścia katalizowanej reakcji. Działanie stymulacyjne cytochromu  $b_5$  polega na zwiększeniu wydajności wykorzystania NADPH. Jednocześnie jednak wysokie stężenie tego cytochromu hamuje pierwszy etap cyklu katalizacyjnego cytochromu P450, czyli redukcję atomu Fe (III) do atomu Fe (II) [53]. Zatem zróżnicowany wpływ cytochromu  $b_5$  na reakcje katalizowane przez izoenzymy cytochromu P450 polegający na hamowaniu albo stymulacji w dużej mierze zależy od stężenia tego białka w komórce.

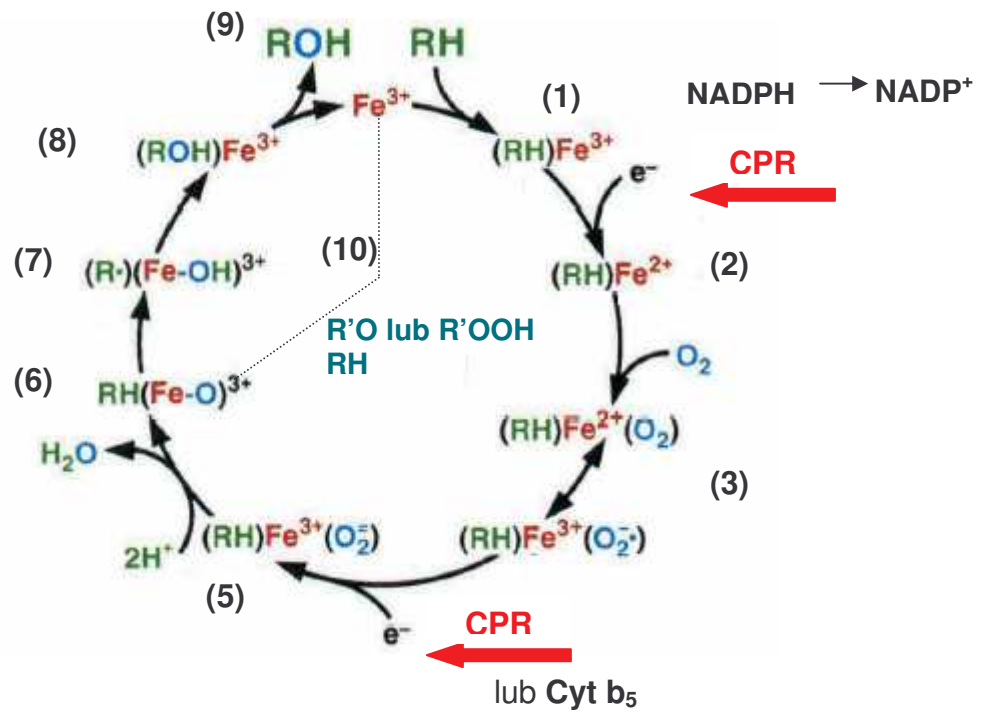
W mitochondriach akceptorem elektronów z NADPH jest reduktaza flawoproteinowa, która zawiera tylko FAD i ma masę około 51 kDa [54]. Jest ona słabo związana z błoną mitochondrialną w odróżnieniu od odpowiednika flawoproteinowego w błonie retikulum. Reduktaza ta nie może bezpośrednio przenosić elektronów na hem cytochromu P450. W reakcji tej pośredniczy białko o małej masie cząsteczkowej – adrenodoksyna. Adrenodoksyna przenosi elektrony z mitochondrialnej reduktazy flawoproteinowej i oddziałuje z izoenzymami cytochromu P450 osadzonymi w błonie

wewnętrznej mitochondrium transportując elektrony na atom żelaza hemu [43]. Składniki mitochondrialnego systemu P450 obejmujące flawoproteinę i białko żelazowo – siarkowe są syntetyzowane w cytozolu jako prekursory o większej masie cząsteczkowej, a następnie są transportowane do mitochondrium, gdzie następuje ich transformacja przez proteazy w dojrzałe białka o niższej masie cząsteczkowej. Inne gatunki organizmów mogą wykorzystywać inne systemy transportu elektronów, np. dostarczenie elektronów na P450<sub>cam</sub> u *Pseudomonas putida* wymaga dodatkowo reduktazy putidaredoksyny [27,55].

Omówiony powyżej mechanizm transportu elektronów w reakcji monooksygenacji to tylko jeden z typów reakcji katalizowanych przez liczną i wszechstronną rodzinę białek cytochromu P450. Enzymy te, biorą udział także w szeregu innych reakcji tj. redukcji, dehydratacji, dehydrogenacji, dehalogenacji i dimeryzacji czy izomeryzacji [37,38]. Tak więc cechą wspólną dla wszystkich izoenzymów cytochromu P450 nie jest aktywacja cząsteczki O<sub>2</sub> i transfer jednego atomu tlenu na substraty, ale ciągle maksimum absorpcji kompleksu żelaza z tlenkiem węgla przy około 450 nm [38].

### Cykl katalityczny cytochromu P450.

Cykl katalityczny cytochromu P450 przedstawiony na rys. 6 jest inicjowany przez związanie substratu do cząsteczki cytochromu P450 **(1)**. Następuje wówczas zakłócenie równowagi między wysokospinowym a niskospinowym stanem koordynacyjnym atomu żelaza w kierunku kompleksu pięciokoordynowanego Fe (III). Związany z substratem stan pięciokoordynacyjny ma silniej dodatni potencjał redukcyjny (-170 mV), niż stan sześciokoordynacyjny (-270 mV), co zwiększa szybkość, z jaką enzym cytochromu P450 może być zredukowany przez elektrony z NADPH [34,38]. Kolejnym etapem cyklu jest redukcja Fe (III) do Fe (II) przez elektron przeniesiony z kofaktora NADPH za pomocą reduktazy cytochromu P450 **(2)**. Powstały w wyniku jednoelektrodowej redukcji atomu Fe (II) wiąże cząsteczkę tlenu tworząc addukt Fe(II) - O<sub>2</sub> **(3)**, który szybko ulega przemianie w bardziej trwały kompleks Fe (III) - O<sub>2</sub><sup>-</sup> **(4)**. Od tego momentu kolejne intermediały cyklu P450 są znacznie słabiej poznane. Prawdopodobnie w kolejnym etapie cyklu katalitycznego do kompleksu Fe (II) - O<sub>2</sub> dostarczany jest drugi elektron z cząsteczki NADPH, w czym bierze udział białkowy przenośnik elektronów, reduktaza cytochromu P450, a w niektórych przypadkach także cytochrom b<sub>5</sub> [37,52]. Tak powstały kompleks oddziałuje z protonem z otaczającego środowiska **(5)**, po czym następuje rozpad wiązania O – O i utworzenie cząsteczki wody oraz kompleksu oznaczanego jako (FeO)<sup>3+</sup> **(6)**. Kompleks ten bywa zapisywany także jako Fe<sup>v</sup>=O, ale jego konfiguracja elektronowa nie jest dokładnie znana. Związany z atomem żelaza atom tlenu przenoszony jest na substrat tworząc produkt z grupą hydroksylową **(7,8)**. Po uwolnieniu produktu enzym wraca do stanu wyjściowego Fe (III) **(9)** [23,37].



Rys. 6. Cykl katalityczny izoenzymów cytochromu P450 wg. [23,29,37].

Obecnie uważa się, iż każdy z wymienionych powyżej etapów cyklu katalitycznego izoenzymów cytochromu P450 może mieć wpływ na ostateczne tempo przemian substratu do produktu [24].

W przypadku braku odpowiednich substratów do reakcji niektóre izoenzymy mogą ulegać autooksydacji i produkować reaktywne formy tlenu ROS tj. anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru czy rodnik hydroksylowy, które są toksyczne dla komórki, uszkadzają białka, DNA i inne struktury komórkowe, co może prowadzić do indukcji zjawiska apoptozy [33].

### 3.4 Funkcje fizjologiczne izoenzymów cytochromu P450

Chociaż w komórkach, oprócz rodziny cytochromu P450, jest wiele enzymów utleniających zdolnych do metabolizmu substancji endo- i egzogennych (np.: dehydrogenaza alkoholowa, oksydaza ksantynowa, oksydaza aminowa), to izoenzymy cytochromu P450 odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu wewnętrznej równowagi w komórkach koniecznej dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu [37].

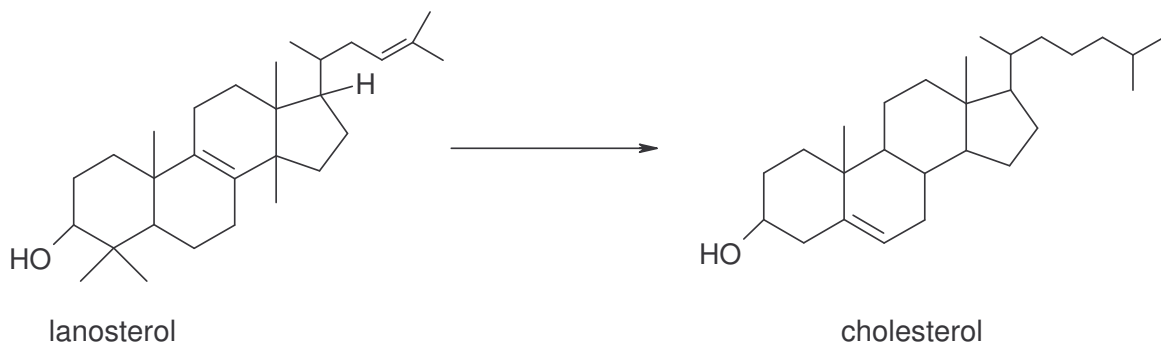
Od 1991 roku izoenzymy cytochromu P450 oznaczane są symbolem CYP. W oparciu o sekwencję aminokwasów w łańcuchu peptydowym enzymy te zostały podzielone na rodziny i podrodziny. Enzymy należące do tej samej rodziny oznaczone

cyfrą arabską np. CYP1 wykazują podobieństwo w budowie, w conajmniej 40%, a członkowie podrodziny np. CYP1A w ponad 55% [34].

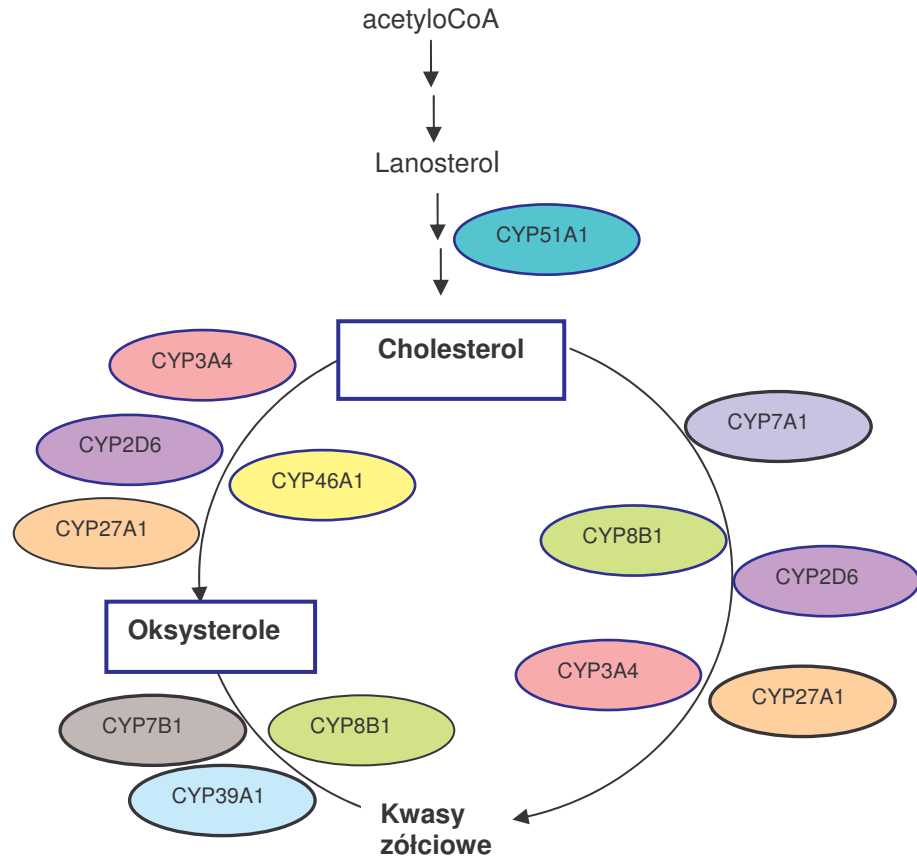
Izoenzymy cytochromu P450 uczestniczą w syntezie wielu hormonów sterydowych, a także w metabolizmie kwasów tłuszczowych, eikozanoidów i witamin np. D3 i A [56].

W biosyntezie steroli oraz kwasów tłuszczowych bierze udział od 7 do 9 różnych izoenzymów cytochromu P450. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa CYP 51A1, który katalizuje reakcję 14 $\alpha$  demetylacji lanosterolu, w wyniku czego powstaje cholesterol. Gen kodujący ten enzym występuje we wszystkich organizmach żywych począwszy od roślin i grzybów po zwierzęta, co sugeruje, iż enzym CYP51A1 jest przodkiem eukariotycznych izoenzymów cytochromu P450 [25].

Cholesterol o strukturze przedstawionej na rys.7 jest syntetyzowany z lanosterolu i spełnia wiele istotnych funkcji w organizmie. Jest kluczowym substratem w syntezie kwasów żółciowych potrzebnych organizmowi do trawienia tłuszczów. Reakcje przemiany cholesterolu są katalizowane głównie przez izoenzymy należące do następujących rodzin tj. CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 i CYP46, co przedstawia rys. 8.



Rys. 7. Struktura chemiczna lanosterolu i cholesterolu.



Rys. 8. Schemat syntezy i metabolizmu cholesterolu wg. [25].

W pierwszym etapie syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu i oksysterolu ważną funkcję spełniają: CYP7A1, CYP7B1 i CYP39A1, które katalizują reakcję hydroksylacji atomu węgla 7 [25]. Pozostałe izoenzymy biorące udział w biosyntezie kwasów żółciowych to CYP8B1 katalizujący w tym procesie reakcję 12 $\alpha$  hydroksylacji oraz CYP27 A1 (26-/27 hydroksylaza), który konieczny jest do syntezy oksysterolii i utleniania łańcucha bocznego steroli [25]. Ostatni z wymienionych izoenzymów cytochromu P450 bierze również udział w 25-hydroksylacji witaminy D<sub>3</sub> [47].

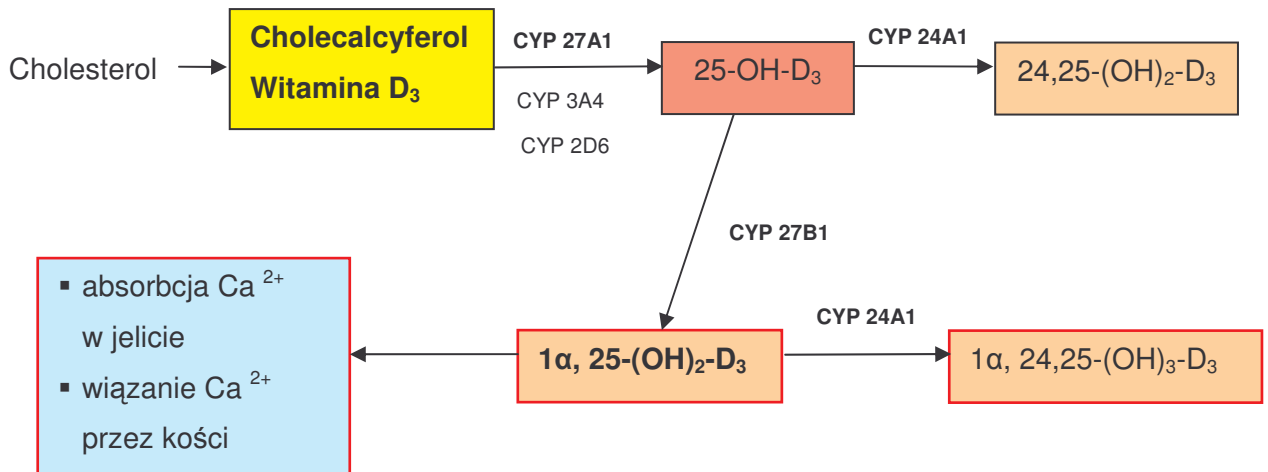
Ciekawym izoenzymem cytochromu P450 biorącym także udział w metabolizmie cholesterolu jest CYP46A1. Występuje on głównie w neuronach centralnego systemu nerwowego i bierze udział w metabolizmie cholesterolu do 24S-hydroksycholesterolu (oksysterolu), który jest bardziej polarny, niż cholesterol i swobodnie pokonuje barierę krew – mózg [57]. Oksysterol wraz z krwią powraca do wątroby, gdzie może być przekształcony w kwasy żółciowe lub jest wydalany w postaci siarczanów i glukuronianów. Proces ten jest jednym ze sposobów wydalania cholesterolu z komórek mózgu i umożliwia jego cyrkulację w organizmie. W ten sposób izoenzym CYP46A1 bierze udział w utrzymaniu wewnętrznej równowagi w poziomie cholesterolu. Wysoki poziom cholesterolu w komórkach mózgu ma wpływ na rozwój chorób neurodegeneracyjnych



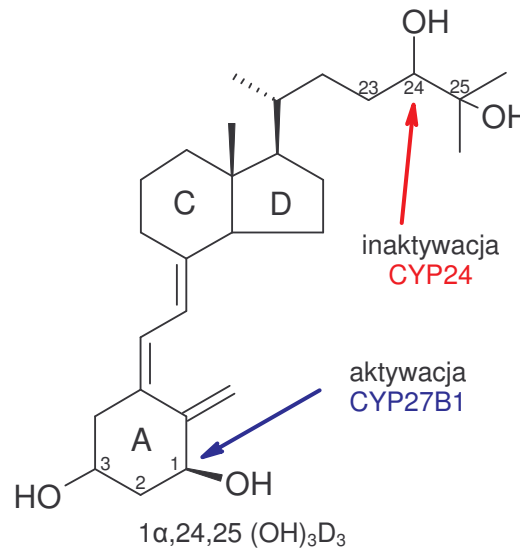
m.in. Alzheimerera. Izoenzym CYP46A1 może zatem spełniać ważną funkcję w hamowaniu tego procesu [57].

Izoenzymy cytochromu P450 biorą także udział w syntezie i metabolizmie witaminy D<sub>3</sub> (cholekalcyferol). Reakcja syntezy tej witaminy z pochodnej cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu zachodzi w komórkach skóry - keratynocytach pod wpływem promieniowania UVB. Cholekalcyferol podobnie, jak dostarczana z pożywieniem witamina D<sub>2</sub>, wymaga enzymatycznej aktywacji dla spełniania biologicznych funkcji w organizmie [58]. W szlaku metabolicznym witaminy D<sub>3</sub> istotną rolę odgrywają trzy enzymy mitochondrialne: wspomniany już wcześniej CYP27A1, CYP27B1 oraz CYP24, co przedstawia rys. 9. Pierwszy etap tego procesu przebiega w wątrobie i jest to reakcja 25-hydroksylacji atomu węgla, natomiast drugi zachodzi głównie w nerkach i jest to reakcja 1 $\alpha$ -hydroksylacji katalizowana przez CYP27B1, w wyniku czego powstaje 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy witaminy D<sub>3</sub>, czyli aktywna forma witaminy D<sub>3</sub>. Z drugiej strony izoenzym CYP24 katalizuje sześćoetapowy proces inaktywacji tej formy witaminy. Zatem poziom witaminy D<sub>3</sub> w surowicy jest regulowany przez poziom ekspresji dwóch głównych izoenzymów: CYP27B1 i CYP24 [25]. Obecnie wiadomo, że enzymatyczna aktywacja witaminy D<sub>3</sub> oprócz komórek nerek może zachodzić, także w komórkach skóry i układu odpornościowego, co wiąże się z wszechstronną funkcją tej witaminy. Aktywna postać witaminy D<sub>3</sub> reguluje aktywność, co najmniej 1000 różnych genów, przez co ma wpływ nie tylko na proces kształtowania kośćca, ale w rzeczywistości działa na cały organizm, zwłaszcza na układ odpornościowy i obronę komórkową. Witamina ta ma działanie przeciwzapalne, a nawet przeciwnowotworowe [59]. Przykładem może być syntetyczny analog 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy witaminy D<sub>3</sub>, związek o symbolu EB1089, który jak wskazują badania *in vivo* na myszach zmniejszył wzrost nowotworów głowy i szyi tych zwierząt o 80%. Związek ten stymuluje gen *GADD45a*, który odpowiedzialny jest za zahamowanie wzrostu komórek z uszkodzonym DNA, oraz aktywuje geny kodujące białka związane ze stymulacją procesu różnicowania się i dojrzewania komórek, co zmniejsza ich zdolność do podziałów. Dzięki takiemu działaniu związek EB1089 zmniejsza ryzyko rozwoju nowotworu. Przeprowadzone w ostatnim roku badania wykazały, że ludzkie komórki odpornościowe w odpowiedzi na kontakt ze ścianą komórkową bakterii produkują białko receptorowe witaminy D<sub>3</sub>, VDR i izoenzym CYP27B1. Białka te, odpowiedzialne są za aktywację prowitaminy D<sub>3</sub> do formy aktywnej, indukując tym samym produkcję katelicyny, która ma działanie przeciwbakteryjne.





Rys. 9. Schemat metabolizmu prowitaminy D<sub>3</sub> w komórkach wg. [25].



Rys. 10. Przemiany witaminy D<sub>3</sub> w obecności izoenzymów cytochromu P450.

Kolejną rodziną enzymów cytochromu P450, która występuje w komórkach wątroby spełnia ważną funkcję w organizmie jest CYP26. Należące do tej rodziny białek CYP26A1 i CYP26B1 biorą udział w przemianach pochodnej witaminy A - kwasu retinowego [35].

Należący do grupy retinoidów, kwas retinowy spełnia ważną rolę w różnicowaniu się komórek w trakcie rozwoju kręgowców. Jego niedobór jest przyczyną poważnych wad rozwojowych [60]. Podobnie do omówionej powyżej witaminy D<sub>3</sub>, kwas retinowy reguluje wiele procesów fizjologicznych. Metabolity *trans* i *9-cis* tego związku oddziałują z receptorami jądrowymi tj. RAR i PXR i regulują transkrypcję genów, a w konsekwencji wpływają na poziom wielu białek w organizmie. Kwas retinowy ma działanie antybakteryjne, bierze udział w rozwoju i różnicowaniu się limfocytów, spełniających istotną rolę w układzie odpornościowym. Związek ten stosowany jest w leczeniu chorób

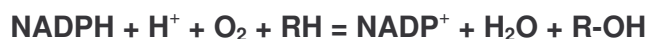
oczu, skóry, a także w nowotworach np. białaczkę promielocytowej [25,61]. Izoenzym CYP26A1 katalizuje reakcję hydroksylacji pochodnych *trans* kwasu retinowego nie rozpoznając izomerów „*cis*”, co wpływa na ograniczenie sygnału komórkowego koniecznego dla różnicowania się komórek.

Izoenzymy cytochromu P450 uczestniczące w różnych reakcjach biosyntezy i metabolizmu szerokiej gamy związków endogennych mają istotne znaczenie dla rozwoju każdego organizmu.

### 3.5 Typy reakcji katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450

#### 3.5.1 Reakcje monooksygenacji

Podstawowym typem reakcji katalizowanym przez enzymy cytochromu P450 jest reakcja monooksygenacji, w której tylko jeden atom z cząsteczki tlenu włączany jest do substratu.

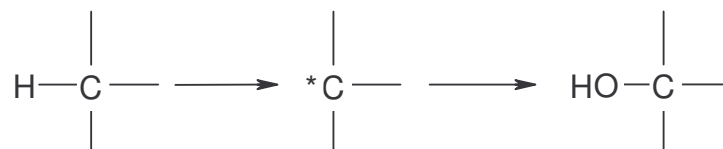


gdzie substratem (R) może być lek, kwas tłuszczowy, steroid lub inny związek tj. alkan, alken, związek aromatyczny lub heterocykliczny [62].

Do tej grupy zaliczamy omówione poniżej reakcje:

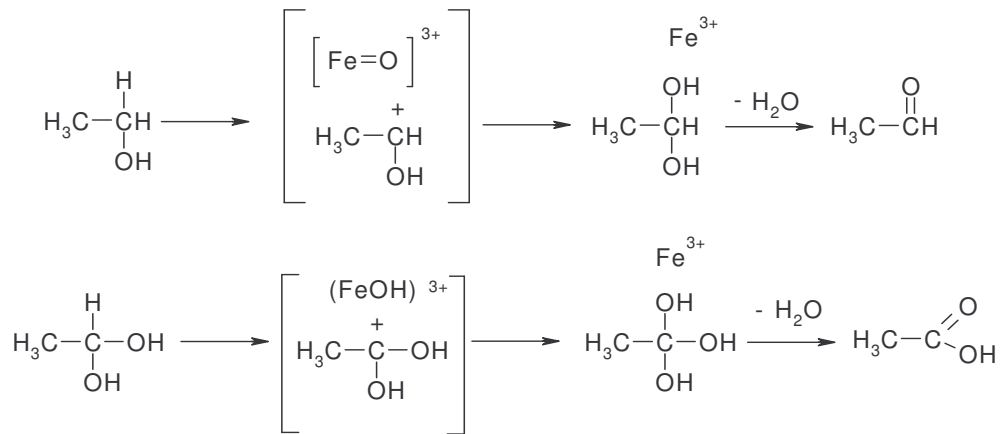
#### Reakcja hydroksylacji atomu węgla,

Reakcja ta polega na rozerwaniu wiązania węgiel-wodór i przyłączeniu atomu tlenu według następującego schematu:



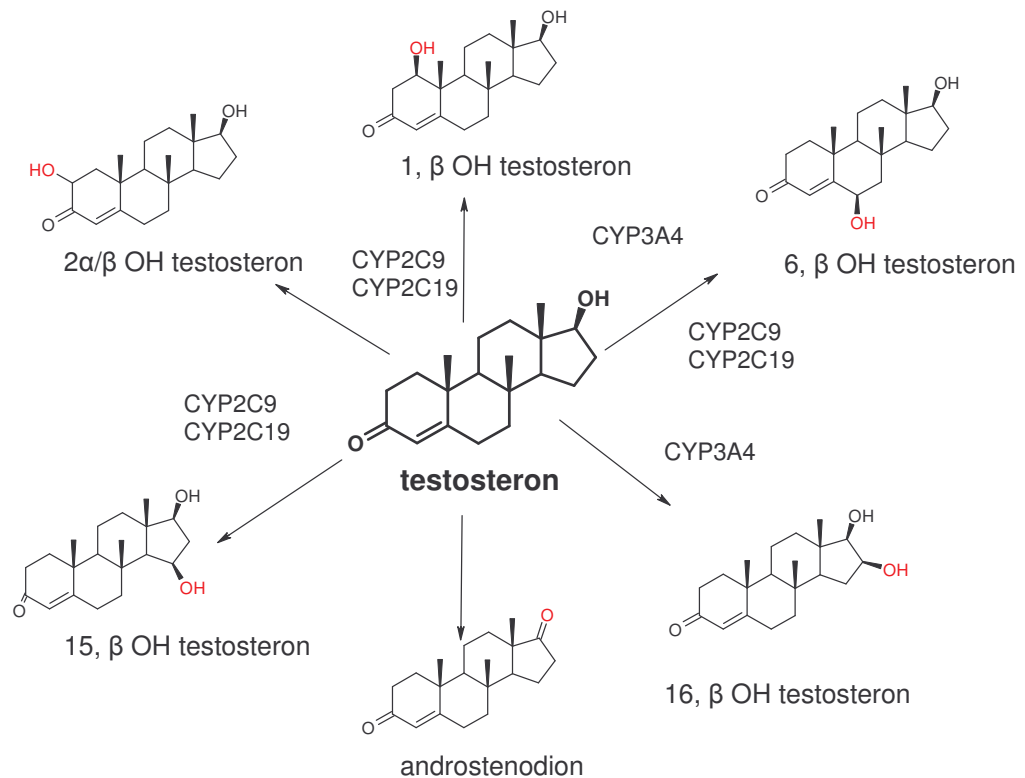
Rys. 11. Schemat reakcji C-hydroksylacji wg.[23].

Elektrofilowa aktywna cząstka  $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]^{3+}$  w hemie jest wystarczająco reaktywna żeby przyłączyć atom tlenu do niespolaryzowanego wiązania C – H [23,63]. Przykładem takiej reakcji może być utlenianie alkoholu etylowego do aldehydu, a następnie do kwasu karboksylowego [23].



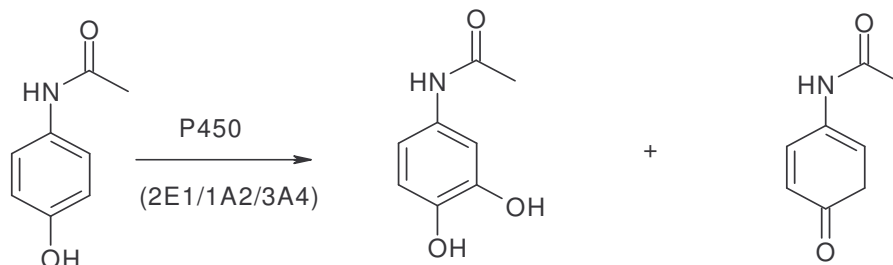
Rys. 12. Schemat reakcji C-hydroksylacji etanolu do kwasu octowego wg. [23].

Innym przykładem jest reakcja hydroksylacji testosteronu katalizowana przez trzy najbardziej rozpowszechnione izoenzymy cytochromu P450: CYP3A4, 2C9 i 2C19, co przedstawia poniższy rysunek.



Rys. 13. Reakcja hydroksylacji testosteronu katalizowana przez izoenzymy cytochromu P450 wg. [64].

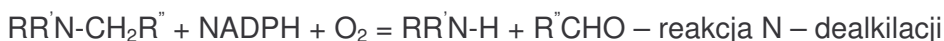
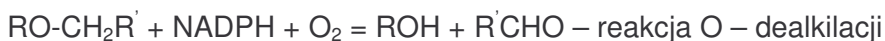
Do tego typu reakcji hydroksylacji i utleniania należy też bioaktywacja znanego leku o działaniu przeciwbólowym, Paracetamolu<sup>1</sup> (paracetamolium) przedstawiona na rys. 14. Reakcję tę katalizują następujące izoenzymy: CYP2E1, 1A2 i 3A4 [65].



Rys. 14. Reakcja aktywacji Paracetamolu\* wg. [65].

#### ◆ Reakcja dealkilacji

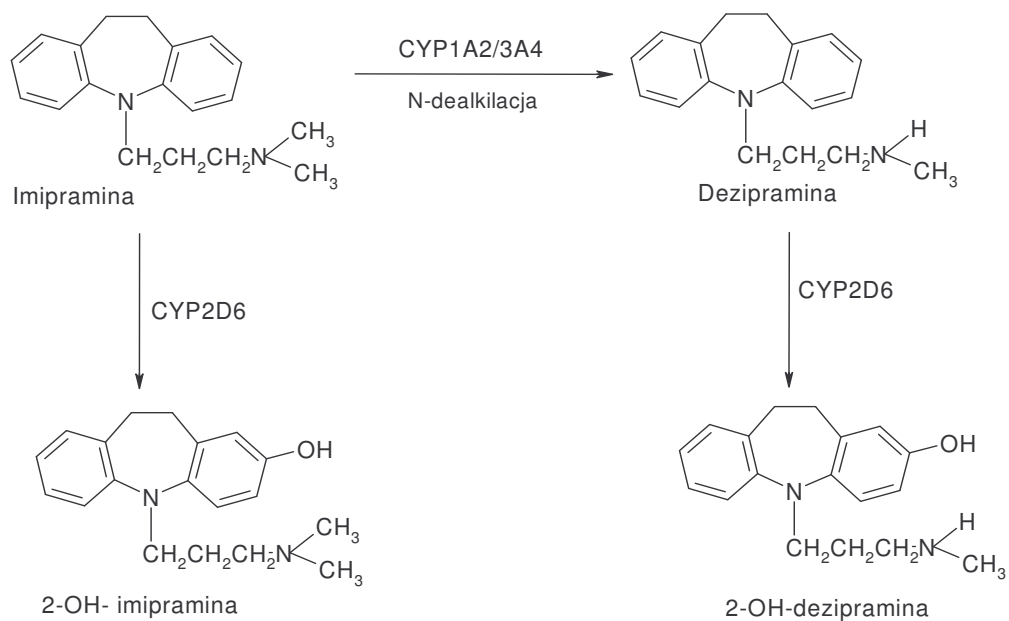
Gdy reakcja hydroksylacji zachodzi w pozycji  $\alpha$  do heteroatomów np. atomu tlenu w eterach, azotu w aminach i amidach czy siarki w tioeterach następuje hydrolytyczny rozpad wiązania prowadzący odpowiednio do O -, N - i S – dealkilacji [23], przedstawionej na poniższym schemacie:



Rys. 15. Schemat reakcji O - i N – dealkilacji wg. [23].

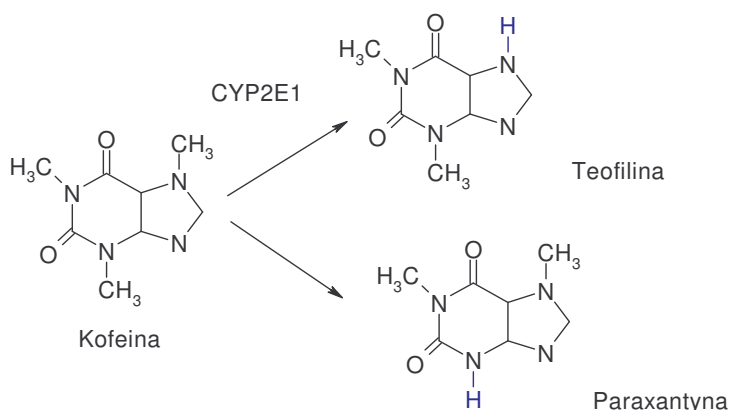
Tego typu reakcje zachodzą bardzo często podczas bioaktywacji i detoksykacji wielu ksenobiotyków, w tym leków i są katalizowane przez różne izoenzymy cytochromu P450. Przykładem reakcji N – dealkilacji jest przedstawiony na rys.16 metabolizm Imipraminy\* (imipraminum) i Dezipraminy\* (dezipraminum) katalizowany przez: CYP1A2, CYP3A4 i CYP2D6.

<sup>1</sup> Nazwy leków podaję w dwóch formach: nazwę polską z dużej litery i z gwiazdką oraz nazwę łacińską w nawiasie i z małej litery, wg. A. Zejc, M. Górczyca „Chemia Leków”. Podpisy pod rysunkami zawierają nazwę polską.



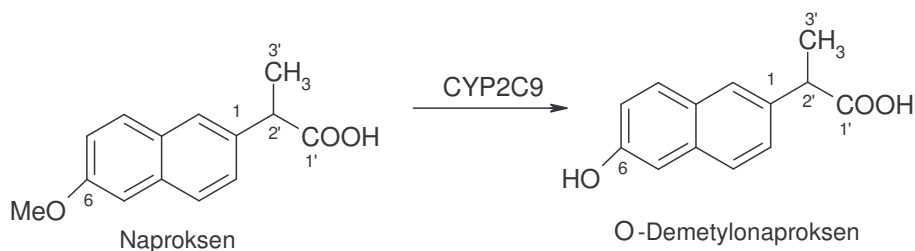
Rys. 16. Reakcja N – dealkilacji leku antydepresyjnego Imipraminy\* wg. [66].

Reakcji N - dealkilacji ulega także stosowana powszechnie Kofeina\* (coffeinum):



Rys. 17. Reakcja N - demetylacji Kofeiny\* wg. [67].

Natomiast reakcja O - demetylacji zachodzi np. podczas enzymatycznej przemiany znanego leku przeciwzapalnego - Naproksenu\* (naproxenum) (rys.18)



Rys. 18. Reakcja O - demetylacji Naproksenu\* wg. [68,69].

### ◆ Oksygenacja heteroatomu

Niektóre izoenzymy cytochromu P450 są również zdolne do katalizowania reakcji hydroksylacji wiązania N – H w I i II – rzędowych aminach i amidach. Aminy I i II – rzędowe tworzą początkowo N – hydroksyloaminy, a I rzędowe metabolizują następnie do nitrozopochodnych. Produkty te są bardzo reaktywne i często jest to proces aktywacji leków [70].



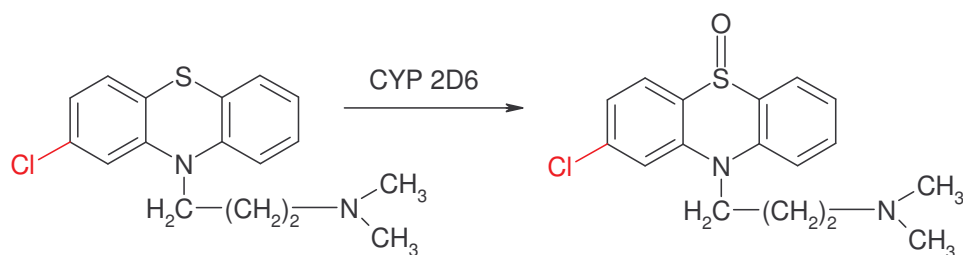
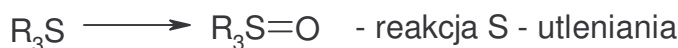
Rys. 19. Schemat reakcji utleniania amin do nitrozopochodnych wg. [23].

III – rzędowe aminy metabolizowane są do N – tlenków [71].



Rys. 20. Schemat reakcji utleniania amin do N - tlenków wg. [23].

Enzymy P450 mogą katalizować reakcje utlenienia tioeterów, w wyniku czego powstają sulfotlenki. Reakcji takiej ulegają na przykład neuroleptyczne leki psychotropowe Chloropromazyna\* (chlorpromazinum) i Promazyna\* ( promazinum) (rys. 21)



Promazyna\* / Chloropromazyna

5-sulfotlenek Promazyiny / Chloropromazyiny

Rys. 21. Reakcja S - utleniania Promazyiny\* katalizowana przez izoenzymy z grupy CYP2D6 wg. [69].

Wiele N - i S - tlenków jest mniej toksyczna, niż związki wyjściowe, dlatego reakcje N - oksygenacji amin, w tym także amin heterocyklicznych są bardzo ważnym etapem w procesie ich detoksykacji katalizowanym przez izoenzymy cytochromu P450 [23].

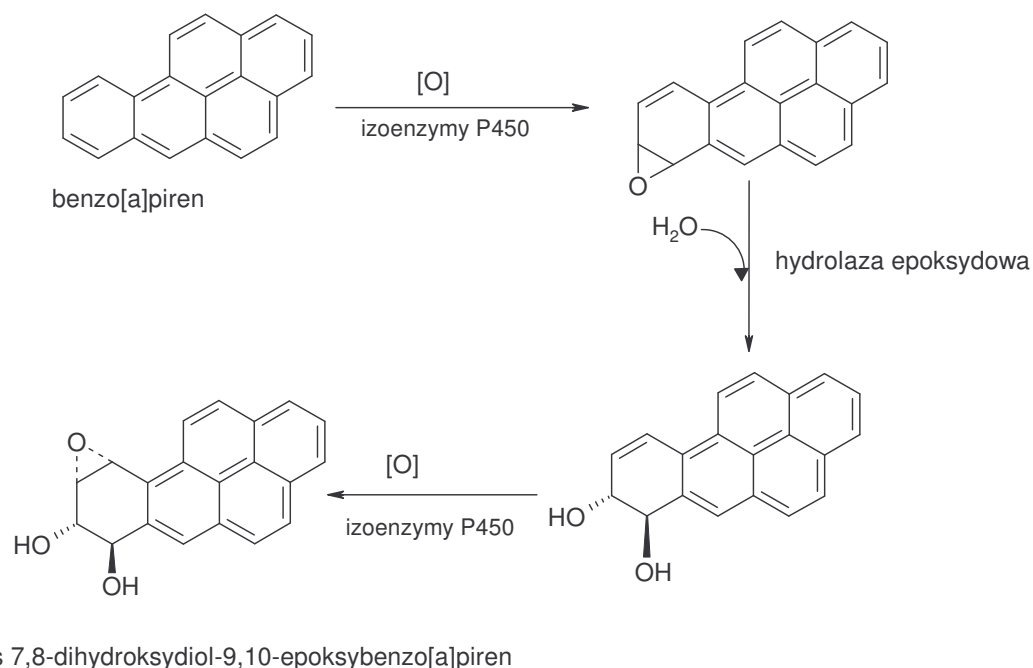
### ◆ Reakcja epoksydacji



Rys. 22. Ogólny schemat reakcji epoksydacji wg. [37,51].

W reakcjach epoksydacji katalizowanych głównie przez CYP1A2 powstają reaktywne epoksydy wykazujące silniejsze działanie toksyczne, niż substraty, z których powstały. Związki te mogą oddziaływać z makrocząsteczkami obecnymi w komórce tj. DNA czy białkami powodując ich uszkodzenie. Reakcje epoksydów z DNA są bezpośrednią przyczyną kancerogennych właściwości takich związków jak: benzen, benzopiren, aflatoksyna, chlorek winylu, czy polichlorowane węglowodory aromatyczne [44]. W reakcjach biorą głównie udział następujące izoenzymy cytochromu P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 i CYP3A4.

Ksenobiotykiem, któremu poświęcono dużo uwagi jest rozpowszechniony w środowisku benzo[a]piren, który powstaje podczas spalania węgla, palenia tytoniu, grillowania żywności, a także jest produktem ubocznym wielu procesów przemysłowych. W cząsteczce benzo[a]pirenu jest kilka miejsc, które mogą ulegać reakcji epoksydacji, a w konsekwencji hydroksylacji, katalizowanej przez różne izoformy cytochromu P450. W wyniku tych reakcji benzo[a]piren jest metabolizowany do produktu, który jest groźnym kancerogenem u ludzi i silnym mutagenem u bakterii. Szlak biotransformacji tego związku został bardzo dobrze zbadany, łącznie ze stereochemicznymi aspektami tej reakcji (rys. 23). Początkowy etap przemiany benzo[a]pirenu wymaga epoksydacji katalizowanej przez izoenzymy cytochromu P450 w pozycji 7,8. Kolejny etap to hydroliza do związku zawierającego wicynalne grupy OH katalizowana przez hydrolazę epoksydową, a następnie kolejna reakcja epoksydacji. Na szczęście organizm wykształcił mechanizmy obronne przed tak toksycznymi metabolitami, jakimi są aromatyczne epoksydy. Kluczową rolę w tych procesach mają: hydrolaza epoksydowa oraz transferaza glutationowa.

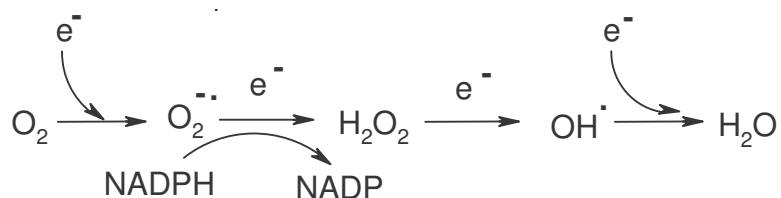


Rys. 23. Schemat biotransformacji benzo[a]pirenu katalizowany przez izoenzymy cytochromu P450 wg. [72,73].

### 3.5.2 Reakcje izoenzymów cytochromu P450 różne od monooksydacji

#### ◆ Metabolizm cząsteczki tlenu

Enzymy cytochromu P450 mogą pełnić także rolę oksydazy. Jedną z charakterystycznych reakcji izoenzymów cytochromu P450, która ma szczególne znaczenie dla przemian metabolicznych ksenobiotyków jest redukcja cząsteczki tlenu [74]. W warunkach tlenowych cząsteczka tlenu przyjmuje elektron z cytochromu P450. W wyniku tej reakcji powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot -}$ ), cząsteczka nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i  $H_2O$ , co przedstawia schematycznie rys. 24.



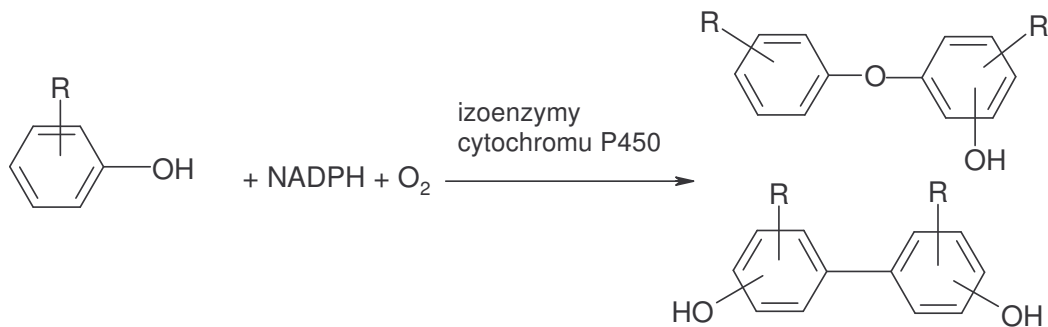
Rys. 24. Schemat jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu wg. [23].



Reaktywne formy tlenu tj  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  czy  $H_2O_2$  prawdopodobnie uwalniane są z kompleksu cytochromu P450 z cząsteczką tlenu  $Fe-O_2$  [74,75]. Reaktywny anionorodnik ponadtlenkowy może powstawać nie tylko podczas reakcji utleniania substratu, ale także spontanicznie bez jego udziału. Reaktywne formy tlenu są toksyczne dla komórki. Uszkadzają one polinienasycone kwasy tłuszczowe i fosfolipidy błonowe, powodują pękanie łańcuchów DNA oraz jego zmiany antygenowe [76]. Komórka wykształciła systemy obronne przed toksycznym działaniem ROS, a funkcję tą spełnia m.in. glutation, GSH.

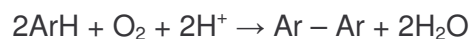
#### ◆ Enzymy cytochromu P450 jako peroksydaza

Izoenzymy cytochromu P450 mogą również pełnić funkcję peroksydazy, co wykazano badając reakcje biosyntezy polifenoli [23]. Enzymy te katalizują reakcje utleniania i łączenia się fenoli z utworzeniem wiązań C – C lub C – O.



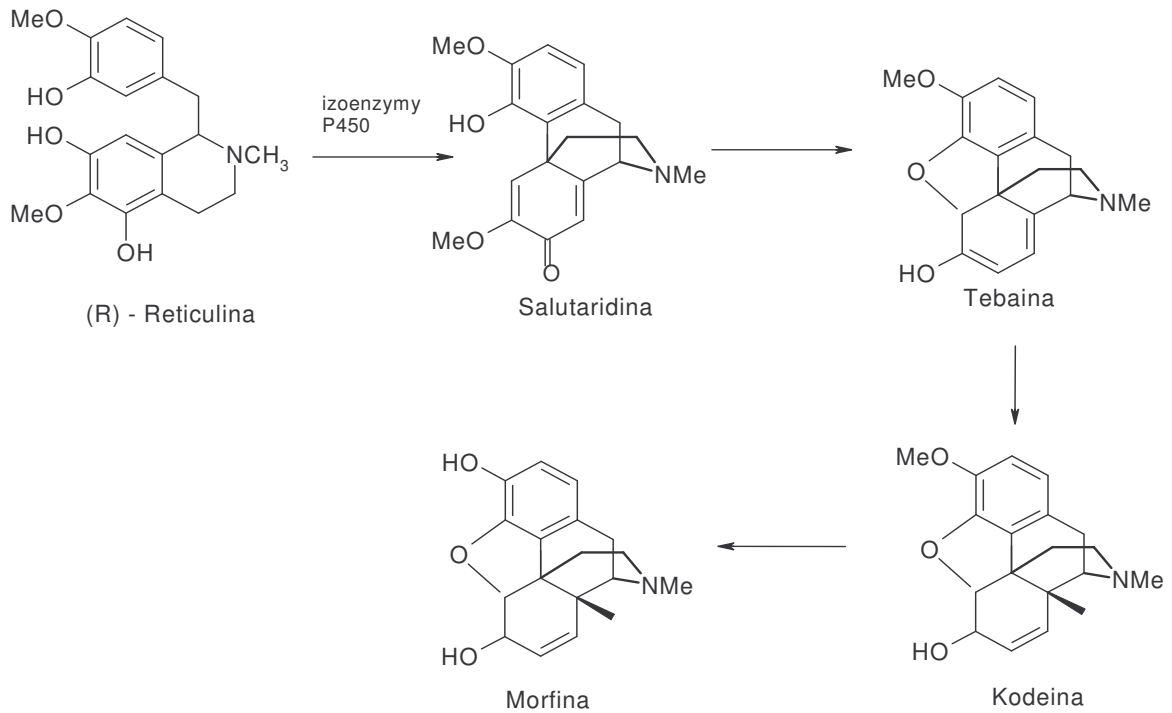
Rys. 25. Izoenzymy cytochromu P450 w funkcji peroksydazy wg.[23].

Poniżej przedstawiono ogólny schemat reakcji peroksydacji katalizowanej przez izoenzymy cytochromu P450.



Rys. 26. Schemat reakcji peroksydacji wg.[23].

Tworzenie wiązania C – C zaobserwowano np. między dwoma pierścieniami fenolowymi w kluczowym etapie syntezy alkaloidów tj. Kodeiny\* (codeinum) i Morfiny (morphinum) [23]. Reakcja ta katalizowana jest przez izoenzymy cytochromu P450 i zachodzi w Maku Lekarskim (*Papaver somniferum*).



Rys. 27. Utlenienie Reticuliny\* do Morfiny\* przez izoenzymy cytochromu P450 w funkcji peroksydazy wg.[23].

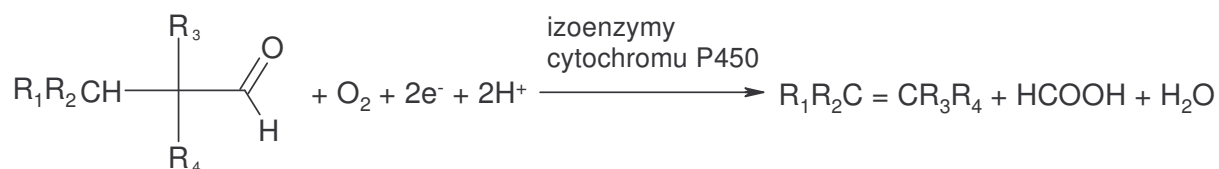
Takie utleniające łączenie fenoli przypomina reakcje katalizowane zwykle przez peroksydazy. Peroksydazy należą do hemoprotein. Spełniają one wiele funkcji degradacyjnych i biosyntetycznych np. usuwanie ciasteczki nadtlenu wodoru, utlenianie toksycznych rodników, biosynteza i degradacja lignin, do których wymagają nadtlenu jako utleniaczy.

Cykle katalityczne peroksydazy i białek cytochromu P450 zachodzą w obecności podobnych wysokowalencyjnych stanów atomu żelaza. Główna różnica między tymi dwiema hemoproteinami polega na tym, że w przypadku peroksydazy brak jest bezpośredniego dostępu substratu do kompleksu żelaza z tlenem. Tak, więc, utleniające połączenie fenoli zachodzi na zewnątrz hemowego miejsca aktywnego w peroksydazach, podczas gdy w przypadku izoenzymów cytochromu P450 zachodzi wewnątrz miejsca aktywnego. Peroksydaza może przyjąć elektron tylko na obrzeżach hemu. Nadtlenek wodoru ma dostęp do atomu żelaza w cząsteczce porfiryny, ale zawada przestrzenna chroni substrat przed bezpośrednim przyłączeniem atomu tlenu [77].

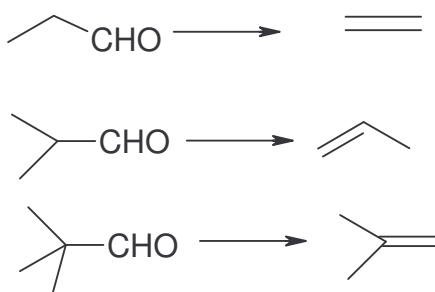
W opisanych reakcjach izoenzymy cytochromu P450 zachowują się jak enzym podobny do peroksydazy, ale zużywają do utlenienia substratu  $O_2$  i  $NADP(H)$ , zamiast  $H_2O_2$ , jak w przypadku peroksydaz.

### ◆ Utleniająca deformylacja aldehydów.

Kilka izoenzymów cytochromu P450 jest zaangażowanych w reakcje utleniającej deformylacji z utworzeniem podwójnego wiązania przyległego do atomu węgla związanego z grupą CHO (rys. 28). Reakcja ta jest dosyć powszechna i zachodzi na przykład w jednym z etapów biosyntezy cholesterolu i estronu.



Rys. 28. Ogólny schemat reakcji deformylacji aldehydów wg. [78].



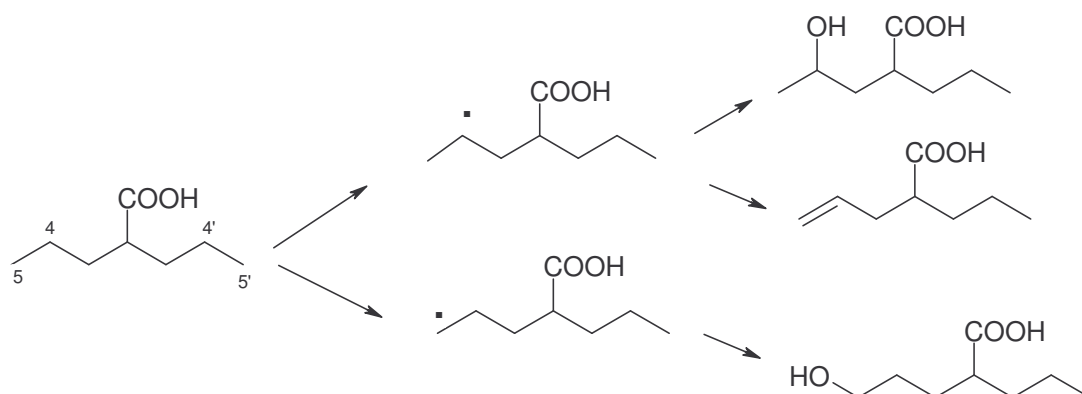
Rys. 29. Reakcja deformylacji aldehydów do związków z podwójnym wiązaniem (olefin) wg. [79].

Zaproponowano kilka mechanizmów dla tego rodzaju reakcji. Ostatnie propozycje zakładają uczestnictwo intermediatu Fe (III)–O–O<sup>-</sup> [23,78]. W przeciwieństwie do silnie elektrofilowego intermediatu (Fe<sup>V</sup>=O)<sup>3+</sup>, Fe (III)–O–O<sup>-</sup> powinno być cząstką nukleofilową zdolną do reagowania z grupą aldehydową z utworzeniem specyficznego produktu przejściowego, którego rozpad prowadzi do uwolnienia mrówczanu oraz powstawania alkenu wywodzącego się z substratu.

### ◆ Reakcja dehydrogenacji

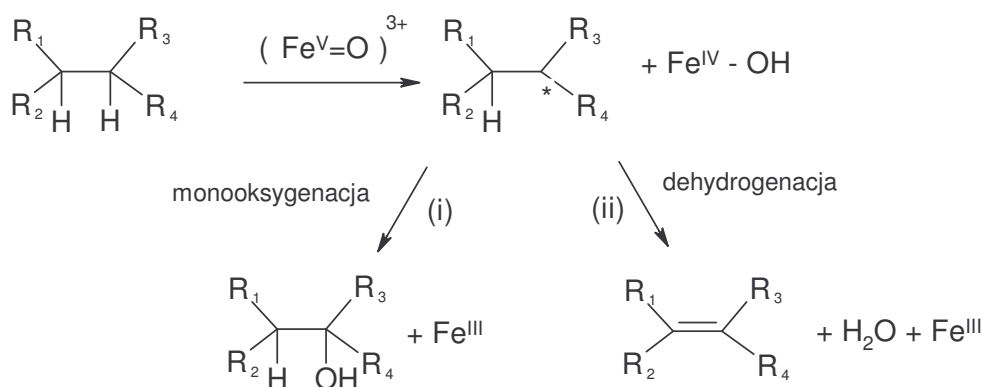
Izoenzymy cytochromu P450 są zdolne do przeprowadzania reakcji dehydrogenacji wiązań CH – CH w alkanach, co prowadzi do powstawania wiązań podwójnych [23]. Reakcja ta zachodzi podczas przemian np. testosteronu, levostatyny, warfaryny i kwasu walproinowego (kwas 2-propylowalerianowy) [80]. Ostatni z wymienionych związków to lek o właściwościach przeciwdrgawkowych, od którego wywodzi się cała grupa farmaceutyków zwanych walproininami, które stosowane są w leczeniu padaczki. Podczas reakcji dehydrogenacji kwasu walproinowego powstają nie

tylko produkty z wiązaniem podwójnym, ale także metabolity z grupą hydroksylową. Obie ścieżki metabolizmu zachodzą jednocześnie, czyli metabolit alkenowy nie wywodzi się z dehydratacji metabolitu hydroksylowanego [70].



Rys. 30. Reakcja dehydrogenacji kwasu 2 - propylowalerianowego wg. [23].

Badania wykazały, że kompleks  $(\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O})^{3+}$  odpowiedzialny jest za dwie współzawodniczące reakcje: dehydrogenację i monooksygenację [70]. W typowych przemianach wolnych rodników wywodzących się z alifatycznego substratu, kompleks  $(\text{Fe}^{\text{IV}} - \text{OH})^{3+}$  może (i) transportować resztę OH na rodnik substratu (monooksygenacja) albo (ii) odrywać atomu wodoru od rodnika substratu (dehydrogenacja) [70] Opisane reakcje przedstawione zostały na rysunku.



Rys. 31. Produkty przejściowe występujące w reakcjach monooksygenacji i dehydrogenacji katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 wg. [53].

#### ◆ Reakcje redukcji

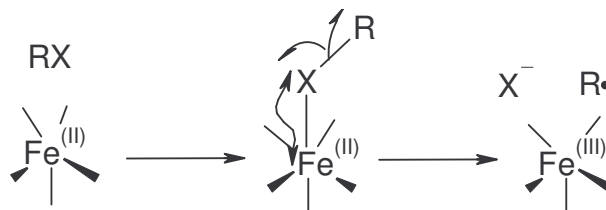
Niektóre izoenzymy cytochromu P450 zdolne są do katalizowania reakcji redukcji różnych związków: pochodnych polihalogenowych, aromatycznych związków nitrowych, związków azowych, czy trzeciorzędowych amin i N – tlenków. Jest to możliwe dzięki obecności jonu żelaza Fe (II) w cyklu katalitycznym. Ta zredukowana forma enzymu P450

jest dobrym przenośnikiem elektronów, które mogą być transportowane albo na  $O_2$  w reakcji monooksygenacji albo też na inne substraty, które mogą przyjmować elektrony.



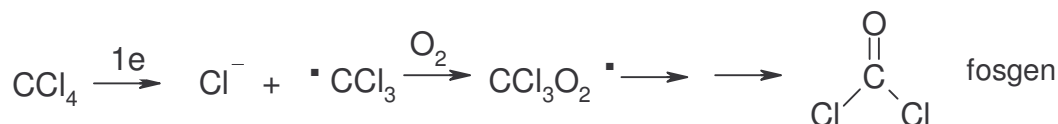
Rys. 32. Schemat reakcji redukcji wg. [23].

Jednym z typów reakcji redukcji katalizowanym przez izoenzymy cytochromu P450 jest reakcja dehalogenacji związków alifatycznych, której mechanizm można przedstawić w postaci następującego schematu:



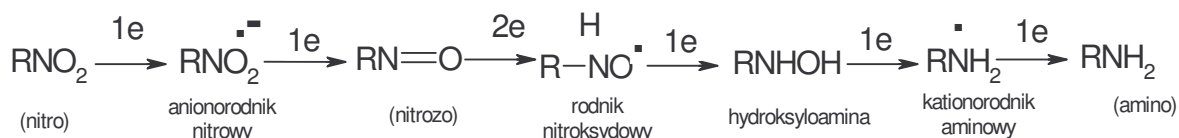
Rys. 33. Schemat reakcji dehalogenacji wg. [23].

Przykładem jest reakcja dehalogenacji czterochlorku węgla. Substrat ten w obecności enzymów ulega przekształceniu do reaktywnej formy rodnika trichlorometylowego, który może reagować z cząsteczką tlenu w wyniku, czego powstaje chlorek karbonylu, czyli znany gaz bojowy, fosgen [23].



Rys. 34. Reakcja dehalogenacji czterochlorku węgla wg. [23].

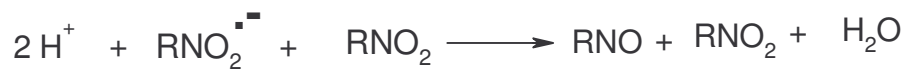
Innym przykładem reakcji redukcji katalizowanej przez izoenzymy cytochromu P450 jest redukcja aromatycznych i alifatycznych związków nitrowych. Atom azotu w grupie nitrowej jest obdarzony cząstkowym ładunkiem dodatnim i wykazuje właściwości elektrofilowe, co powoduje, że łatwo ulega reakcji redukcji. Reakcja ta przebiega według mechanizmu jedno lub dwuelektronowego przedstawionego na rys. 35.



Rys. 35. Mechanizm redukcji grupy nitrowej wg. [81,82].

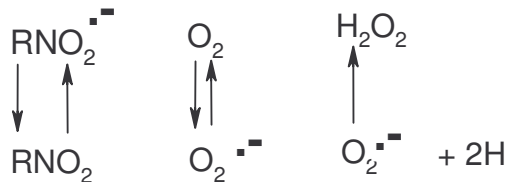
Końcowym produktem redukcji grupy nitrowej jest grupa aminowa, która jest trwała w środowisku reakcyjnym. Wszystkie produkty pośrednie powstające podczas tej reakcji są reaktywne i mogą oddziaływać z makromolekułami komórkowymi tj. z DNA czy białkami, powodując efekty toksyczne, kancerogenne i mutagenne [83]. Szczególną grupą są powstające w tej reakcji produkty rodnikowe: anionorodnik nitrowy ( $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ ), rodnik nitroksydowy ( $\text{RHNO}^{\cdot}$ ), kationorodnik aminowy ( $\text{RNH}_2^{\cdot+}$ ) [84,85].

Za toksyczne działanie anionorodników nitrowych odpowiedzialne są dwie reakcje chemiczne [84]. Pierwszą z nich jest reakcja dysproporcjonowania, która zachodzi według poniższego schematu:



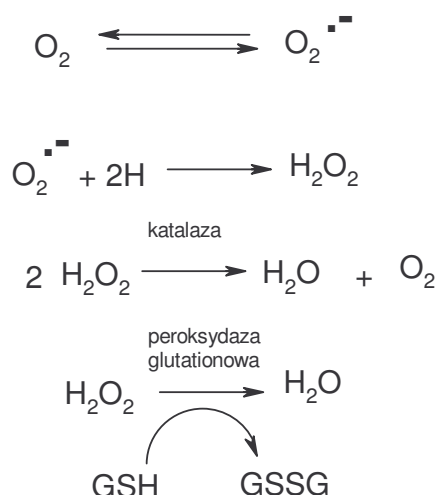
Rys. 36. Reakcja dysproporcjonowania anionorodnika wg. [84]

Jest to reakcja detoksykacji anionorodnika, w wyniku której powstaje reaktywna pochodna nitrozowa. Drugą ważną z biologicznego punktu widzenia reakcją anionorodnika jest jego reakcja utleniania w obecności cząsteczki tlenu prowadząca do powstania rodnika ponadtlenkowego (rys. 37).



Rys. 37. Reakcja utleniania anionorodnika wg.[86].

Selektywne działanie związków nitrowych w stosunku do komórek w stanie niedotlenienia np. komórek nowotworowych wynika właśnie z faktu, że reaktywne produkty powstają w warunkach redukcyjnych, podczas gdy w warunkach tlenowych odtwarzana jest cząsteczka nitrozwiązku [87]. W reakcji tej powstaje także jon ponadtlenkowy, który ulega przemianie do nadtlenku wodoru podczas reakcji dysmutacji. Cząsteczka nadtlenku wodoru może zostać przekształcona do bardzo reaktywnej cząsteczki rodnika hydroksylowego ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) lub usunięta z komórki przez dwa enzymy katalazę lub peroksydazę [88], co przedstawia poniższy rys. 38.



Rys. 38. Przemiany jonu ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru wg. [88,89]

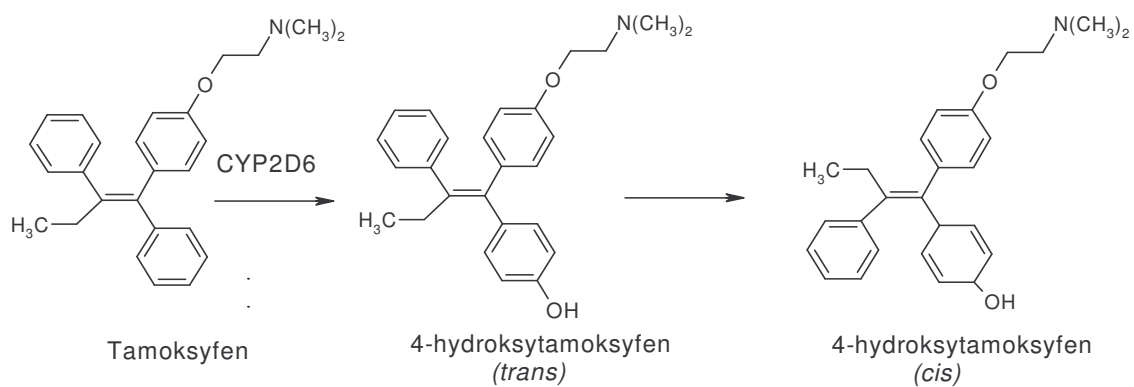
Za biologiczne działanie związków nitrowych odpowiedzialne są rodnikowe i nierodnikowe produkty przejściowe powstające podczas redukcji grupy nitrowej lub produkty redukcji cząsteczki tlenu powstające m.in. w obecności izoenzymów cytochromu P450. Aromatyczne związki nitrowe mają szerokie zastosowanie kliniczne, jako leki przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, radiouczulające i przeciwnowotworowe.

### 3.5.3 Nietypowe reakcje izoenzymów cytochromu P450

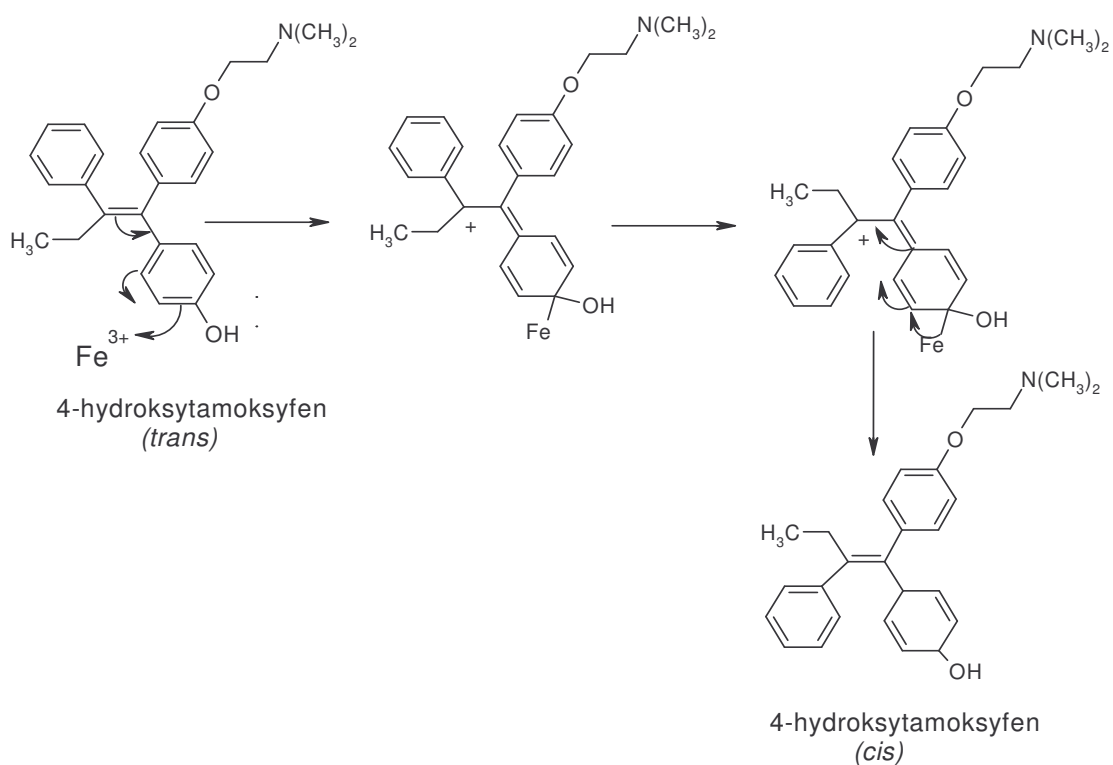
Rodzina izoenzymów cytochromu P450 wykazująca szeroką specyficzność substratową oprócz prostych reakcji utleniania i redukcji katalizuje także szereg innych, bardziej nietypowych przemian, do których należą: reakcje izomeryzacji, dimeryzacji, tworzenia, sprzęgania i zmiany wielkości pierścieni, a także np. migracji utlenionego pierścienia aromatycznego [23,29,37]. Wymienione powyżej przykłady to tylko niektóre z szerokiej gamy reakcji, w jakich bierze udział liczna rodzina białek cytochromu P450.

#### ◆ Reakcja izomeryzacji

W warunkach fizjologicznych zachodzi reakcja izomeryzacji prostaglandyny  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) do prostacykliny ( $\text{PGI}_2$ ) i tromboksanu ( $\text{TXA}_2$ ). Proces ten katalizują dwa izoenzymy cytochromu P450: CYP8A1 (syntetaza prostacyklinowa) i CYP5A1 (syntetaza tromboksanowa), bez zużycia kofaktorów: NADPH lub NADH [23]. Innym przykładem jest reakcja hydroksylacji, jakiej ulega lek przeciwnowotworowy Tamoksyfen\* (tamoxifenum) przedstawiona na rys. 39 i 40, w wyniku której powstają dwa izomery: *cis* i *trans* hydroksytamoksyfen.



Rys. 39. Reakcja hydroksylacji Tamoxifenu\* wg. [70].

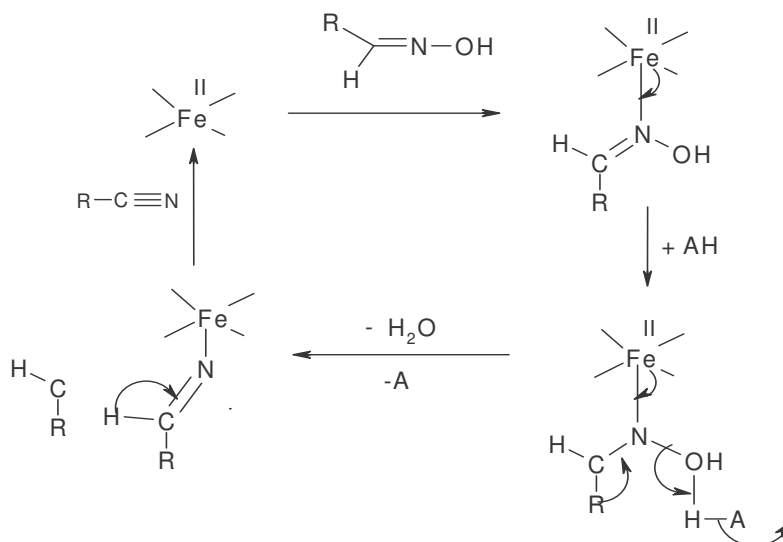


Rys. 40. Mechanizm reakcji izomeryzacji Tamoxifenu\* wg. [70].

#### ◆ Reakcja dehydratacji

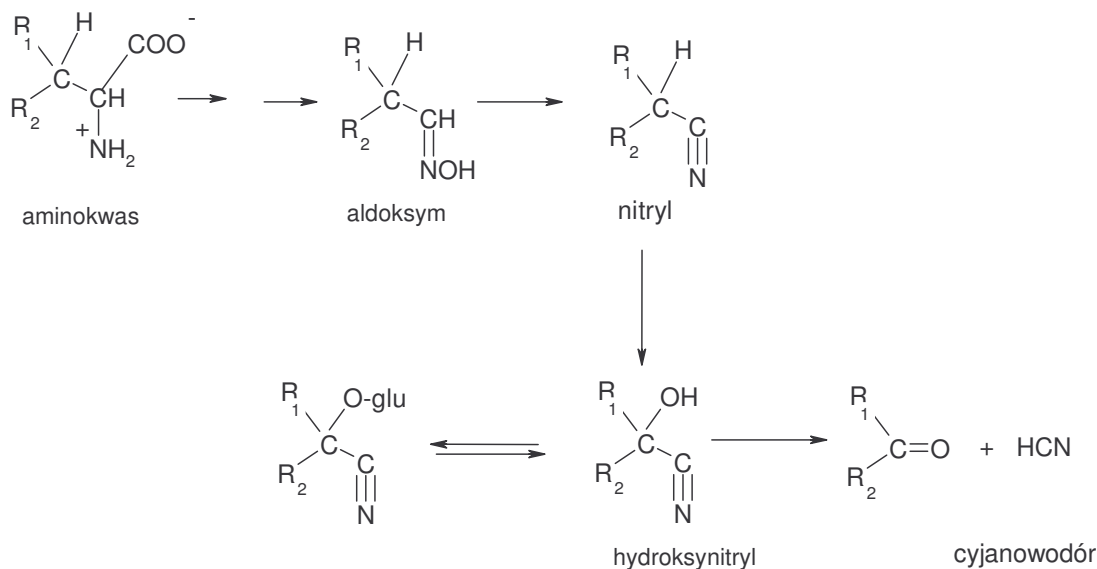
Reakcja dehydratacji aldoksymów do nityli zachodzi według schematu przedstawionego na rys.41





Rys. 41. Mechanizm reakcji dehydratacji aldoksymów do nitryli wg. [70].

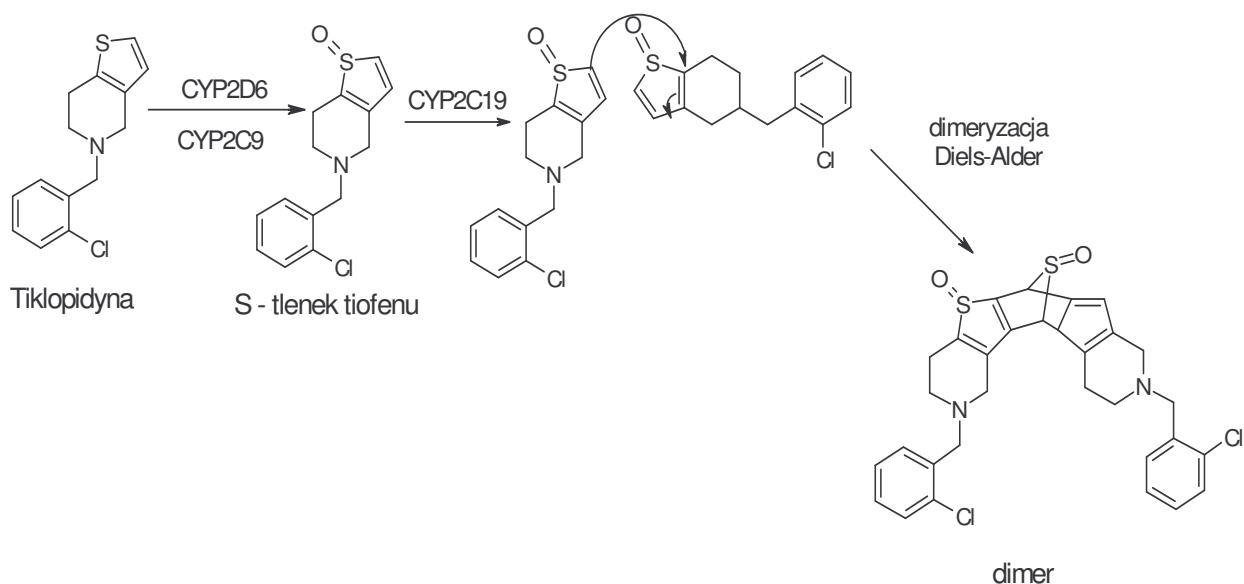
Reakcja ta zachodzi m.in. podczas biosyntezy cyjanoglikozydu diurny w roślinie Sorgo zwyczajne (*Sorghum bicolor*) (rys.42) [70,90]. Związek ten może być przekształcany do toksycznego cyjanowodoru (kwasu pruskiego), który wydziela ta roślina.



Rys. 42. Biosynteza cyjanoglikozydu diurny w *Sorghum bicolor* wg. [90,91].

#### ◆ Reakcja dimeryzacji

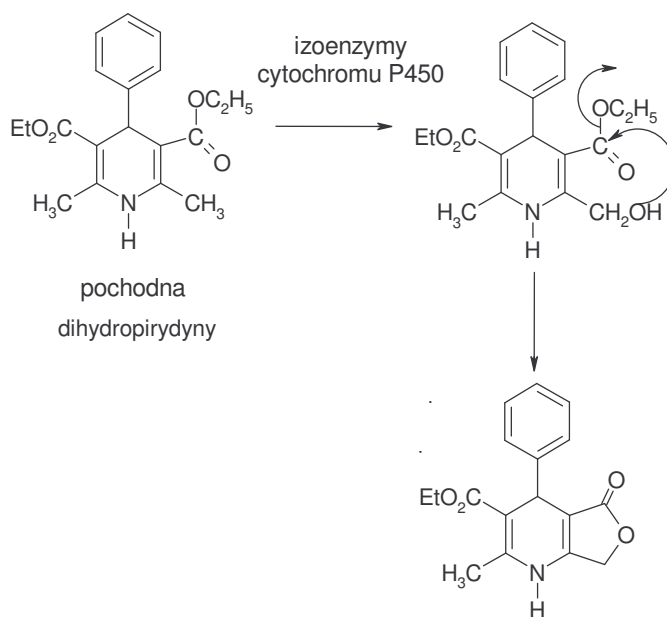
Reakcja dimeryzacji często zachodzi podczas przemian ksenobiotyków. Przykładem jest reakcja dimeryzacji dwóch cząsteczek S - tlenku tiofenu, które powstają w reakcji utlenienia leku hamującego agregację płytek krwi, Tiklopidyny\* (ticlopidinum), co przedstawia rys. 43. Podobnym przemianom ulega pochodna S - tlenku 2-fenylotiofenu [29,37].



Rys. 43. Reakcja dimeryzacji dwóch cząsteczek S - tlenku tiofenu\* wg. [70].

#### ◆ Reakcje prowadzące do utworzenia pierścienia

Izoenzymy cytochromu P450 katalizują reakcję cyklizacji, w wyniku której powstaje stabilna chemicznie cząsteczka laktonu. Przykładem tej reakcji jest przedstawiona na rys. 44 reakcja utleniania pochodnej dihydropirydyny. W pierwszym etapie transformacji substratu zachodzi hydroksylacja grupy metylowej do metanolu, który następnie może oddziaływać z podstawnikiem estrowym tworząc dodatkowy, stabilny chemicznie pierścień pięciocłonowy [23,37].

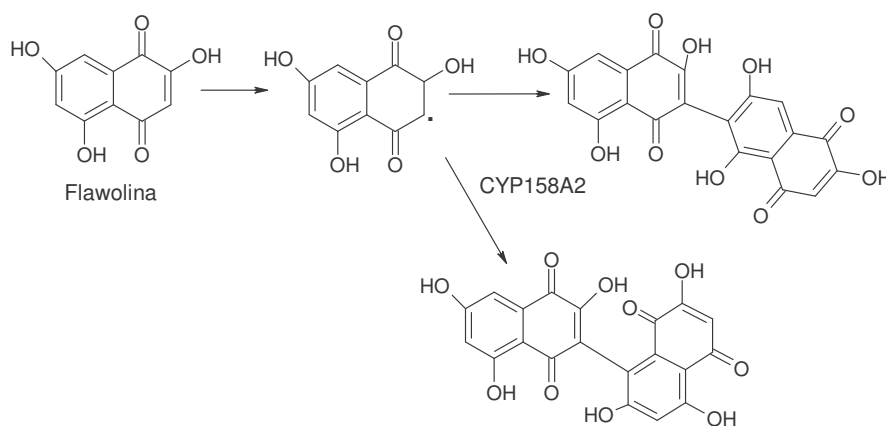


Rys. 44. Reakcja cyklizacji pochodnej dihydropirydyny z utworzeniem laktonu wg. [23].

Inne przykłady reakcji prowadzące do utworzenia pierścienia to: metabolizm Kapsaicyny\* (Capsaicinum) katalizowany przez CYP2C9, CYP2C19 i CYP2E1 lub CYP2C8 oraz biotransformacja Pronamidu [37].

#### ◆ Reakcje sprzęgania pierścieni

Przykładem takiej reakcji jest transformacja dwóch monomerycznych form Flawoliny\* (flavoline) do dimeru, katalizowana przez izoenzym CYP158A2 występujący u promieniowca *Streptomyces coelicolor*. Produkt powstający w tej reakcji może występować w dwóch konformacjach, co przedstawia rys. 45. Proces sprzęgania pierścieni zachodzi także podczas biosyntezy morfiny czy vankomycyny [37]. W ostatniej reakcji bierze udział CYP165B2 i CYP165C1.



Rys. 45. Proponowany mechanizm tworzenia dimeru Flawoliny przez CYP158A2 u *Streptomyces coelicolor* wg. [23].

Opisane powyżej reakcje to tylko wybrane przykłady przemian, w których uczestniczy ta wszechstronna rodzina enzymów cytochromu P450. Duża różnorodność reakcji katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 związana jest prawdopodobnie ze zdolnością atomu żelaza będącego w centrum katalitycznym do występowania w różnych stanach utlenienia.

Różnorodność możliwych produktów powstających w reakcjach katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 podkreśla zasadniczą rolę tego systemu białkowego, w metabolizowaniu leków, ksenobiotyków i związków endogennych o bardzo zróżnicowanej strukturze chemicznej.

### 3.6 Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie ksenobiotyków

Ludzkie enzymy cytochromu P450 to liczna rodzina białek, które podzielono na 18 rodzin i 43 podrodziny [34]. W zależności od rodzaju substratu, którego przemianę katalizują ludzkie enzymy P450 można podzielić na 6 różnych grup przedstawionych w tabeli 1.

Tab. 1. Klasyfikacja ludzkich izoenzymów cytochromu P450 w zależności od rodzaju substratów metabolizowanych przez te białka wg. [65].

Sterole	Ksenobiotyki	Kwasy tłuszczowe	Eikozanoidy	Witaminy	Nieznane substraty
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1*
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1*
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1*
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

\*- niedawno poznana funkcja enzymu

Enzymy zaznaczone w tabeli z gwiazdką nie zostały jeszcze szeroko poznane. Izoenzym CYP2S1 występuje głównie w komórkach układu oddechowego i pokarmowego i uczestniczy w metabolizmie węglowodorów aromatycznych. Izoenzym CYP2U1 znaleziono w płucach, trzustce, wątrobie, śledzionie, mięśniach, sercu i w mózgu. Metabolizuje m.in. kwas arachidonowy i inne kwasy tłuszczowe. Ponadto może odgrywać istotną rolę w regulacji przepływu krwi przez mózg. Natomiast CYP2W1 jest izoenzymem występującym w komórkach nowotworowych. Podobnie jak CYP2S1 bierze udział w aktywacji prokancerogennych policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wysoki poziom ekspresji tego białka stwierdzono w nowotworowych komórkach wątroby, HepG2 [93].

Ksenobiotyki to substancje obce dla organizmu, do których należą: leki, kancerogeny chemiczne oraz różne obecne w otaczającym nas środowisku związki chemiczne np. polichlorowane bifenyle, pestycydy dioksyny, insektycydy. Wykazują one często właściwości lipofilowe i ulegają przemianom w obecności enzymów metabolizujących, występujących w komórkach.

Metabolizm ksenobiotyków zachodzi w dwóch fazach. Do I fazy przemian zaliczane są głównie: reakcje utleniania, redukcji i hydroksylacji, podczas których w cząsteczce ksenobiotyku modyfikowane są obecne już grupy funkcyjne lub powstają nowe. W kolejnym etapie produkty tych reakcji tworzą koniugaty ze związkami endogennymi, tj: glutationem, glukuronianami lub siarczanami, dzięki czemu stają się bardziej polarne i lepiej rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich wydalanie z organizmu. Te procesy łączenia się aktywowanego w reakcjach I fazy ksenobiotyku z substancjami endogennymi noszą nazwę reakcji II fazy lub reakcji koniugacji. Wiele enzymów cytochromu P450 wprowadza grupy hydroksylowe w pierwszej fazie metabolizmu leków. Grupy te z jednej strony zwiększają polarność związku ułatwiając jego wydalanie z moczem, z drugiej strony służą jako miejsca dalszych modyfikacji w drugiej fazie metabolizmu [62].

Należy jednak podkreślić, że reakcje metabolizmu ksenobiotyków to nie tylko reakcje prowadzące do wydalania go z ustroju. To przede wszystkim przemiany prowadzące do inaktywacji i aktywacji leków [94]. To ostatnie zjawisko odgrywa istotną rolę w przypadku proleków, czyli związków, które występują w środowisku w formie latentnej. W wyniku przemian enzymatycznych katalizowanych przez enzymy proleki ulegają przekształceniu do formy aktywnej, co pozwala im oddziaływać z celem molekularnym w komórce [93]. Przykładem proleków są związki przeciwnowotworowe z grupy Mitomycyny C, nitrofuranu, nitroimidazolu, a także badane przeze mnie pochodne 1-nitroakrydyny [1,12]. Poznanie procesu bioaktywacji leków przyczyniło się do rozwinięcia jednej z gałęzi terapii przeciwnowotworowej, opartej na bioredukcji proleków w warunkach beztlenowych, jakie panują w komórkach nowotworowych, co zapewnia selektywne działanie tych leków [63,81]. Kluczowym organem, bogatym w enzymy, w którym zachodzi metabolizm ksenobiotyków jest wątroba. Badania dowiodły, że ok. 95% wszystkich farmaceutyków metabolizowana jest przez izoenzymy cytochromu P450 [95].

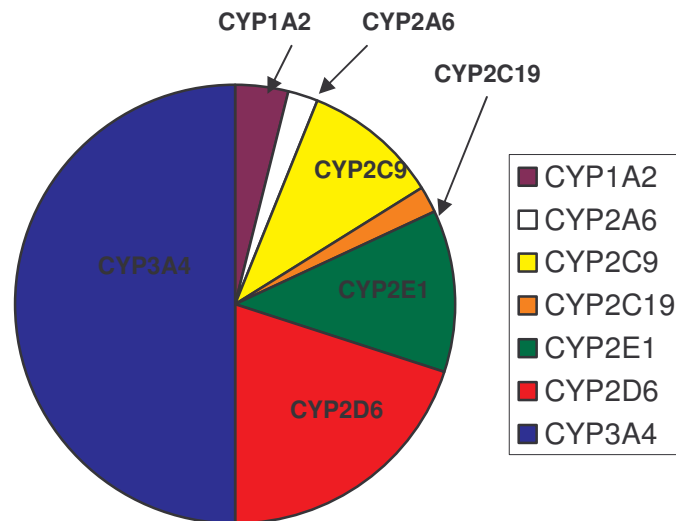
Spośród olbrzymiej liczby izoenzymów cytochromu P450 można wyróżnić kilkanaście enzymów, które są zaangażowane głównie w metabolizm wielu leków i ksenobiotyków [95]. Najważniejsze z nich to:

CYP 1A2

CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2E1

CYP 3A4/5

Badania wykazały, że spośród wymienionych izoenzymów najbardziej aktywny jest izoenzym CYP3A4, który metabolizuje ok. 50 % wszystkich znanych leków [95]. Pozostała część leków jest metabolizowana głównie przez izoenzymy należące do rodziny CYP2 i są to: CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 i 2E1 (rys.46).

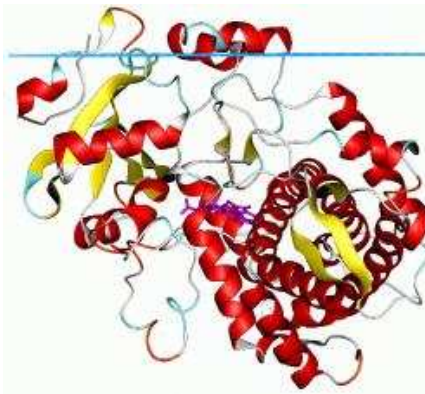


Rys. 46. Udział izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków wg. [95].

### CYP3A4

Izoenzym CYP3A4 (rys. 47) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych białek cytochromu P450 w komórkach ludzkich. Stanowi on ok. 30-40% wszystkich izoenzymów obecnych w wątrobie i jelicie cienkim [96]. Ponadto występuje także w niektórych komórkach nowotworowych tj. nowotworowych komórkach nerki czy wątroby [97].

Gen kodujący ten enzym jest zlokalizowany na chromosomie 7 q22.1 [96,98].



Rys. 47. Struktura przestrzenna izoenzymu CYP3A4 wg. [46].

Substraty izoenzymu CYP3A4 są zróżnicowane pod względem strukturalnym, ale w większości są to związki o właściwościach lipofilowych. Należą do nich nie tylko związki endogenne tj: testosteron, kortyzol, progesteron, androstenodiol i estradiol, ale także szereg leków i ksenobiotyków np. antybiotyki: Erytromycyna\* (erythromycinum), Cyklosporyna\* (ciclosporinum) leki psychotropowe: Midazolam\* (midazolamum), Triazolam\* (triazolamum), leki stosowane w chorobach serca: Nifedipina\* (nifedipine), Diltiazem\* (diltiazemum), a także leki przeciwnowotworowe: Cyklofosfamid\*

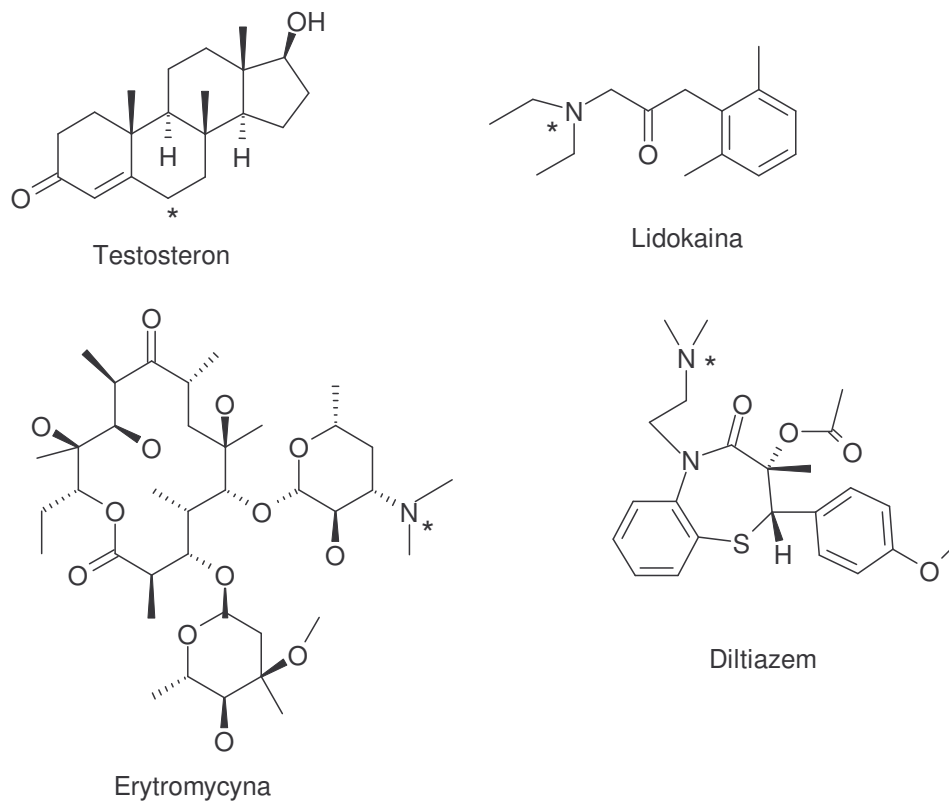
(cyclophosphamidum), Ifosfamid\* (Ifosfamidum), Etopozyd\* (etoposidum), Metotreksat\* (methotrexatum), Imatinib\* (imatinib) i Vinblastyna\* (vinblastinum), Taksol\* (taxol), Tamoksyfen\* (tamoxifenum) i wiele innych leków [96,98,99,100].

Izoenzym CYP3A4 katalizuje głównie reakcje hydroksylacji, N-dealkilacji [38,96,98]. Reakcji hydroksylacji ulegają głównie alifatyczne fragmenty cząsteczek, a także ugrupowania benzytowe, które występują m.in. w endogennych steroidach tj. w progesteronie i testosteronie, czy też w innych lekach np. Budezonid\* (budesonidum), Cyklosporyna\* (ciclosporinum), Salmeterol\* (salmeterolum) i Lowastatyna\* (lovastatinum). Reakcji 4-hydroksylacji ulegają także związki przeciwnowotworowe tj. Cyklofosfamid\* (cyclophosphamidum), Ifosfamid\* (Ifosfamidum). Natomiast przemiany polegające na N-dealkilacji zachodzą w przypadku następujących leków: Erytromycyna\* (erythromycinum), Lidokaina\* (lidocainum), Diltiazem\* (diltiazemum), Terfenadyna\* (terfenadinum), Imatinib\*(imatinib) i Tamoksyfen\* (tamoxifenum) [38,101].

Uważa się, iż oddziaływania lipofilowe enzym - substrat w centrum aktywnym enzymu są siłą napędową wiązania substratu z izoenzymem CYP3A4. Reakcja ta wymaga usunięcia z miejsca aktywnego cząsteczek wody, co daje energię potrzebną do zmiany stanu spinowego kompleksu  $Fe^{IV}=O$  w centrum porfiryńowym.

Cząsteczki substratów izoenzymu CYP3A4 są lipofilowe. Mechanizm reakcji przemiany tych związków został poznany na podstawie bakteryjnego cytochromu P450<sub>BM-3</sub> (CYP102). W przypadku tego izoenzymu substratem są kwasy tłuszczowe przyjmujące w roztworze wodnym strukturę globularną. Podczas przemieszczania się w lipofilowym kanale prowadzącym do centrum aktywnego CYP102 kwasy tłuszczowe rozwijają się i przyjmują strukturę liniową, w której lipofilowa głowa skierowana jest w kierunku hemu, a polarny ogon zwrócony jest w stronę rozpuszczalnika. Podobny mechanizm znaleziono w przypadku znanego substratu CYP3A4 – Cyklosporyny, która w środowisku wodnym ukrywa przed enzymem miejsce metabolizmu, a w środowisku aprotycznym (lipofilowym) udostępnia to miejsce i wiąże się z enzymem [38]. Powyższe fakty pozwalają zrozumieć szeroką selektywność CYP3A4. Wiązania oparte głównie na oddziaływaniach hydrofilowych są słabe i bez wiązań jonowych i wodorowych umożliwiają ruch substratu w centrum aktywnym. Dlatego też substrat jest w stanie przyjmować więcej niż jedną orientację w miejscu aktywnym i ewentualny produkt takiej reakcji jest rezultatem oddziaływań między jedną z tych orientacji, a  $(FeO)^{3+}$ . Przykładem takich oddziaływań może być metabolizm Midazolamu\* (midazolamum) przez CYP3A4. W wyniku transformacji tego związku powstają 2 produkty: 4-hydroksymidazolam i 1-hydroksymidazolam. Izoenzym CYP3A4 może przyjmować różne konformacje w zależności od wiązanego substratu. Uważa się, iż powyższa zdolność miejsca aktywnego CYP3A4 do przyjmowania różnych konformacji jest odpowiedzialna za szeroki

zakres specyficzności substratowej tego izoenzymu. Wysoki poziom ekspresji izoenzymu CYP3A4 w kluczowych organach przewodu pokarmowego tj. przełyk, dwunastnica, jelito cienkie i grube, a także wątroba i nerki wpływa istotnie na biodostępność stosowanych leków i skuteczność leczenia [96].



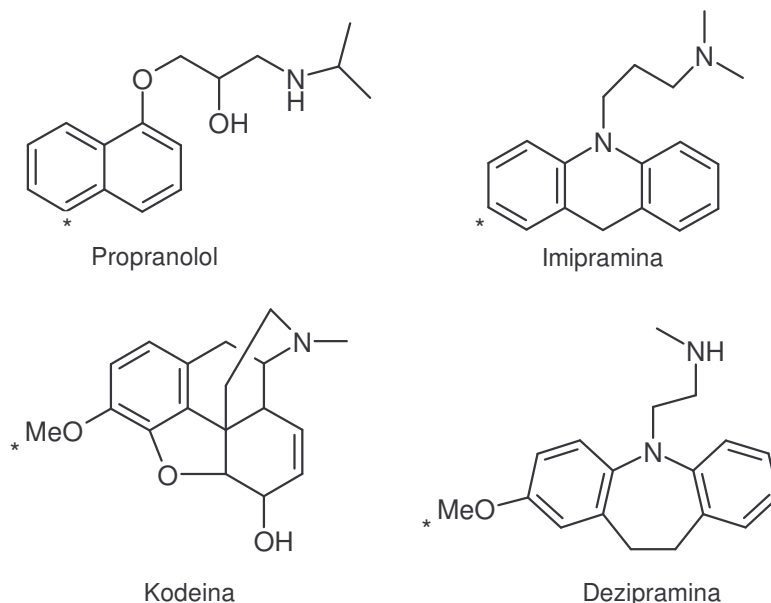
\*miejsce oddziaływania z enzymem

Rys. 48. Struktury chemiczne substratów izoenzymu CYP3A4 wg. [96].

## CYP2D6

Gen kodujący izoenzym 2D6 zlokalizowany jest na chromosomie 22q13.1 [98]. Chociaż enzym ten stanowi zaledwie 2% izoenzymów cytochromu P450 zgromadzonych w komórkach wątroby, to jego udział w metabolizmie leków jest znaczący i wynosi ok. 30% [65,95] Izoenzym CYP2D6 katalizuje przemiany: leków antydepresyjnych, antyarytmicznych, tzw.  $\beta$ -blokerów, a także inhibitorów serotoniny [38,100,101]. Struktury chemiczne niektórych z nich przedstawiłam na rys. 49.

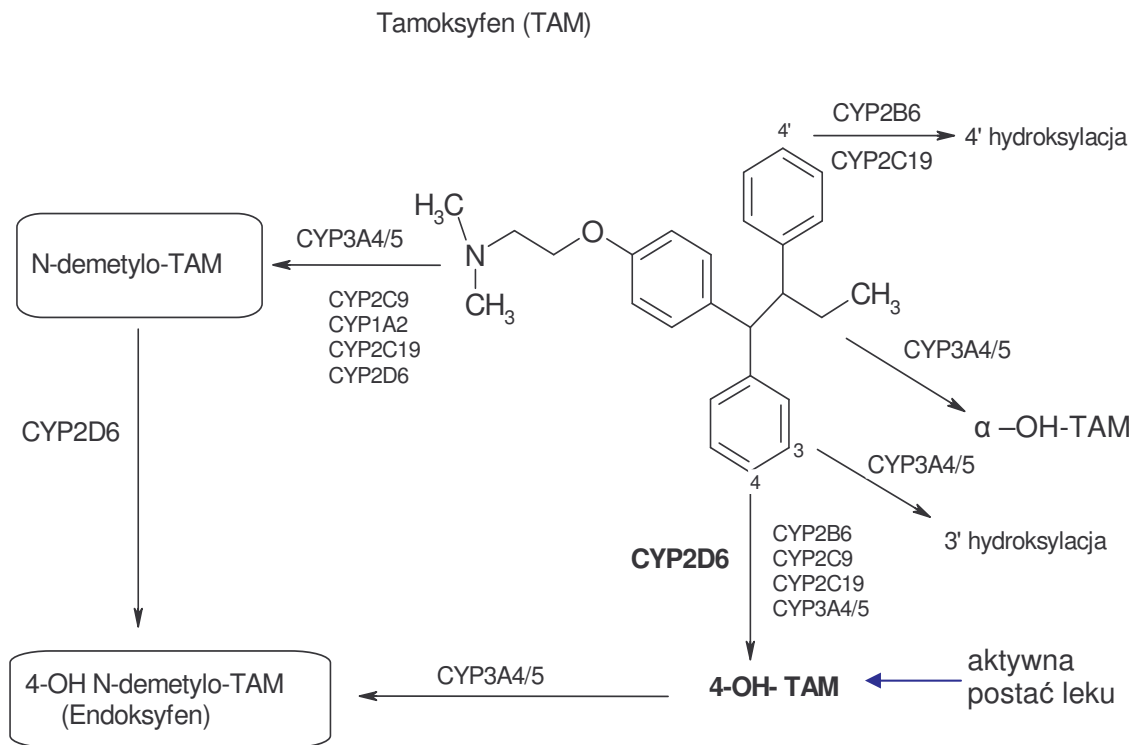




\* miejsce oddziaływania z enzymem.

Rys. 49. Wybrane substraty izoenzymu CYP2D6 wg. [38].

Substraty te zawierają zasadowy atom azotu ( $pK_a > 8$ ), który występuje w fizjologicznym pH w postaci sprotonowanej [38]. Głównym typem oddziaływań odpowiedzialnym za specyficzność substratową tego izoenzymu jest oddziaływanie par jonowych pomiędzy obdarzonym ładunkiem dodatnim atomem azotu, a cząsteczką kwasu asparaginowego. Ponieważ większość substratów izoformy 2D6 posiada właściwości zasadowe, wszelkie różnice obserwowane w powinowactwie substratu do enzymu są przypisywane oddziaływaniom hydrofobowym lub typu  $\pi - \pi$ . Hydroksylacja w tych związkach następuje w pierścieniu aromatycznym lub w związanym z nim krótkim łańcuchu bocznym. Chociaż wykazano, że CYP2D6 ma niewielki udział w przemianach leków przeciwnowotworowych to znacząco wpływa na efektywność leczenia nowotworu piersi za pomocą Tamoksyfenu\* (tamoxifenum). 90% tego leku przeciwnowotworowego jest metabolizowana przez CYP3A4 do nieaktywnej formy, jaką jest N-demetylotamoksyfen. 10% Tamoksyfenu\* (tamoxifenum) jest metabolizowana przez CYP2D6 do aktywnego produktu, 4-hydroksytamoksyfenu. Izoenzym CYP2D6 przekształca także nieaktywną pochodną, N-demetylotamoksyfen (rys. 50) do 4-hydroksy-N-demetylotamoksyfenu o działaniu antyestrogennym, który jest aktywny w stosunku do komórek nowotworowych [98].

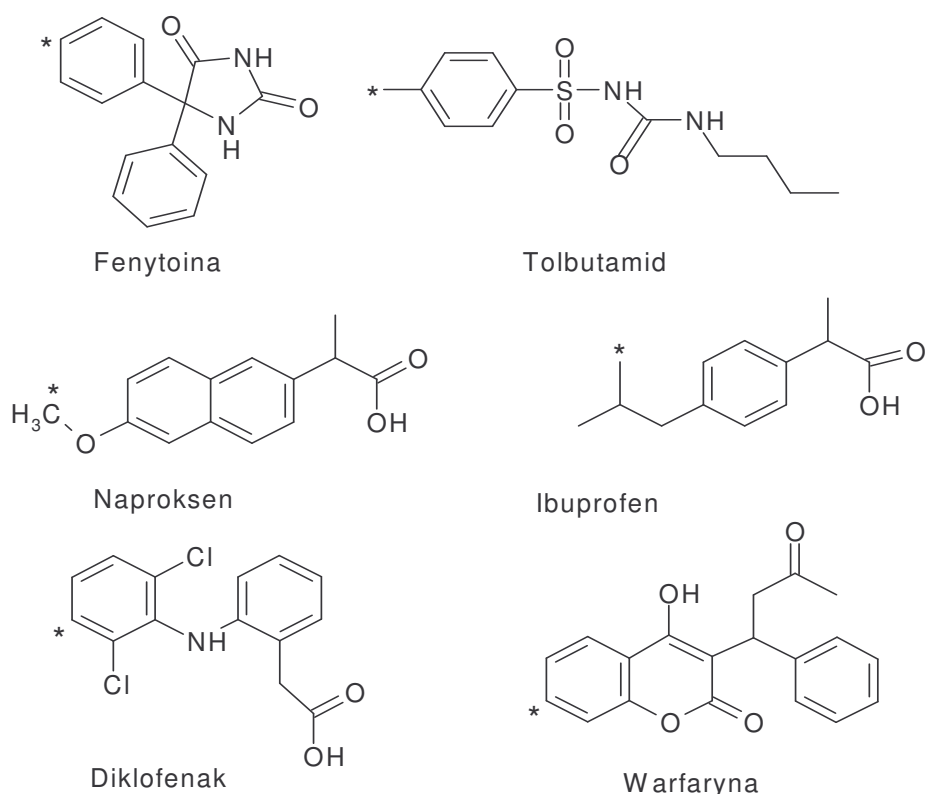


Rys. 50. Przemiany enzymatyczne Tamoksyfenu\* wg. [102].

### CYP2C9 i CYP2C19.

Izoenzymy CYP2C9 i CYP2C19 występują głównie w komórkach wątroby i odpowiedzialne są za metabolizm ok. 15% stosowanych leków. Geny kodujące te izoenzymy zlokalizowane są na chromosomie 10q24 [98].

Substraty tego izoenzymu CYP2C9 to przede wszystkim: niesterydowe leki przeciwzapalne, m.in. Tolbutamid\* (tolbutamidum), Fenytoina\* (phenytoinum), Ibuprofen\* (ibuprofenum), Naproksen\* (naproxenum), czy Diklofenak\* (diclofenacum) oraz przeciwzakrzepowa Warfaryna\* (warfarinum), których struktury przedstawiłam na rys.51 [38].

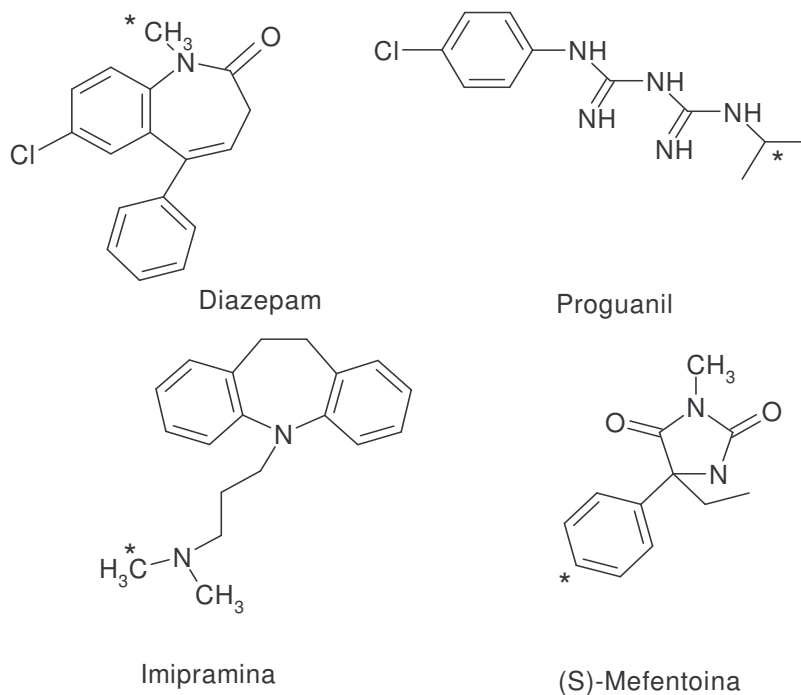


\* miejsce oddziaływania z enzymem

Rys. 51. Struktury chemiczne charakterystycznych substratów izoenzymu CYP2C9 wg.[38].

Analizując strukturę substratów CYP2C9 można powiedzieć, iż mają one zróżnicowaną budowę chemiczną. Wszystkie zawierają pierścień aromatyczny, który jest słabiej skondensowany, niż w substratach CYP1A2. Są to głównie związki o charakterze kwasowym, co powoduje, że przyjmują w pH fizjologicznym formę zjonizowaną. Cząsteczki tych leków są amfipatyczne – zawierają region lipofilowy w miejscu hydroksylacji i obszar hydrofilowy zlokalizowany wokół powstającego wiązania wodorowego. Utlenianie substratu następuje w pierścieniu aromatycznym lub też w krótkim łańcuchu alkilowym [101].

Natomiast CYP2C19 podobnie, jak CYP2D6 metabolizuje leki antydepresyjne np. Diazepam\* (diazepamum) Proguanil\* (proguanile) i Imipraminę\* (imipraminum) oraz leki przeciwnowotworowe Cylofosfamid\* (cyclophosphamidum), Ifosfamid\* (ifosfamidum) Imatinib\* (imatinib) i Tamoksyfen\* (tamoxifenum) [98]. Związki te nie wykazują podobieństw strukturalnych ani podobieństw właściwości fizykochemicznych. Prawdopodobnie CYP2C19 wiąże substraty będące potencjalnymi donorami atomu wodoru w wiązaniach wodorowych. W przeciwieństwie do poprzednio omawianych izoenzymów, CYP2C19 może wiązać związki słabo zasadowe np. Diazepam\* (diazepamum) ( $pK_a=3,4$ ), lub silnie zasadowe – Imipramina\* (imipraminum) ( $pK_a=9,5$ ) albo typu kwasowego np. Warfaryna\* (warfarinum) ( $pK_a=5$ ) [38].

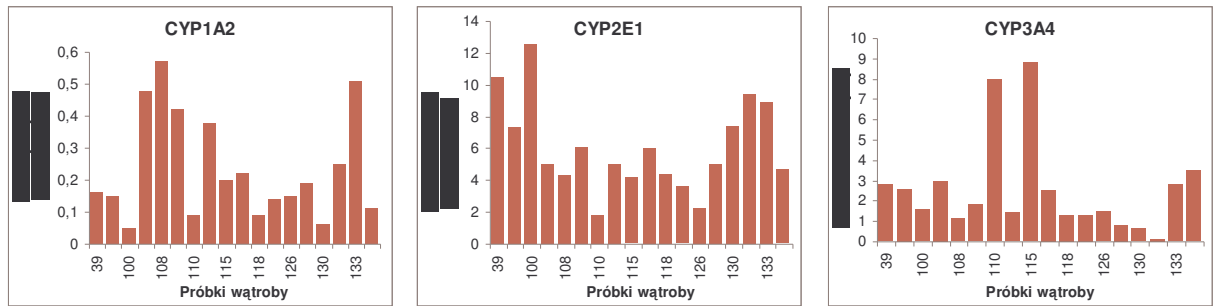


\* miejsce oddziaływania z enzymem

Rys. 52. Struktury charakterystycznych substratów dla CYP2C19 wg. [38].

### 3.6.1 Polimorfizm enzymów i jego znaczenie w terapii

Metabolizm leków katalizowany przez szereg różnych enzymów jest cechą indywidualną każdego człowieka. Wśród czynników odpowiedzialnych za tę różnorodność są m.in. dieta, czynniki środowiskowe, stan zdrowotny, a także budowa genetyczna i związany z nią polimorfizm białek. Polimorfizm jest cechą genomu ludzkiego definiowaną jako różnica w sekwencji DNA występująca w danej populacji ludzi częściej niż 1%. [102,103]. Najczęstszą przyczyną zróżnicowanej budowy DNA są mutacje punktowe polegające na zmianie jednego lub kilku nukleotydów w łańcuchu DNA, co prowadzi do powstania różnych alleli danego genu. Zmiany w strukturze DNA istotnie wpływają na poziom ekspresji białek, ich budowę i funkcje [104]. W konsekwencji leki podawane pacjentom są metabolizowane w każdym przypadku odmiennie i specyficznym [45,47]. Poniżej na rys.53. przedstawiłam zróżnicowany poziom wybranych izoenzymów cytochromu P450 u 18 różnych pacjentów, określony na podstawie metabolizmu charakterystycznych dla tych enzymów substratów.



Rys. 53. Zróżnicowany poziom wybranych izoenzymów cytochromu P450: CYP1A2, CYP2E1 i CYP3A4 w komórkach wątroby 18 dawców wg. [65].

W zależności od zdolności do metabolizowania głównych leków wyróżniono trzy podstawowe typy pacjentów:

1. „przeciętnie metabolizujący” – pacjenci posiadający dwie kopie danego allelu, którzy metabolizują leki zgodnie z przewidywaniami,
2. „słabo metabolizujący” - pacjenci z mutacją w genie, która powoduje zmniejszoną aktywność danego izoenzymu lub jego brak,
3. „intensywnie metabolizujący” - pacjenci posiadający więcej niż dwie kopie danego allelu, co wiąże się z wysoką aktywnością izoenzymu.

U pacjentów wolno metabolizujących stężenie podawanego leku we krwi jest wysokie i poziom ten utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Stężenie metabolitu jest w tym przypadku niskie. W sytuacji, gdy związkiem aktywnym jest metabolit podawanego leku, aby uzyskać pożądaną efekt terapeutyczny, należy pacjentom podawać wyższe dawki leku. Natomiast, jeżeli podawany lek nie wymaga aktywacji dla swej aktywności biologicznej, to jego wysokie stężenie może powodować nasilenie negatywnych skutków ubocznych. W przypadku osób z szybkim metabolizmem niskie dawki leków przynoszą pożądaną efekt, gdyż biotransformacja leku zachodzi w szybkim tempie. Znając, zatem profil polimorficzny pacjenta, możemy dostosowywać odpowiednią dla niego dawkę, unikając efektów przedawkowania, czy zbyt niskiej, a przez to nieskutecznej dawki leku.

Prowadzone na szeroką skalę badania izoenzymów cytochromu P450 wykazały, że wszystkie enzymy kluczowe dla biotransformacji leków tj. CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6, CYP2E1, a ostatnio także CYP3A4 występują w kilku odmianach polimorficznych, co przedstawia poniższa tabela [103].

Tab. 2. Polimorfizm wybranych ludzkich izoenzymów cytochromu P450 wg. [103]

Izoenzym cytochromu P450	wersje genów	Funkcje	Częstość występowania w populacji ludzkiej	
			rasa biała [%]	rasa orientalna [%]
CYP2A6	CYP2A6*2	Nieaktywny	1-3	0
	CYP2A6*3	nieznana	0	0
	CYP2A6*4	nieznana	1	15
	CYP2A6*5	defekt enzymu	0	1
CYP2C9	CYP2C9*2	zmniejszone powinowactwo do reduktazy cytochromu P450	0-13	0
	CYP2C9*3	zmieniona specyficzność substratowa	7-9	2-3
CYP2C19	CYP2C19*2	nieaktywny enzym	13	23-32
	CYP2C19*3	nieaktywny enzym	0	6-10
CYP2D6	CYP2D6*2xn	zwiększona aktywność	1-5	0-2
	CYP2D6*4	nieaktywny enzym	12-21	1
	CYP2D6*5	brak enzymu	4-6	6
	CYP2D6*10	niestabilny enzym	1-2	50
	CYP2D6*17	zmniejszone powinowactwo do substratu	0	nie określona
CYP2E1	CYP2E1*2	zmniejszony poziom ekspresji	0	0
	CYP2E1*3	efekt nieznan	<1	1
	CYP2E1*4	efekt nieznan	<1	nie określona
CYP3A4	CYP3A4*2	wyższe $K_m$ dla substratu	3	0
	CYP3A4*3	efekt nieznan	0	<1

Spośród wymienionych powyżej izoenzymów cytochromu P450, najlepiej poznany jest polimorfizm izoenzymu CYP2D6. 20% ludzi rasy białej i ok. 1% pozostałej części populacji ludzkiej posiada nieaktywny izoenzym CYP2D6. Natomiast blisko 6% ludzi pozbawionych jest tego enzymu. Większość z tych ludzi zaliczana jest do pacjentów słabo metabolizujących leki [63,103]. Pacjenci ci są bardziej wrażliwi na podawane im leki gdyż nie uległy one metabolizmowi deaktywacyjnemu przez CYP2D6 i są znacznie wolniej wydalane z organizmu. W przypadku zaś leków wymagających enzymatycznej aktywacji np. Tramadolu\* (tramadolium) o działaniu przeciwbólowym czy leków o działaniu antyarytmicznym brak izoenzymu CYP2D6 znacznie obniża skuteczność tych leków.

Występowanie polimorficznych odmian izoenzymu CYP2C9 wpływa też na skuteczność działania Warfaryny\* (warfarinum) obniżającej krzepliwość krwi. Izoenzym CYP2C9 katalizuje reakcję 6 i 7-hydroksylacji tego leku. Pacjenci z CYP2C9\*3 bardzo słabo metabolizują Warfarynę, co powoduje, że tylko 10% tego leku zostaje wydalone z organizmu. W przypadku tych pacjentów dawka Warfaryny powinna być ok. 10-16 razy niższa, w przeciwnym razie stwarza zagrożenie krwotoku wewnętrznego [98].

Międzyosobnicze różnice w ekspresji genów enzymów metabolizujących są obecnie intensywnie badane. Wykrywanie i interpretacja zmian pojawiających się w genach poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 pozwoli przewidzieć nie tylko efekt działania leków, ale także ryzyko zachorowania na wiele chorób, w tym także na choroby nowotworowe [45]. Wiadomo bowiem, że wysoki poziom niektórych izoenzymów np. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 i CYP3A5 może zwiększać ryzyko zachorowania i rozwoju nowotworów w organizmie [25]. Wiedza na temat polimorfizmu enzymów stwarza szanse na indywidualne podejście do pacjenta, a zatem skuteczniejszą terapię szczególnie w zakresie chorób nowotworowych [47,105].

### 3.6.2 Indukcja izoenzymów cytochromu P450

Poza zjawiskiem polimorfizmu różnorodność szlaków metabolicznych potęguje możliwość indukcji poziomów izoenzymów cytochromu P450 biorących udział w metabolizmie leków i ksenobiotyków. Istnieje wiele substratów, które mogą aktywować bądź hamować działanie poszczególnych białek, co wpływa istotnie na metabolizm związków endogennych i egzogennych katalizowany przez te enzymy [106,107]. Zjawisko indukcji izoenzymów metabolizujących jest kolejną po polimorfizmie białek przyczyną zróżnicowanej podatności pacjentów na stosowane leczenie i w znacznym stopniu wpływa na skuteczność stosowanej terapii. Poznanie kilku głównych receptorów komórkowych tj. Ahr, CAR i PXR miało olbrzymie znaczenie w zrozumieniu mechanizmu indukcji wielu przemian metabolicznych [106]. Receptory te odgrywają istotną rolę w regulacji izoenzymów cytochromu P450. Receptor Ahr wpływa głównie na enzymy rodziny CYP1A natomiast PXR i CAR wpływają na rodziny cytochromu P450: CYP2 i CYP3A, a także na: transferazę glutationową oraz białka transportujące związane z opornością komórek tj. MDR1, MRP2.

Receptory komórkowe: Ahr i CAR są zlokalizowane w cytoplazmie komórki i dopiero po związaniu z odpowiednim ligandem są transportowane do jądra. Obydwa receptory wymagają aktywacji. Nieaktywny w cytoplazmie CAR jest związany z endogennymi steroidami. Dopiero po związaniu z induktorem np. fenobarbitem, receptor ten ulega defosforylacji i może być przenoszony do jądra. Podobnie Ahr

występuje w kompleksie z białkiem szoku termicznego (Hsp90), a pod wpływem induktora oddysocjowuje i jest przenoszony do jądra. Trzeci z wymienionych receptorów, PXR występuje głównie w jądrze komórkowym, podczas gdy w cytoplazmie znajdują się jego śladowe ilości. Aktywowane receptory oddziałują z częścią promotorową odpowiedniego genu kodującego enzym metabolizujący w miejscu zwanym (XRE) i wpływają na proces transkrypcji tego enzymu [106]. Receptor PXR oddziałując z różnymi ksenobiotykami, jak również z naturalnymi glukosteroidami i steroidami syntetycznymi reguluje poziom izoenzymu cytochromu CYP3A4, kluczowego w przemianach metabolicznych wielu powszechnie stosowanych leków [106,107].

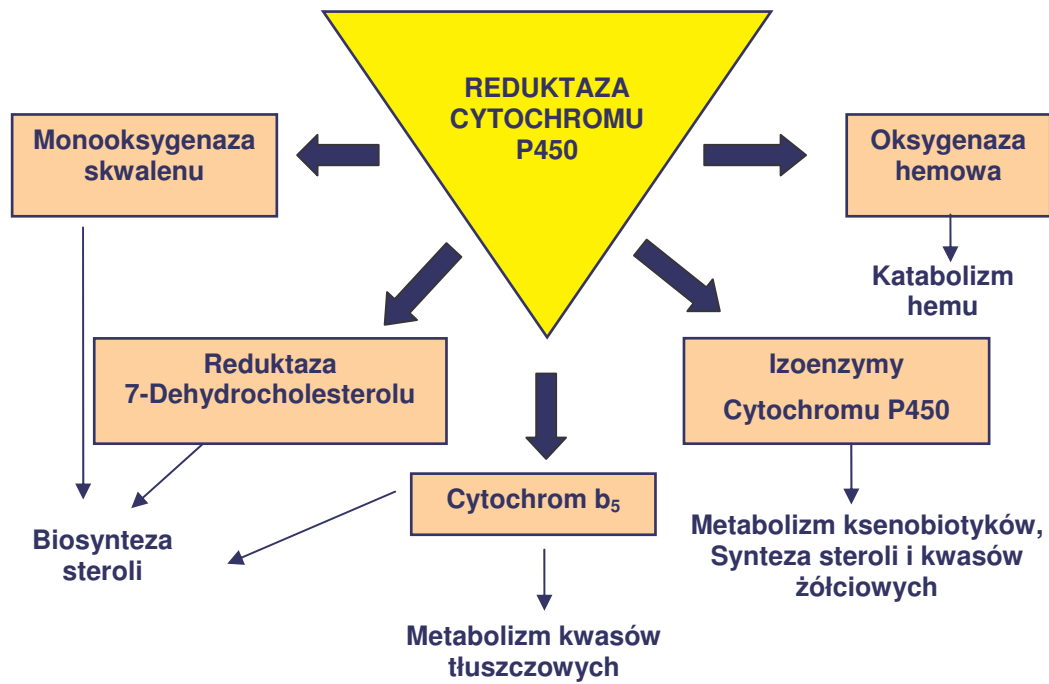
### **3.7 Reduktaza cytochromu P450 (CPR)**

#### **3.7.1 Ogólne informacje o CPR**

NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450 (CPR) jest flawoproteiną o masie 75-80 kDa, zlokalizowaną w błonie retikulum endoplazmatycznego większości komórek eukariotycznych. Po raz pierwszy została zidentyfikowana w 1949 roku, jako reduktaza cytochromu C [108]. Porównanie sekwencji genów kodujących enzymy reduktazy występujące w różnych organizmach wykazało, że istnieją segmenty identyczne dla wszystkich znanych form reduktazy cytochromu P450. Fragmenty te kodują aminokwasy biorące udział w wiązaniu kofaktorów flawoproteiny. Poziom ekspresji genu kodującego CPR w organizmach ssaków jest regulowany obecnością hormonu tyreotropowego (T3) [109] i jest najwyższy w wątrobie i płucach, aczkolwiek niewielkie ilości enzymu zlokalizowano we wszystkich badanych tkankach [110].

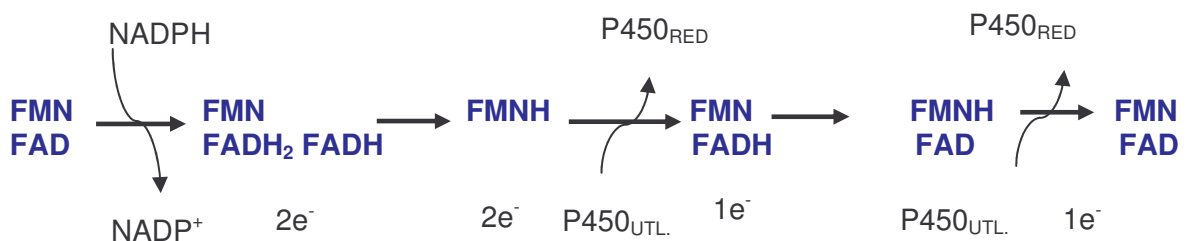
Reduktaza cytochromu P450 uczestniczy w transporcie elektronów z NADPH (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamadeninowego) na różne białka oksydoredukujące, wśród których znajduje się rodzina izoenzymów cytochromu P450. Inne fizjologiczne akceptory elektronów współpracujące z reduktazą cytochromu P450 to oksygenaza hemu [111], biorąca udział w katabolizmie hemu; cytochrom  $b_5$  [112], katalizujący procesy metabolizmu kwasów tłuszczowych oraz monooksygenaza skwalenu i reduktaza 7-dehydrocholesterolu, które wraz z cytochromem  $b_5$  biorą udział w biosyntezie steroli.





Rys. 54. Funkcje reduktazy cytochromu P450 wg. [113].

Oprócz wymienionych makromolekuł z reduktazą cytochromu P450 współpracuje również cytochrom c oraz ferrycyanid. W przenoszeniu elektronów w CPR uczestniczą, związane z enzymem, kofaktory: dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) oraz mononukleotyd flawinowy (FMN). FAD pełni funkcję akceptora dwóch ekwiwalentów jonu hydroniowego pobieranych z cząsteczki NADPH, a FMN jest donorem jednego elektronu na terminalny akceptor.



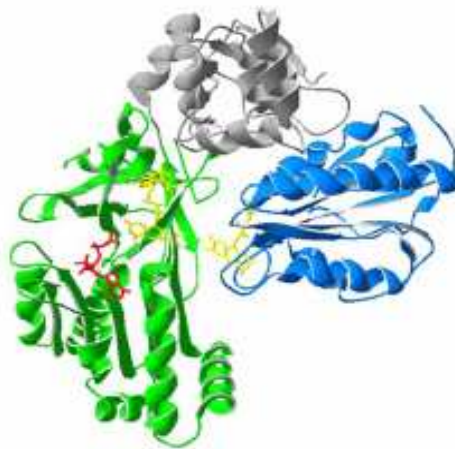
Rys. 55. Cykl katalityczny reduktazy cytochromu P450 wg. [113].

Reduktaza cytochromu P450 posiada zatem zdolność do jednoczesnego przyjmowania dwóch ekwiwalentów jonu hydroniowego z NADPH i przenoszenia ich pojedynczo na hemową grupę prostetyczną cytochromu P450. Zatem kierunek transportu elektronów jest następujący: NADPH  $\rightarrow$  FAD  $\rightarrow$  FMN, jak przedstawia rysunek 55. Badania wykazały jednak, że istnieją trzy typy cząsteczek współpracujące z reduktazą cytochromu P450, które różnią się preferencją, co do związku pełniącego funkcję dawcy elektronów. Są to:

1. Akceptory pierwszego typu - przyjmują ekwiwalenty redukujące bezpośrednio z FAD; do tej grupy należą: ferrycyanid i NADP<sup>+</sup>;
2. Akceptory drugiego typu - przyjmują elektrony z FMN, wśród nich znajduje się rodzina izoenzymów cytochromu P450 oraz cytochrom b<sub>5</sub>;
3. Akceptorem trzeciego typu jest molekularny tlen. Cząsteczka O<sub>2</sub> może przyjmować elektrony zarówno z FAD jak i FMN i generowany jest wówczas nadtlenek lub ponadtlenek.

### 3.7.2 Struktura reduktazy cytochromu P450

Reduktaza cytochromu P450 zbudowana jest z trzech domen. Jedna domena wiąże cząsteczkę FAD i NADPH i jest zlokalizowana na C-końcu, N-końcowa domena wiąże natomiast FMN. Dodatkowo obecna jest tzw. domena łącząca, która prawdopodobnie odpowiada za kontrolę i regulację przepływu elektronów między kofaktorami. Enzym zawiera również hydrofobowy fragment o długości 20-30 aminokwasów na N-końcu, który funkcjonuje jako „kotwica” umożliwiająca wiązanie się białka z błoną i oddziaływanie z cytochromem P450 [50]. Strukturę przestrzenną reduktazy przedstawiono na rys.56.



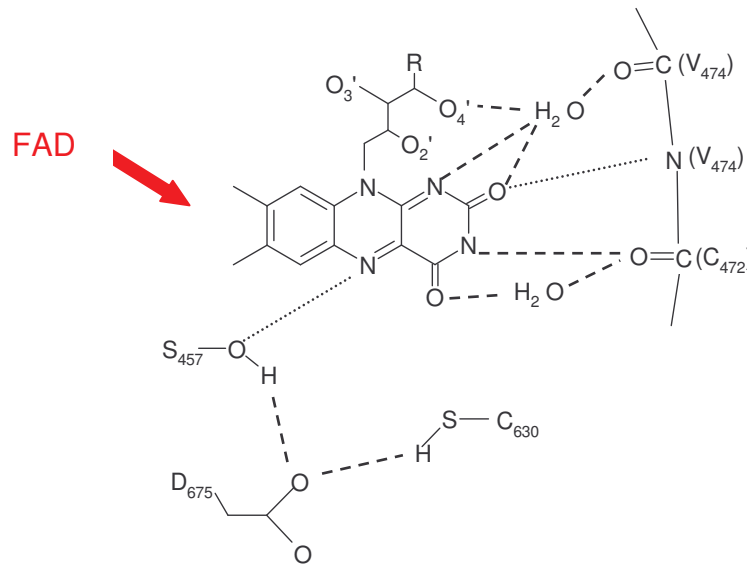
Rys. 56. Trójwymiarowa struktura reduktazy cytochromu P450; domena wiążąca FAD/NADPH-zielona, domena wiążąca FMN- niebieska, domena łącząca- szara, kofaktory FAD i FMN-żółte, NADPH- czerwony wg. [50].

### 3.7.3 Kompleks reduktazy cytochromu P450 z kofaktorami i z NADPH

Reduktaza cytochromu P450 posiada dwa kofaktory flawinowe: FAD i FMN, które uczestniczą w przekazywaniu ekwiwalentu jonu hydroniowego z NADPH na różne

terminalne akceptory elektronów. Miejsce wiązania kofaktorów ma głównie charakter hydrofobowy. Po obu stronach pierścieni izoalloksazynowych cząsteczek flawinowych znajdują się aminokwasy aromatyczne, co umożliwia tworzenie oddziaływań typu  $\pi - \pi$ , stabilizujących kompleks reduktazy cytochromu P450 z kofaktorami [50].

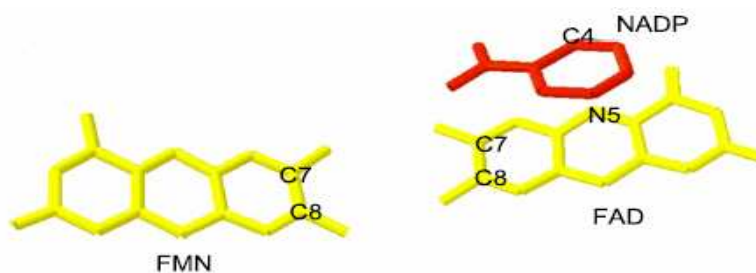
Oprócz oddziaływań typu  $\pi - \pi$  kompleks reduktazy cytochromu P450 z kofaktorami stabilizowany jest przez siły van der Waalsa oraz wiązania wodorowe [114]. Poniżej przedstawiono strukturę centrum aktywnego enzymu.



Rys. 57. Struktura centrum aktywnego reduktazy cytochromu P450, linia kropkowana – siły van der Waalsa, linia kreskowa – wiązania wodorowe [114].

### 3.7.4 Zmiany w strukturze CPR w czasie procesu katalizy

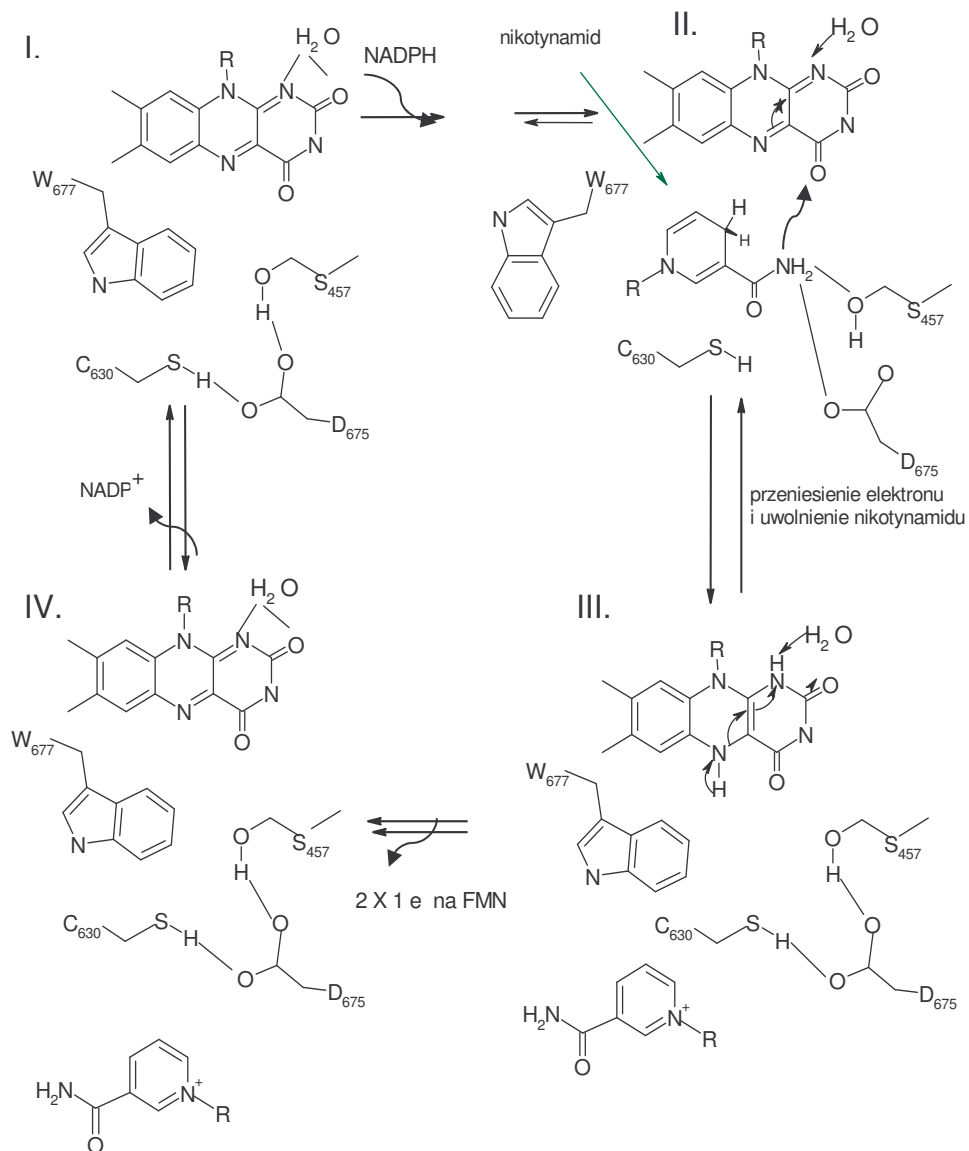
Cząsteczka FAD łączy się z reduktazą cytochromu P450 w pobliżu miejsca wiązania pierścienia nikotynamidowego NADPH, jednocześnie jest w bliskim kontakcie z pierścieniem izoalloksazynowym FMN, co umożliwia szybki i bezpośredni transfer elektronów między kofaktorami. Odległość między cząsteczkami FAD i FMN wynosi 2-2,5 Å. Wzajemną orientację kofaktorów w enzymie zaprezentowano na rys.58.



Rys. 58. Wzajemna orientacja kofaktorów w reduktazie cytochromu P450 [50].

Połączenie reduktazy cytochromu P450 z NADP(H) indukuje zmiany konformacyjne w strukturze białka, które są istotne dla procesu katalizowanego przez ten enzym. Związanie utlenionej formy NADP<sup>+</sup> powoduje widoczny ruch domeny wiążącej FMN tak, że odległość pomiędzy kofaktorami FAD i FMN wzrasta do 3 Å. Zwiększenie odległości, a tym samym otoczenia powoduje zmianę potencjału redukcyjnego cząsteczek flawinowych, co z kolei wpływa na aktywność enzymu, regulując przepływ elektronów pomiędzy flawinami [114]. Zredukowana forma NADPH łącząc się z reduktazą powoduje przesunięcie pierścienia indolowego Trp677, umożliwiając w ten sposób bliższy kontakt między cząsteczkami NADPH i FAD.

Prawdopodobny mechanizm transportu elektronów przez reduktazę cytochromu P450 został przedstawiony na rys. 59 [114].



Rys. 59. Prawdopodobny mechanizm transportu elektronów przez reduktazę cytochromu P450, linia kreskowana wiązania wodorowe wg. [114].

Mechanizm ten obejmuje 4 etapy:

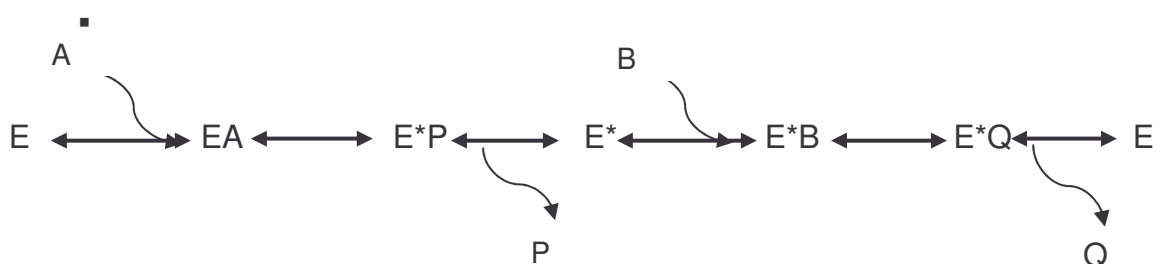
W I etapie przenoszenia elektronu podczas nieobecności NADPH, w centrum aktywnym utlenionej formy reduktazy istotną rolę odgrywa aminokwas Trp677. Pierścień indolu tego aminokwasu osłania pierścień izoalloksazynowy cząsteczki FAD. W II etapie reakcji przyłączenie cząsteczki NADPH powoduje wyparcie reszty Trp677, a miejsce pierścienia indolowego tego aminokwasu zajmuje pierścień pirydynowy cząsteczki NADPH. Tworzące się wiązania wodorowe pomiędzy grupą karboksyaminową tej cząsteczki a Asp675 i Ser457, ułatwiają transport ekwiwalentu jonu hydroniowego i zapewniają odpowiednią orientację cząsteczki NADPH. Podobną funkcję spełnia również Cys 630, która tworzy wiązania Van der Walsa z atomem C4 cząsteczki NADPH i stabilizuje tworzenie karbokationu. Cząsteczka wody wiążąca się z atomem N<sub>1</sub> i atomem O<sub>2</sub> pierścienia izoalloksazynowego cząsteczki FAD, umożliwia wymianę protonów z tym rozpuszczalnikiem. Jony hydroniowe są transportowane z cząsteczki NADPH na FAD. W III etapie transportu elektronów utleniona forma NADP<sup>+</sup> zostaje odsłonięta przez Trp677, Asp675 powraca na swoje miejsce i tworzy wiązania wodorowe z Ser457 i Cys 630, które stabilizują karbokation. W tym czasie elektrony z FAD są transportowane pojedynczo na cząsteczkę FMN.

W ostatnim, IV etapie katalizowanej reakcji następuje uwolnienie NADP<sup>+</sup> do środowiska z jednoczesną deprotonizacją atomu N<sub>5</sub> w cząsteczce FAD. Wszystkie pierwotne wiązania wodorowe ulegają odtworzeniu i reduktaza cytochromu P450 powraca do formy wyjściowej.

### 3.7.5 Mechanizm redukcji katalizowany przez CPR

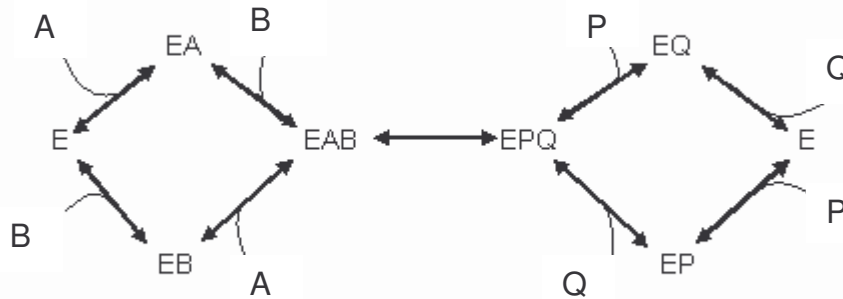
Substratami dla reduktazy cytochromu P450 są: NADPH i cząsteczka będąca terminalnym akceptorem elektronów, a w wyniku katalizowanej reakcji powstaje NADP<sup>+</sup> oraz zredukowany akceptor. Wyróżniamy dwa podstawowe mechanizmy działania enzymów, które wymagają jak w tym przypadku związania dwóch substratów:

- Podstawienie podwójne, zwane mechanizmem Ping-Pong, w którym nie tworzy się żaden kompleks przejściowy, a produkt pierwszej reakcji musi opuścić białko, zanim drugi substrat zwiąże się ze zmodyfikowanym odpowiednio enzymem:



Rys. 60. Mechanizm pin-pong reakcji enzymatycznej wg.[50].

- Podstawienie sekwencyjne, zwane mechanizmem Bi-Bi, w którym tworzy się kompleks przejściowy, oba substraty są jednocześnie związane z enzymem, po czym oddysocjują produkt(y):



Rys. 61. Mechanizm Bi-Bi reakcji enzymatycznej wg. [50].

Określenie mechanizmu działania reduktazy cytochromu P450 okazało się trudne, ponieważ istnieje cały szereg akceptorów elektronów, które mogą współpracować z enzymem. Cząsteczki te mogą różnić się nie tylko preferencją, co do związku pełniącego funkcję donora elektronów (FAD bądź FMN), ale również ilością przyjmowanych ekwiwalentów. Na przykład cytochrom c jest akceptorem jednego ekwiwalentu jonu hydroniowego, natomiast cytochrom P450 przyjmuje dwa elektrony, które są przekazywane pojedynczo. Zatem mechanizm przenoszenia elektronów z donora dla poszczególnych akceptorów może się znacznie różnić.

Badania reakcji redukcji cytochromu c przez CPR wykazały, że NADPH może łączyć się zarówno z wolnym enzymem, jak i z jego kompleksem z akceptorem elektronów. Cytochrom c ma również zdolność do oddziaływania z utlenioną i zredukowaną formą reduktazy cytochromu P450.

Podsumowując, dwa wybrane substraty reakcji wiążą się z reduktazą w niezależnych i oddzielnych miejscach, tworząc z enzymem kompleks przejściowy. Badania wykazały, że reakcja katalizowana przez reduktazę zachodzi mechanizmem Bi-Bi, aczkolwiek szczegółowy przebieg katalizy może być znacznie bardziej skomplikowany [50].

Wstępne wyniki badań pozwoliły zaproponować dwa możliwe mechanizmy przekazywania elektronów katalizowane przez reduktazę cytochromu P450:

- mechanizm typu 1-3-2-1
- mechanizm typu 2-4-3-2,

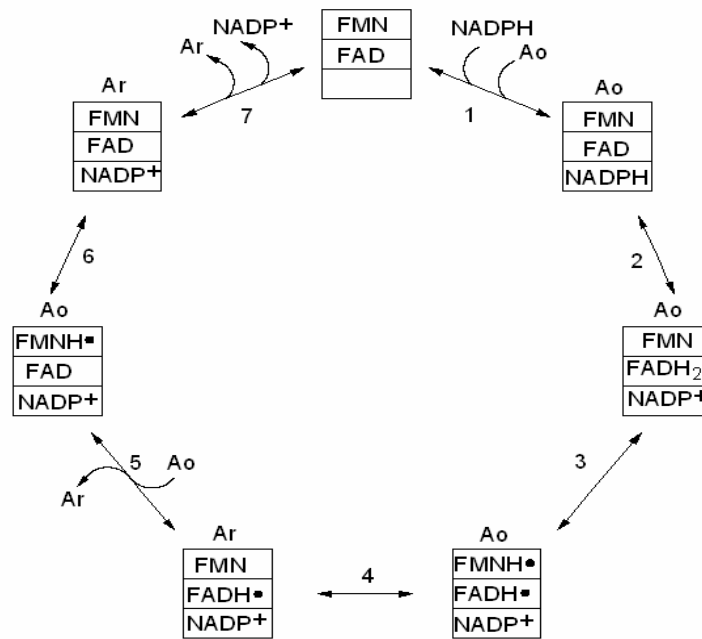
gdzie poszczególne liczby oznaczają całkowitą ilość elektronów, które znajdują się na obu cząsteczkach flawinowych w czasie reakcji. W obu modelach zakłada się, że zanim

nastąpi transfer elektronów z FMN na terminalny akceptor musi zajść tzw. reakcja „początkowa” z NADPH [50]. Konieczność zajścia tej reakcji nie została potwierdzona w kolejnych badaniach. Jednocześnie wykazano, że reakcja redukcji, w której przekazane byłyby 3 elektrony na cząsteczki flawinowe inaktywowałyby enzym, natomiast redukcja cztero-elektronowa jest niemożliwa w warunkach tlenowych [50]. Stąd wynika, że w reakcji uczestniczą 2 elektrony przekazane z NADPH na flawiny.

Istnieją trzy możliwe stany cząsteczek: FAD i FMN w redukcji dwu-elektronowej:  $FADH_2 - FMN$ ,  $FADH - FMNH$ ,  $FAD - FMNH_2$ . Wykazano jednak, że donorem elektronów na terminalny akceptor jest  $FADH - FMNH$ , które tworzą podwójną formę semichinonową. Mechanizm redukcji katalizowany przez reduktazę cytochromu P450 przedstawiono na rys.62. Mechanizm ten bazuje na trzech podstawowych obserwacjach:

1. Redukcja zachodzi mechanizmem dwuelektronowym,
2. W czasie reakcji tworzy się podwójna forma semichinonowa:  $FADH^{\cdot} - FMNH^{\cdot}$
3. Semichinon FMN pełni funkcję dawcy elektronów na ich terminalny akceptor.

W pierwszym etapie reakcji następuje związanie reduktazy cytochromu P450 z NADPH i utlenioną formą akceptora elektronów (Ao). Kompleks taki może powstawać nawet, jeśli kolejne etapy reakcji nie zajdą (1). W drugim kroku następuje przekazanie dwóch ekwiwalentów jonu hydroniowego na pierścień izoalloksazynowy cząsteczki FAD. Szybkość tego procesu jest różna w zależności od źródła pochodzenia enzymu, ale w większości przypadków limituje ona szybkość całej katalizy (2). W trzecim etapie zachodzi transfer elektronu na cząsteczkę FMN, powstaje kompleks przejściowy z podwójnym układem semichinonowym (3). Elektron ten jest przekazywany następnie z  $FMNH$  na terminalny akceptor, a etap ten zależy od natury chemicznej akceptora oraz od warunków reakcji (4). Kolejne procesy, oznaczone numerami 5, 6 i 7 zachodzą analogicznie do procesów 2, 3 i 4, w wyniku czego następuje uwolnienie zredukowanej formy akceptora (Ar) i cząsteczki  $NADP^+$  i odtworzenie wyjściowej formy reduktazy cytochromu P450. Cały cykl można określić symbolem 0-2-1-0, co oznacza, że dwa elektrony są przenoszone z cząsteczki NADPH na cząsteczkę FAD, a następnie są transportowane pojedynczo na cząsteczkę FMN, a z niej na akceptor elektronów np. cytochrom P450.



Rys. 62. Mechanizm redukcji katalizowany przez reduktazę cytochrom P450; Ao, Ar- odpowiednio, utleniona i zredukowana forma akceptora elektronów wg. [50].

### 3.7.6 Kompleks cytochromu P450 z reduktazą cytochromu P450

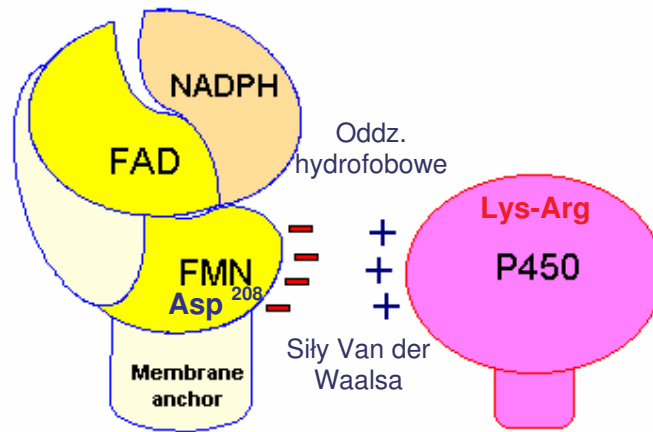
Reduktaza cytochromu P450, jak wspominałam już wcześniej tworzy kompleksy z izoenzymami cytochromu P450, co umożliwia szybki i bezpośredni transport elektronów z NADPH na  $\text{Fe}^{3+}$ . Transfer pierwszego ekwiwalentu jonu hydroniowego następuje po związaniu cytochromu z substratem i jest niezbędny dla katalizowanej reakcji. Transport drugiego elektronu do kompleksu  $\text{Fe (II)-O}_2$  może zachodzić nie tylko bezpośrednio z reduktazy cytochromu P450, ale również z cytochromu  $\text{b}_5$ .

Całkowita zawartość reduktazy w mikrosomach komórek zwierzęcych w stosunku do zawartości izoenzymów cytochromu P450 wynosi 1:5-10.

Badania sposobu oddziaływania między cytochromem P450 i reduktazą wykazały, że tworzą one kompleks w stosunku 1:1 [115], na którego stabilność wpływa rodzaj cytochromu P450 oraz siła jonowa środowiska reakcji. Kompleks ten jest stabilizowany przez:

- oddziaływania elektrostatyczne, które zapewniają odpowiednią orientację białek,
- oddziaływania hydrofobowe między niepolarnymi aminokwasami (leucyną, waliną, tryptofanem i innymi) umożliwiające bliski kontakt między enzymami, przez co ułatwiają transport elektronów z reduktazy na cytochrom,
- siły van der Waalsa [116].





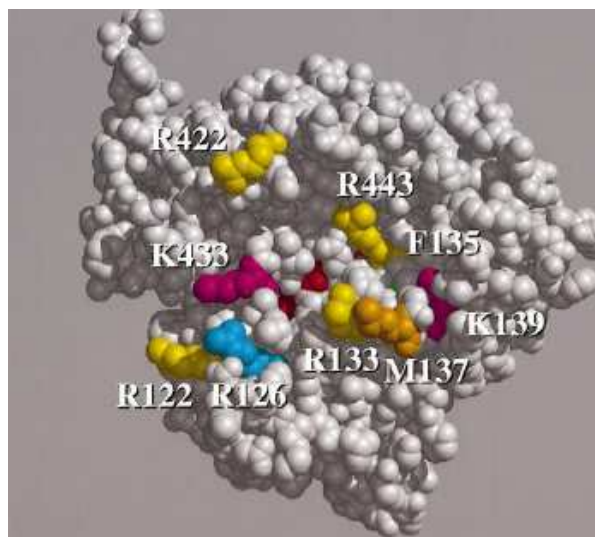
Rys. 63. Kompleks cytochromu P450 z reduktazą cytochromu P450 wg, [113].

Stosując chemiczną modyfikację i ukierunkowaną mutagenezę określono aminokwasy biorące udział w powstawaniu kompleksu. Wykazano, że wiązania tworzą się między dodatnio naładowanymi resztami lizyny i argininy, wchodzącymi w skład struktury cytochromu, a ujemnie naładowanymi resztami kwasu asparaginowego bądź glutaminowego w reduktazie [116]. Wykazano, że w strukturze CPR występują dwie grupy aminokwasów, które uczestniczą w wiązaniu reduktazy z izoenzymami cytochromu P450, a wśród nich głównie aminokwas Asp208:

1.  $^{207}\text{Asp-Asp}^{208}\text{-Asp}^{209}$ ,
2.  $^{213}\text{Glu-Glu-Asp}^{215}$ .

Stwierdzono, że powyższe aminokwasy znajdują się blisko domeny wiążącej FMN, co ułatwia transport elektronów z koenzymu flawinowego na cytochrom.

Powierzchnia izoenzymów cytochromu P450 odpowiedzialna za oddziaływanie z reduktazą znajduje się w pobliżu hemowej grupy prostetycznej [117] i zawiera liczne, dodatnio naładowane reszty lizyny. Wykazano, że modyfikacja chemiczna 8 reszt lizyny w jednym z izoenzymów cytochromu P450, CYP2B1, powoduje spadek aktywności enzymu w 95% [118]. Dla CYP2B4 dokładnie określono aminokwasy uczestniczące w wiązaniu reduktazy cytochromu P450. Są to: Arg 422, Arg 443 i Lys 433.



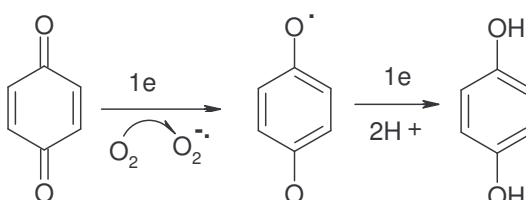
Rys. 64. Powierzchnia CYP2B4 tworząca wiązanie z CPR, grupa hemowa z cysteiną oznaczona kolorem czerwonym [118].

Kompleks cytochromu P450 z reduktazą indukuje zmiany konformacyjne w strukturze centrum aktywnego P450, co ułatwia transport elektronów na atom Fe (III) konieczny dla zajęcia reakcji [118].

W celu bliższego poznania roli izoenzymów cytochromu P450 i wyjaśnienia funkcji reduktazy cytochromu P450 w ostatnich latach stworzono nowy model do badań enzymatycznych – myszy HRN<sup>TM</sup> z „nokautem” genu kodującego reduktazę cytochromu P450 w komórkach wątroby. Zwierzęta te uzyskano za pomocą techniki inżynierii genetycznej zwanej „Cre/LoxP technology” [119,120], która pozwoliła na eliminację reduktazy tylko w komórkach wątroby. Przeprowadzone badania w 2002 r jednoznacznie wskazały, że reduktaza jest konieczna dla prawidłowego rozwoju embrionalnego i całkowite jej usunięcie z organizmu na skutek zmiany w sekwencji genowej kodującej ten enzym, nie tylko z komórek wątroby, jest dla tych zwierząt letalne [119]. Myszy HRN<sup>TM</sup> są zdolne do życia i rozmnażania, ale nie posiadają funkcjonalnego systemu cytochromu P450. Izoenzymy cytochromu P450 występujące w komórkach wątroby są nieaktywne. Natomiast obserwuje się znaczny wzrost poziomu białek cytochromu P450 w innych tkankach organizmu tj. nerkach, sercu, mózgu, co wpływa na odmienny metabolizm związków chemicznych. Ponadto, zwierzęta te mają znacznie obniżony poziomem cholesterolu i trójglicerydów we krwi, chociaż w wątrobie jest on wysoki [119,120]. Powyższe dane wskazują, że reduktaza cytochromu P450 pozwala utrzymać równowagę wewnętrzną w organizmie i wraz z izoenzymami cytochromu P450 chroni organizm przed wpływem różnych związków chemicznych.

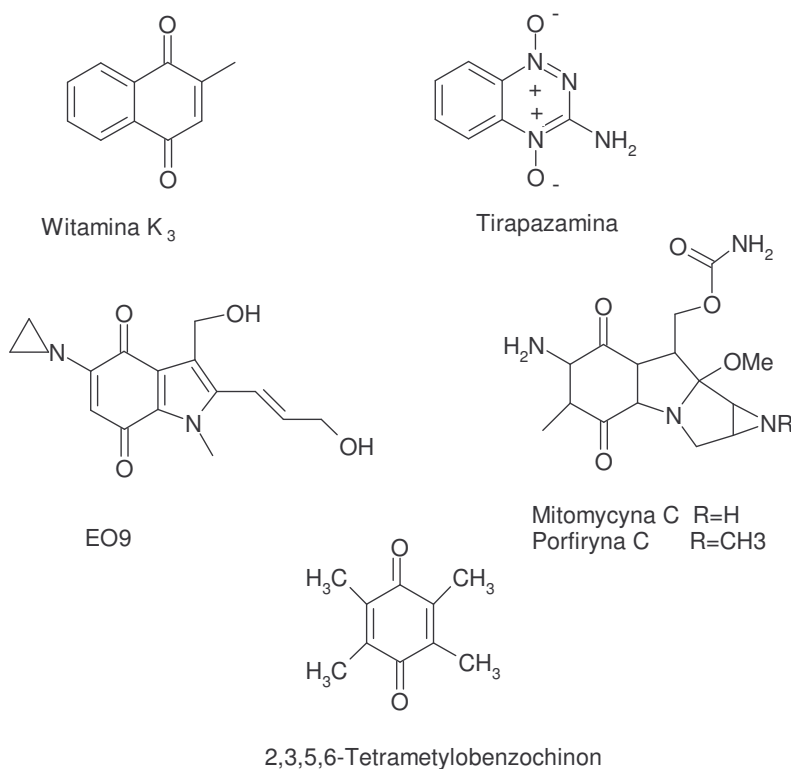
### 3.7.7 Wybrane reakcje reduktazy cytochromu P450

Reduktaza cytochromu P450 katalizuje reakcje 1-elektronowej redukcji głównie chinonów i aldehydów, w wyniku, czego powstają reaktywne intermediały, które mogą oddziaływać z makromolekułami np. DNA i białkami.



Rys. 65. Mechanizm redukcji chinonów do semichinonów wg.[97].

Wśród substratów tego enzymu znajdują się znane leki i związki przeciwnowotworowe tj. Mitomycyna C\* (mitomycinum C), Porfiryne C\*, 2,3,5,6-Tetrametylobenzochinon\*, Witamina K<sub>3</sub>\* (menadion), Tirapazamina (TPZ)\* (tirapazamine), EO9, streptonigrin, Adriamycyna\* (adriamycin) [97,121,122]. Struktury chemiczne niektórych z nich przedstawiłam na poniższym rysunku.



Rys. 66. Struktury chemiczne wybranych substratów reduktazy cytochromu P450 [97].

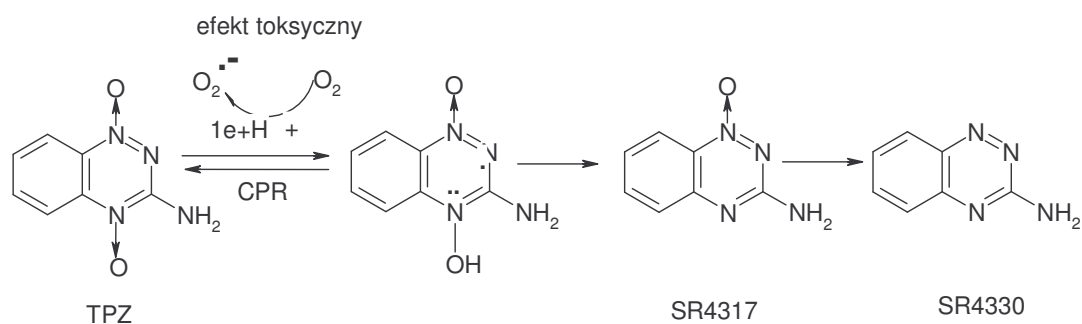
Wszystkie te związki należą do grupy proleków, czyli występują w formie nieaktywnej i wymagają enzymatycznej aktywacji do utworzenia reaktywnych metabolitów, które mogą oddziaływać z DNA [97].

Mitomycyna C, podobnie jak jej metylowy analog - Porfiryne C w obecności reduktazy cytochromu P450 ulega jednoelektronowej redukcji do semichinonu, a następnie oddziałuje z DNA powodując jego alkilację. W obecności tlenu reaktywny intermediat semichinonowy ulega utlenieniu do związku wyjściowego [121]. Reakcja ta decyduje o jego selektywnym działaniu w stosunku do komórek niedotlenionych, jakimi są komórki nowotworowe. Mitomycyna C może również ulegać 2-elektronowej redukcji do hydrochinonu w obecności następujących enzymów: DT-diaforazy, hydrogenazy ksantynowej, czy NADPH oksydoreduktazy chinonowej [97,123].

Badania *in vivo* na ksenoprzeszczepach komórek nowotworowych u myszy wykazały, że w niektórych sytuacjach wysoki poziom reduktazy cytochromu P450 w komórkach wpływa na wzrost wrażliwości tych komórek na Mitomycynę C. Natomiast niski poziom tego enzymu może być odpowiedzialny za oporność komórek na ten lek [121].

Warto podkreślić, iż reduktaza cytochromu P450 występuje nie tylko w zdrowych komórkach różnych kluczowych organów takich jak. wątroba, jelita czy nerki, ale także w wielu komórkach nowotworowych tj. w białaczkach, czerniakach, nowotworach piersi, jelit, płuc, jajnika, prostaty i nerek, przy czym poziom tego enzymu jest tam znacznie niższy, niż w normalnych komórkach [97], co może być szczególnie ważne dla terapii przeciwnowotworowej. W komórkach nowotworu wątroby zarejestrowano ok. 1,8 razy wyższą aktywność reduktazy cytochromu P450, niż w zdrowych komórkach wątroby. W przypadku nowotworu płuc i piersi nie obserwowano znaczących różnic w poziomie tego enzymu.

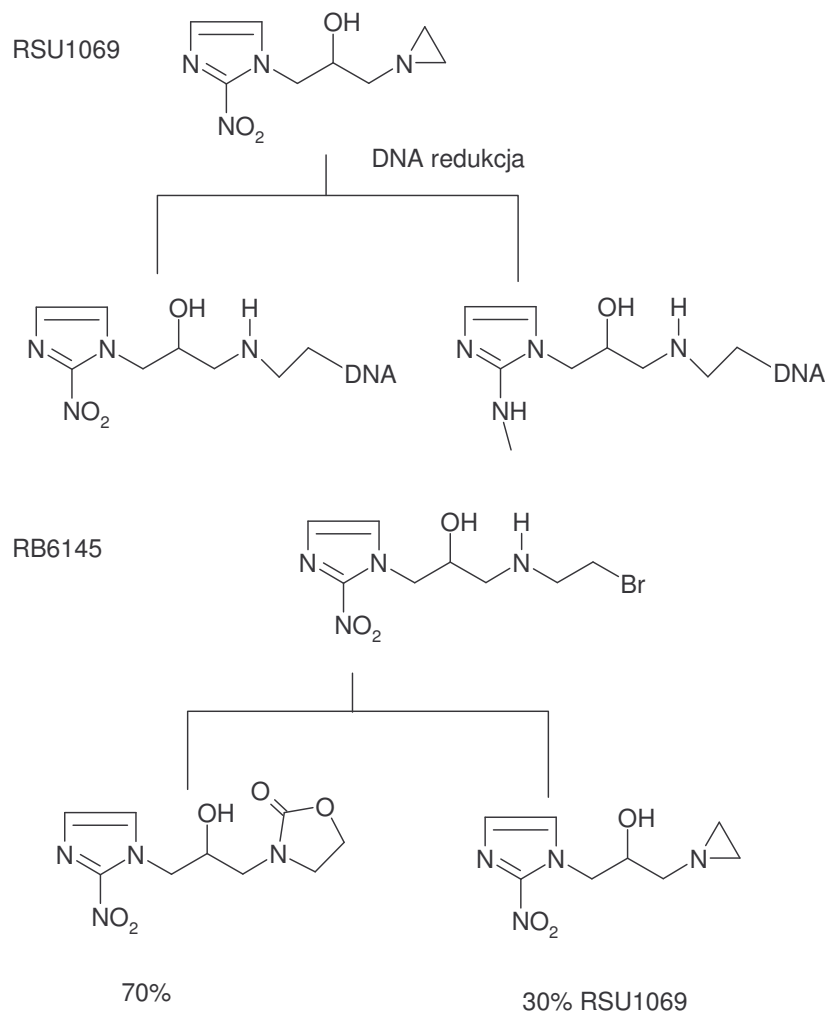
Kolejnym przykładem związku o działaniu przeciwnowotworowym, który wymaga aktywacji w warunkach redukcyjnych jest Tirapazamina\* (tirapazamine) (TPZ) [81,124]. Pochodna ta wykazuje aktywność głównie w stosunku do nowotworu piersi i płuc u palaczy i obecnie jest w trakcie II i III fazy badań klinicznych, jako lek towarzyszący w terapii Cisplatyną. Tirapazamina\* podobnie, jak wspomniana powyżej Mitomycyna C, ulega redukcji do reaktywnych rodników, które oddziałując z DNA powodują pęknięcie jednej albo obu nici tej makromolekuły. Powstający rodnik nitrozowy jest zobojętniany przez cząsteczkę tlenu, co powoduje, że związek ten jest aktywny tylko w warunkach beztlenowych dzięki czemu jest selektywny w działaniu. Dalsza redukcja rodników nitrozowych: 4-elektronowa albo 2-elektronowa prowadzi do powstania produktów nietoksycznych: SR4317 i SR4330 (rys. 67).



Rys. 67. Redukcja TPZ w obecności reduktazy cytochromu P450 wg. [81].

Wykazano, że TPZ jest bardziej selektywna w stosunku do komórek beztlenowych, niż Mitomycyna C\* (mitomycinum C) i ok. 1,5-3 razy bardziej aktywna niż ten związek [81]. Wysoka wydajność cięcia DNA przez TPZ wynika prawdopodobnie z faktu, iż związek ten jest redukowany w jądrze, czyli w pobliżu DNA. Jednak nieznanne są wszystkie enzymy, które katalizują przemiany TPZ do reaktywnych rodników. TPZ wykazuje aktywność w stosunku do komórek nowotworowych piersi i płuc u palaczy. Podobnie, jak w przypadku Mitomycyny C\* (mitomycinum C) wykazano, że komórki nowotworowe z podwyższonym poziomem reduktazy cytochromu P450 są bardziej wrażliwe na TPZ.

Reduktaza cytochromu P450 bierze również udział w redukcji pochodnej 2-nitroimidazolu, związku o symbolu RSU1069 (rys. 68). W warunkach beztlenowych związek ten jest ok.100 razy bardziej aktywny, niż Mitomycyna C, co jest związane z obecnością grupy azyrydynowej w łańcuchu bocznym tego związku. Analogiem związku RSU1069 jest znacznie mniej toksyczna pochodna o symbolu RB6145.



Rys. 68. Redukcja pochodnych 2-nitroimidazolu wg [81].

Podsumowując, reduktaza cytochromu P450 katalizując reakcję 1-elektronowej redukcji spełnia ważną funkcję w aktywacji proleków, zwiększając ich selektywność w stosunku do komórek beztlenowych, co korzystnie wpływa na skuteczność stosowanej terapii przeciwnowotworowej.

### 3.7.8 Nowa hipoteza na temat cyklu katalitycznego izoenzymów cytochromu P450

Poszukując informacji na temat izoenzymów cytochromu P450 i współpracującej z nim reduktazy cytochromu P450 spotkałam się z nową i jeszcze niepotwierdzoną hipotezą dotyczącą przemian metabolicznych katalizowanych przez te enzymy. Według nowej teorii propagowanej przez Kelath Murali Manoj z Uniwersytetu w Arkansas w USA, NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450 odgrywa decydującą rolę w przemianach metabolicznych zachodzących w mikrosomach komórek wątroby [125]. Uważa on, iż w pierwszym etapie cyklu katalitycznego cytochromu P450 decydującą rolę

odgrywa reduktaza, a nie cytochrom P450 jak się powszechnie uważa. Według tej teorii, reduktaza cytochromu P450 a nie białko cytochromu P450 reaguje z cząsteczką tlenu, w wyniku, czego powstają reaktywne formy tlenu, ROS tj. jon ponadtlenkowy czy nadtlenek wodoru, które dopiero oddziałują z kompleksem izoenzymu cytochromu P450 z substratem. Reaktywne formy tlenu są znacznie lepiej dostępne dla białek P450, niż obojętna cząsteczka tlenu. Natomiast przyłączenie cząsteczki tlenu do kompleksu izoenzymu z substratem jak ogólnie przyjęto wymaga bardzo ścisłego oddziaływania białka z substratem, co przy dużej różnorodności substratów jest trudne do osiągnięcia. Badania izoenzymu CYP2C9 wykazały, że w centrum aktywnym tego enzymu brak jest specjalnych miejsc wiążących dla substratu. Ponadto, badania spektrofotometryczne kompleksu białka z substratem nie wykazały zmiany widma tego kompleksu. Wyniki tych badań według Autora powyższej teorii wskazują, że tylko reaktywne formy tlenu np.  $H_2O_2$  generowane przez CPR mogą niezależnie wiązać się z kompleksem enzym-substrat. Dlatego, można przypuszczać, że w komórce ilość enzymu reduktazy cytochromu P450 jest znacznie niższa, niż izoenzymów cytochromu P450.

Przedstawiony powyżej przykład świadczy, iż mimo 50-letniej historii badań nad rodziną białek izoenzymu cytochromu P450 ciągle pojawiają się nowe informacje wymagające potwierdzenia lub weryfikacji, co pociąga za sobą konieczność prowadzenia dalszych badań nad mechanizmem działania kompleksu enzymu cytochromu P450.

### 3.8 Podsumowanie

Izoenzymy cytochromu P450 to zróżnicowana grupa enzymów, która w kompleksie z reduktazą cytochromu P450 odgrywa istotną rolę w metabolizmie związków endogennych, leków i ksenobiotyków. Różnorodność substratów oraz bogactwo reakcji katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 powoduje, że enzymy te są niezbędne dla prawidłowego rozwoju ssaków. Pozwalają one utrzymać wewnętrzną równowagę w organizmie, a przede wszystkim chronią go przed szkodliwym działaniem nie tylko ksenobiotyków szeroko rozpowszechnionych w naszym życiu codziennym, ale również naturalnych produktów akumulowanych w organizmie [20].

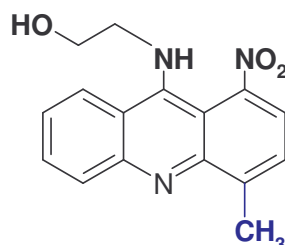
Poszerzająca się wiedza na temat funkcjonowania enzymów w komórkach i w organizmie człowieka umożliwia projektowanie struktur cząsteczek substratu lub inhibitora, które reagują w miejscu aktywnym odpowiedniego izoenzymu wpływając jednocześnie na przemiany metaboliczne. Wiedza ta może pozwolić częściowo rozwiązać problemy farmakologii związane ze zjawiskiem dezaktywacji i interakcji leków w organizmie, a także polimorfizmem izoenzymów cytochromu P450, co wpłynie korzystnie na farmakokinetykę leków u poszczególnych pacjentów. Zastosowanie

zebranej wiedzy na temat specyficzności działania kompleksu tych enzymów, indukcji i hamowaniu ich ekspresji umożliwi indywidualne podejście do pacjentów, czyli stosowanie optymalnych dawek leków i racjonalne planowanie terapii wielolekowej.



## 4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 4.1 Metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych



Rys.69. Struktura chemiczna związków: C-1748 (Capridine  $\beta$ ) i C-857 (Capridine  $\alpha$ ).

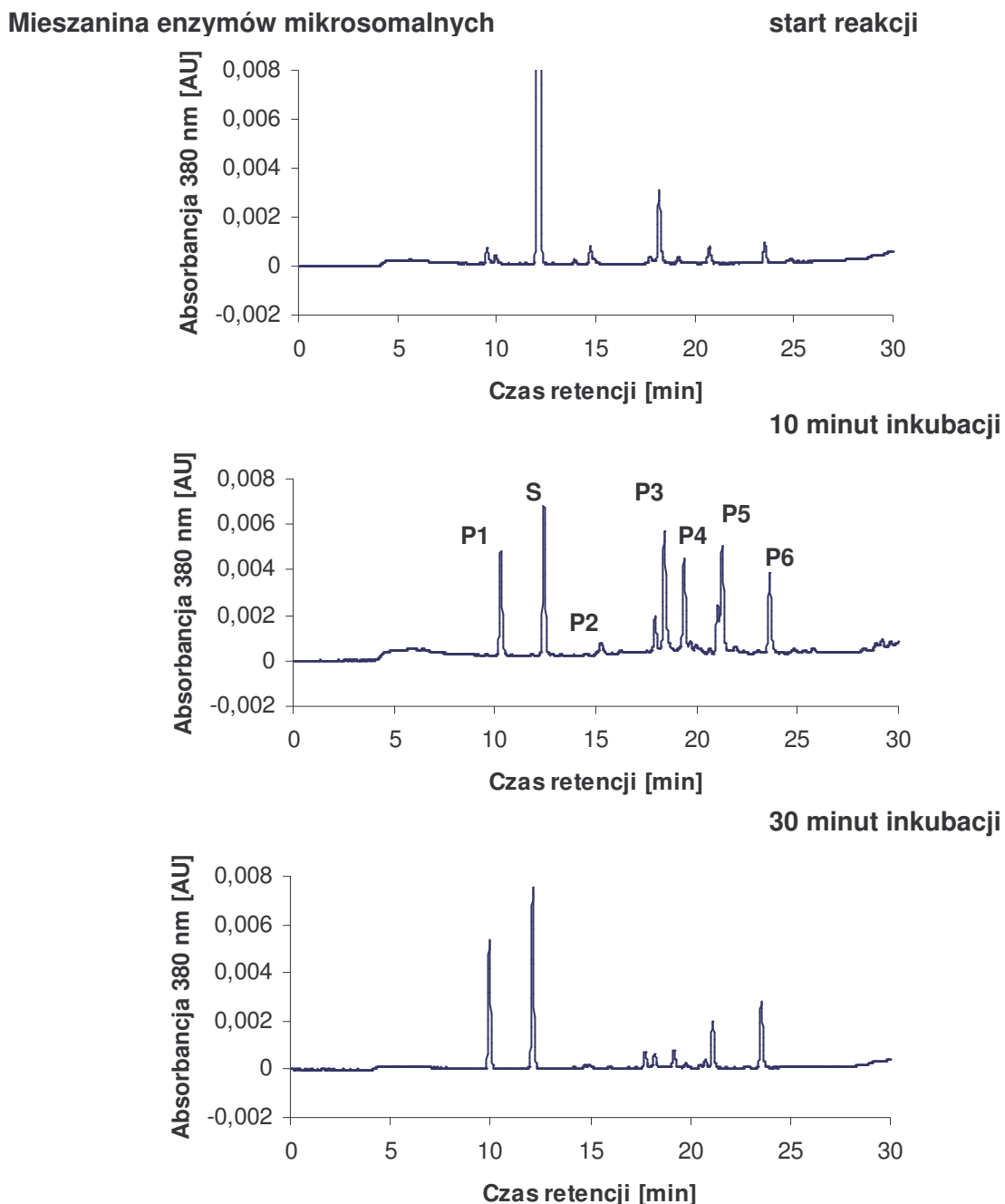
Poszukując różnic w biotransformacji związków C-857 i C-1748, różniących się w znacznym stopniu toksycznością ogólną na zwierzętach zbadalam przebieg ich przemian metabolicznych w obecności mieszaniny różnych enzymów mikrosomalnych wątroby szczura. Mikrosomy są to pęcherzyki błony retikulum endoplazmatycznego w komórce zawierające szereg enzymów I i II fazy metabolizmu, w tym kompleks monoooksygenazy cytochromu P450 i NADPH - zależnej reduktazy cytochromu P450. Wybrany do badań model jest powszechnie stosowany do analizy przemian metabolicznych wielu leków i ksenobiotyków. Warunki prowadzenia reakcji opisałam szczegółowo w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.1. Badanie biotransformacji rozpocząłam od związku referencyjnego, C-857.

#### 4.1.1 Przemiany związku C-857 (Capridine $\alpha$ )

Enzymatyczną transformację związku C-857 w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych prowadziłam przy różnych proporcjach związku, kofaktora NADPH i enzymu, co pozwoliło określić optymalne warunki dla aktywacji tej pochodnej. Poniżej prezentuję wybrane chromatogramy mieszanin reakcyjnych otrzymanych w następujących warunkach: C-857: NADPH; 1:10 czyli z dużym nadmiarem NADPH.

- ◆ 0,2 mM C-857
- ◆ 2 mM NADPH
- ◆ 2 mg/ml enzymu
- ◆ roztwór buforowy RM

Przebieg reakcji opisałam w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.1. Otrzymane chromatogramy mieszanin reakcyjnych przedstawiłam na rys.70. Analizę mieszaniny reakcyjnej prowadziłam metodą HPLC.

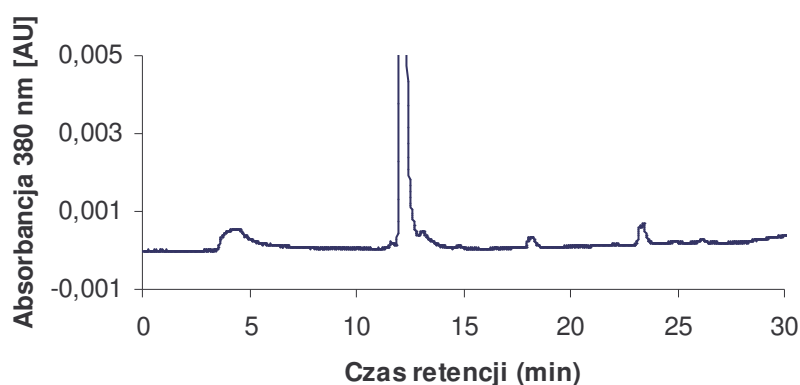
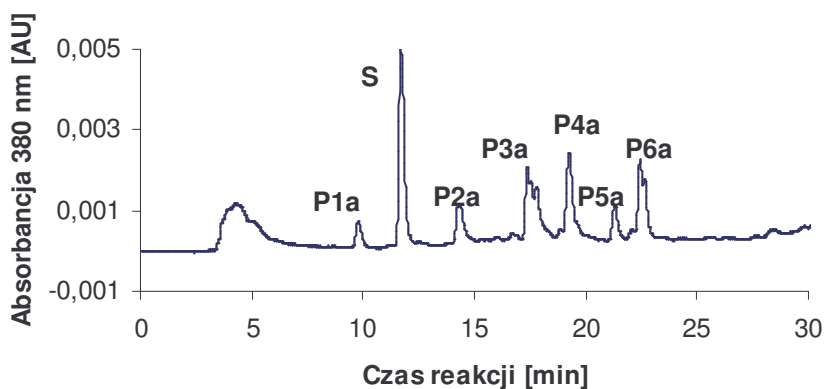
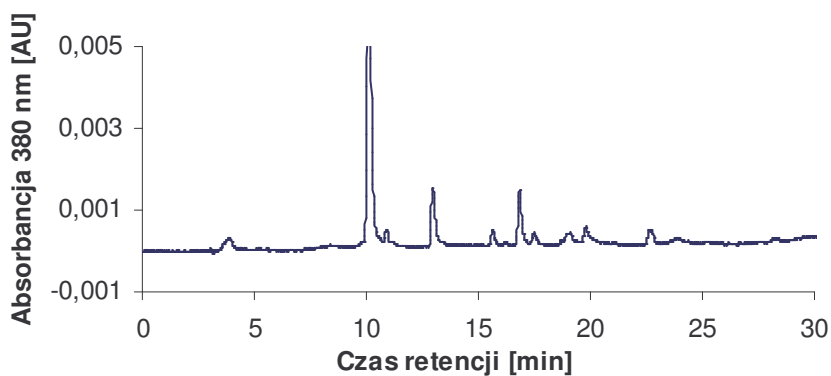


Rys.70. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej po 0, 10 i 30 minutach inkubacji; 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH 2 mg/ml enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów.

Analiza powyższych oraz innych chromatogramów (dane nie prezentowane) wskazuje, że związek C-857 jest bardzo podatny na przemiany enzymatyczne, a stopień przereagowania substratu zależy od stężenia NADPH i czasu inkubacji. Biotransformacja związku C-857 prowadzi do powstania 6 głównych produktów.

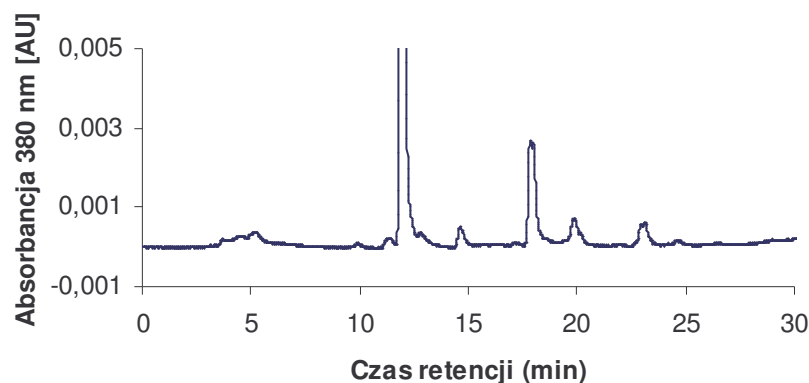
Godnym uwagi jest fakt, że po dłuższym czasie inkubacji intensywność pików trzech produktów: P3, P4 i P5 obniżała się, co świadczy o ich niskiej stabilności.

W dalszym etapie pracy badałam przemiany związku C-857 w obecności szczurzych enzymów mikrosomalnych otrzymanych po podaniu zwierzętom następujących związków: metylocholantrenu, fenobarbitalu, dexametazonu i kwasu clofibrylowego. Enzymy te odpowiednio wykazują podwyższoną ekspresję izoenzymów z rodzin: CYP1A, CYP2B, CYP3A i CYP4A. Celem powyższego etapu pracy badań było zbadanie, które rodziny izoenzymów P450 mają istotne znaczenie dla przemian metabolicznych pochodnej C-857. Wybrane chromatogramy mieszanin reakcyjnych przedstawiłam na rys. 71.

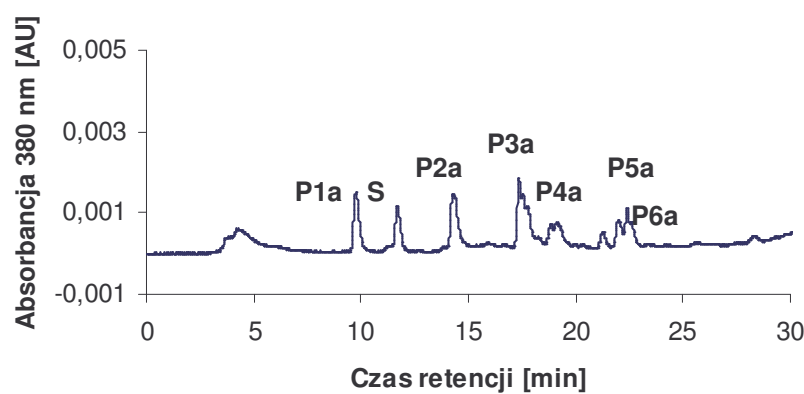
**A) CYP1A****0 minut inkubacji****10 minut inkubacji****30 minut inkubacji**

## B) CYP3A

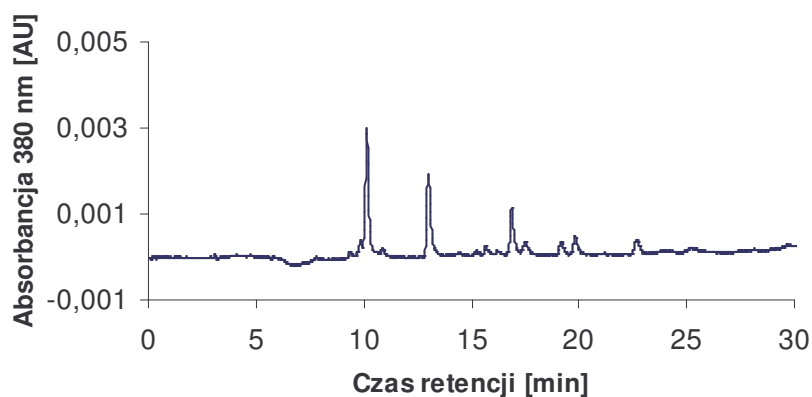
start reakcji



10 minut inkubacji



30 minut inkubacji

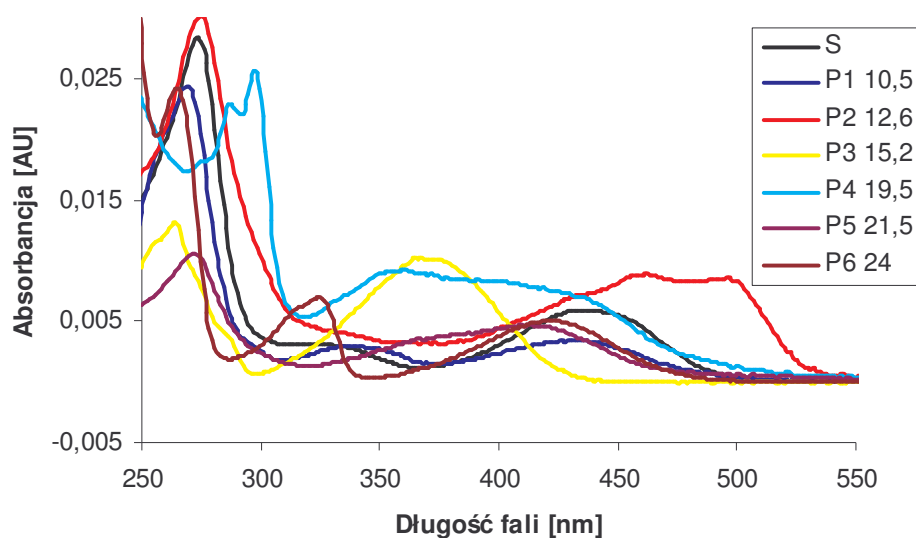


Rys.71. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2 mg/ml enzymów mikrosomalnych o nadekspresji wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 wyizolowanych z komórek wątroby szczura, 10 minut reakcji A ) CYP1A, B ) CYP3A.

Wykazałam, że ogólny charakter przemian związku C-857 oraz ilość powstających produktów jest podobny, niezależnie od tego, która rodzina izoenzymów cytochromu P450 przeważała w mieszaninie enzymów mikrosomalnych. Różnice dotyczyły szybkości przemiany substratu. Enzymy mikrosomalne z podwyższonym poziomem izoenzymów z rodziny CYP3A indukowały najwyższą szybkość tej przemiany. Obserwacja ta jest zgodna z ogólną wiedzą, wskazującą, że ta grupa izoenzymów cytochromu P450 bierze

udział w metabolizmie wielu leków. Bezpośrednio po zmieszaniu reagentów można było już obserwować powstawanie produktów P3a P4a i P6a. Podobnie jak poprzednio trudny do jednoznacznego wyjaśnienia jest fakt niskiej intensywności pików niektórych produktów przy równoczesnym wysokim stopniu przereagowania substratu oraz obniżanie się stężenia produktów wraz z upływem czasu reakcji. Można przypuszczać, że powstające reaktywne metabolity szybko wiążą się na powierzchni białek mikrosomalnych, których stężenie w mieszaninie jest wysokie.

Podsumowując badania przemian wobec enzymów mikrosomalnych, wykazałam, że związek C-857 jest wrażliwy na biotransformację w obecności wszystkich badanych enzymów mikrosomalnych, co prowadzi do powstania 6 głównych metabolitów. Produkty te mają bardzo zróżnicowane widma UV-VIS (przedstawione na rys.72) świadczące o istotnych zmianach w strukturze chromoforu cząsteczki, które zaszły w trakcie przemiany substratu do jego metabolitów.



Rys.72. Widma UV-VIS produktów metabolizmu związku C-857 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura.

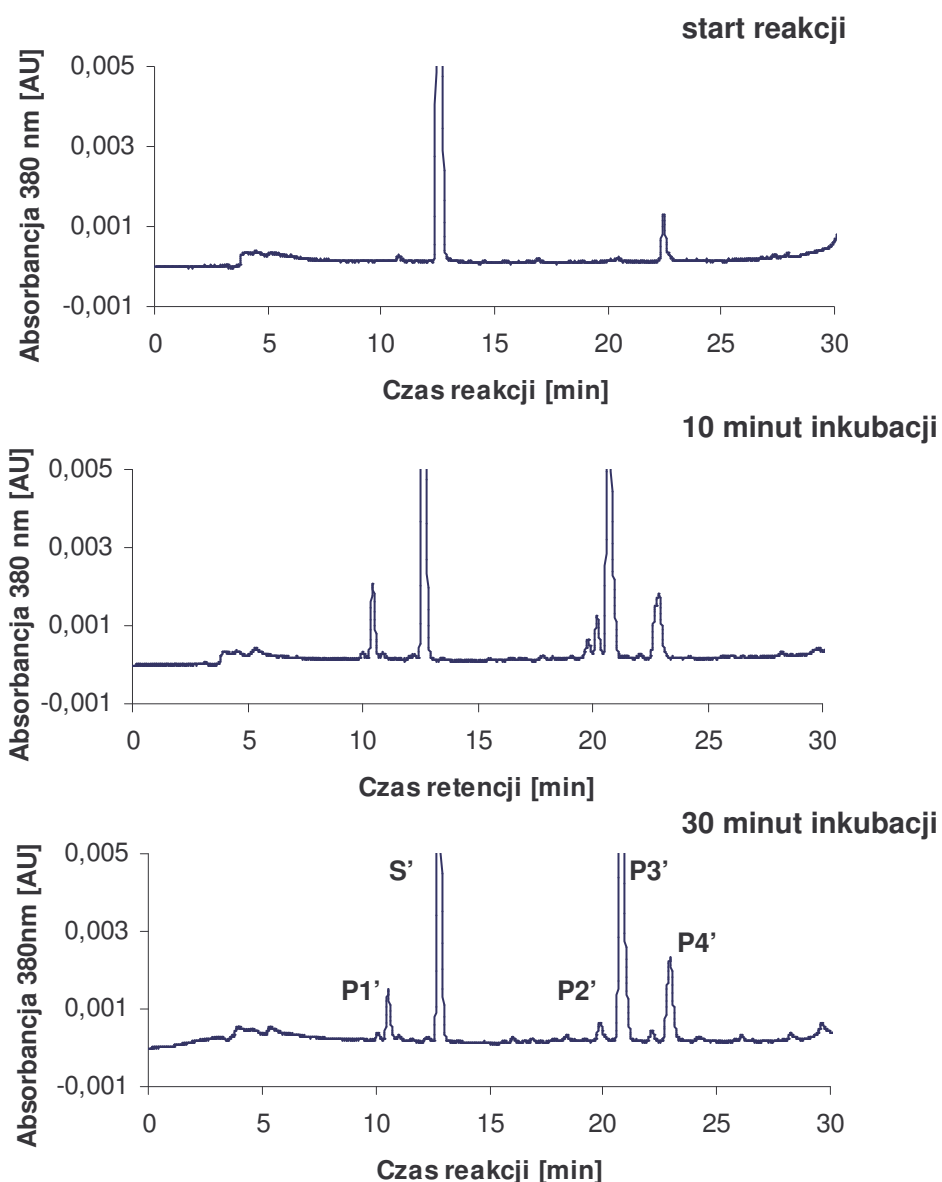
#### 4.1.2 Przebieg przemian związku C-1748 (Capridine $\beta$ )

Kontynuując badania enzymatycznej transformacji pochodnych 1-nitroakrydyny wobec enzymów mikrosomalnych badałam przemiany związku C-1748, który wykazywał niższą, niż związek C-857 toksyczność ogólną i został wyselekcjonowany do I fazy badań klinicznych. Badania te miały na celu, z jednej strony porównanie reaktywności związków C-857 i C-1748 w aspekcie ich zróżnicowanej toksyczności, z drugiej zaś strony,

wyodrębnienie grup izoenzymów cytochromu P450 odpowiedzialnych za te przemiany. Zbadałam kinetykę reakcji biotransformacji pochodnej C-1748 w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych, a następnie poszukiwałam różnic w tej biotransformacji w obecności enzymów mikrosomalnych o podwyższonej ekspresji wybranych rodzin izoenzymów P450. Wybrane chromatogramy mieszanin reakcyjnych przedstawiłam na rys.73 i rys.74.

### Mieszanina enzymów mikrosomalnych

#### C-1748

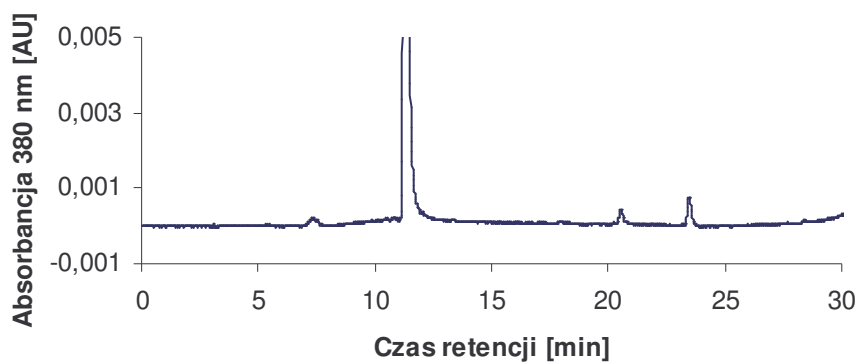


Rys.73. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej w zależności od czasu inkubacji 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura.

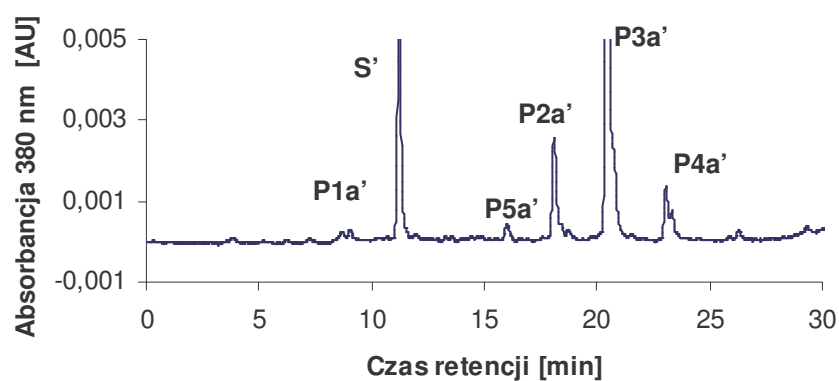
Analiza powyższych chromatogramów wskazuje, że związek C-1748 jest znacznie słabiej podatny na przemiany enzymatyczne, niż pochodna C-857. Po 10 minutach trwania reakcji powstają tylko 4 główne metabolity, a stopień przereagowania jest znacznie niższy, niż dla związku C-857.

## A) CYP1A

start reakcji

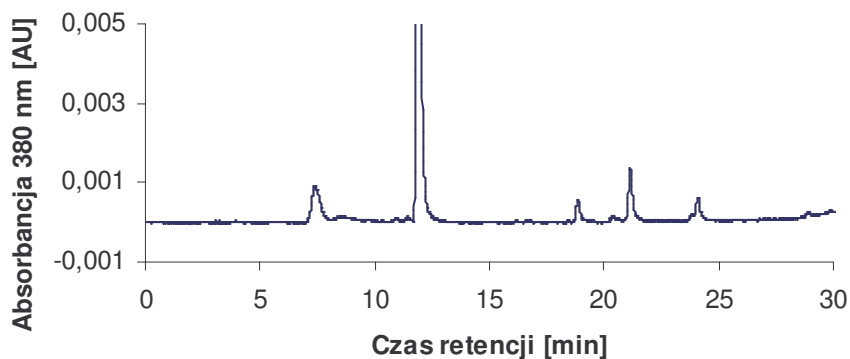


10 minut reakcji

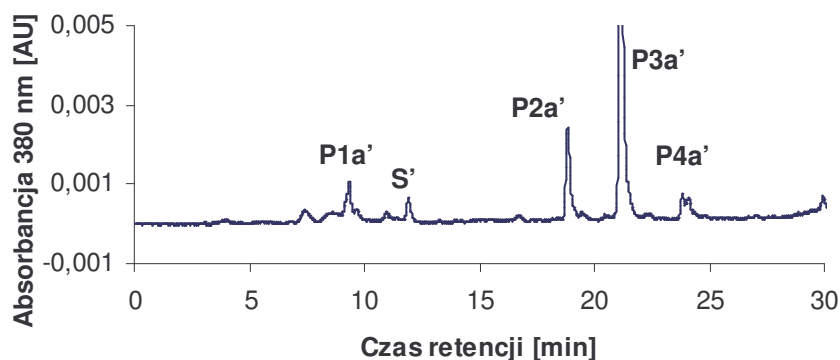


## B) CYP4A

start reakcji

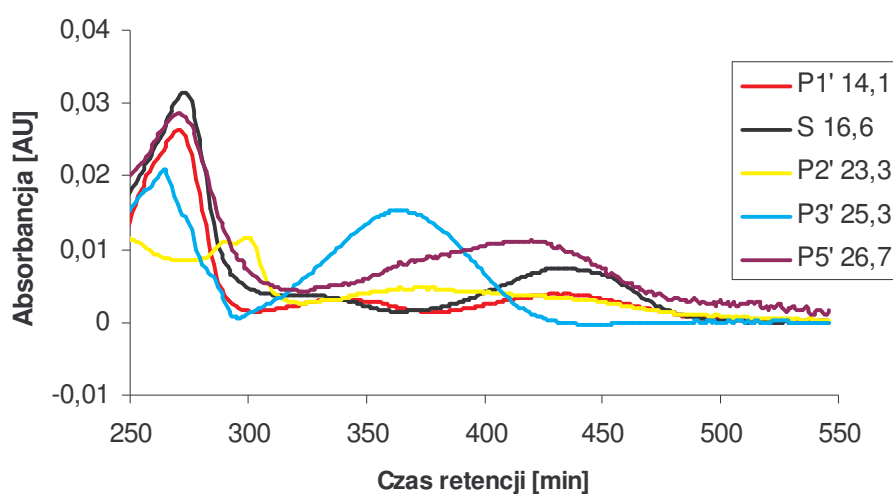


10 minut inkubacji



Rys.74. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml enzymów o nadekspresji wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 wyizolowanych z komórek wątroby szczura, 10 minut reakcji A ) CYP1A, B ) CYP4A.

Można zauważyć, że związek C-1748 jest znacznie bardziej reaktywny w obecności enzymów mikrosomalnych z podwyższonym poziomem wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450, niż wobec mieszaniny różnych enzymów mikrosomalnych. Ponadto wykazałam, że związek C-1748 jest znacznie bardziej podatny na przemiany enzymatyczne w obecności CYP4A, niż CYP1A (rys. 74) oraz CYP2B i CYP3A (wynik nieprzedstawiony). Jednak niezależnie od rodzaju rodziny izoenzymów cytochromu podczas biotransformacji związku C-1748 powstają 4 wspólne produkty, z których P3'=P3a' powstaje w najwyższym stężeniu. Warto zauważyć, że powstające produkty mają zmienioną w stosunku do substratu strukturę chemiczną chromoforu akrydynowego, o czym świadczą przedstawione na rys.75 zróżnicowane widma UV-VIS wykonane dla poszczególnych pików chromatograficznych.



Rys.75. Widma UV-VIS metabolitów związku C-1748 powstające w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura.

Ogólnie, porównując reaktywność związków C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych, wykazałam, że ostatni z nich ma niższą podatność na przemiany enzymatyczne zarówno ze względu na szybkość przemiany substratu, jak i ilości metabolitów. W obecności białek mikrosomalnych z podwyższonym poziomem wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 obserwujemy wyższą reaktywność związku C-1748, ale w dalszym ciągu jest ona niższa, niż w przypadku pochodnej C-857.

#### 4.1.3 Przebieg reakcji Ledakrinu wobec frakcji enzymów mikrosomalnych indukowanych w wątrobie szczurów

Kontynuując badania nad biotransformacją nowej generacji pochodnych 1-nitroakrydyny postanowiłam także porównać reaktywność Ledakrinu w obecności



enzymów mikrosomalnych o podwyższonej ekspresji wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 tj. CYP1A, CYP2B, CYP3A i CYP4A, gdyż jak wspomniano we wstępie przemiany metaboliczne Ledakrinu wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych zbadane zostały wcześniej [21,22].

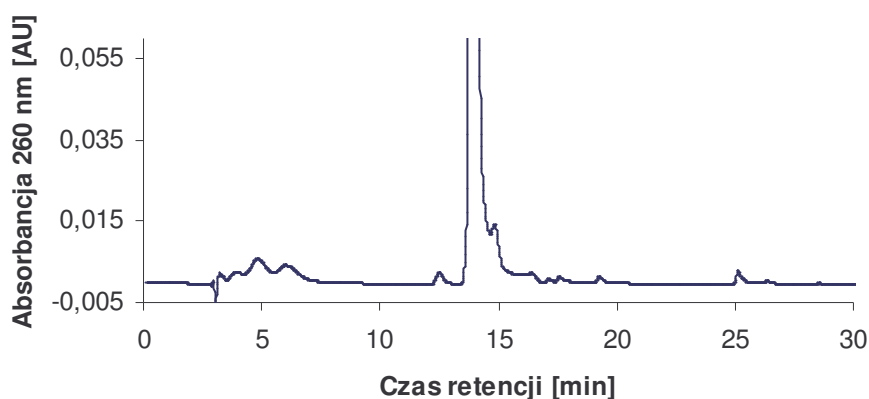
Optymalne warunki prowadzenia reakcji biotransformacji Ledakrinu były następujące:

- ◆ 1 mM Ledakrin:
- ◆ 4 mM NADPH
- ◆ 2 mg/ml enzymu
- ◆ roztwór buforowy RM

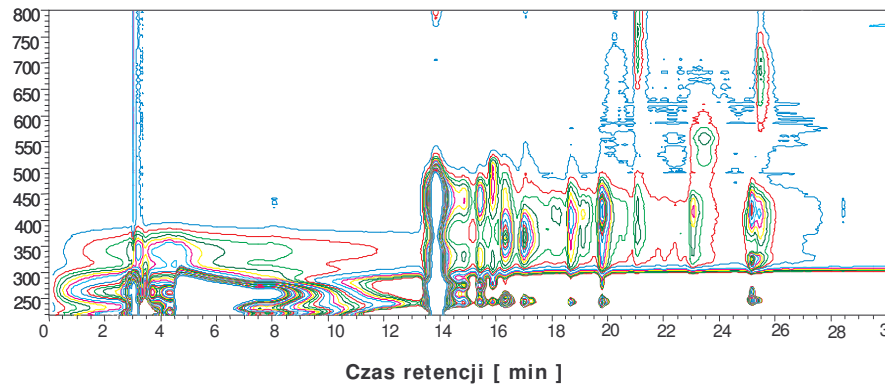
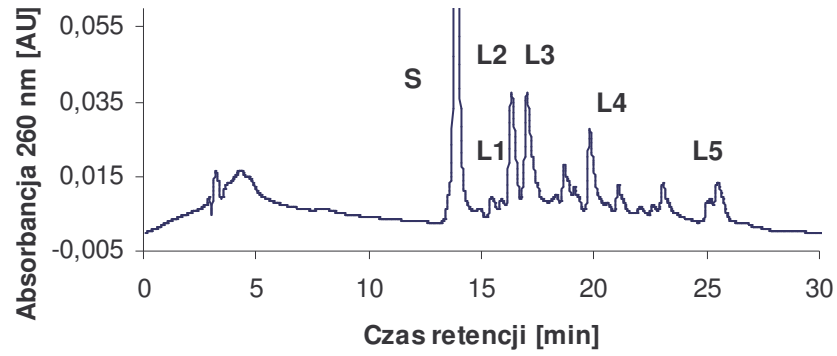
Przebieg reakcji opisałam w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.1. Badania przemian Ledakrinu rozpoczęłam od obserwacji zmian ilości metabolitów powstających w obecności białek o wyższym stężeniu izoenzymów z rodziny CYP1A. Obraz przebiegu tej reakcji przedstawiłam na rys.75A. Umieściłam tam poza „klasycznymi” chromatogramami również tzw. obrazy poziomicowe, gdzie na osi y przedstawiona jest długość fali, a intensywność pików chromatograficznych pokazana jest w postaci poziomic. Skład mieszaniny otrzymanej po reakcji Ledakrinu z pozostałymi enzymami mikrosomalnymi z podwyższonym poziomem izoenzymów cytochromu P450 przedstawiłam w dalszych częściach rys.76.

#### Ledakrin A ) CYP1A

start reakcji

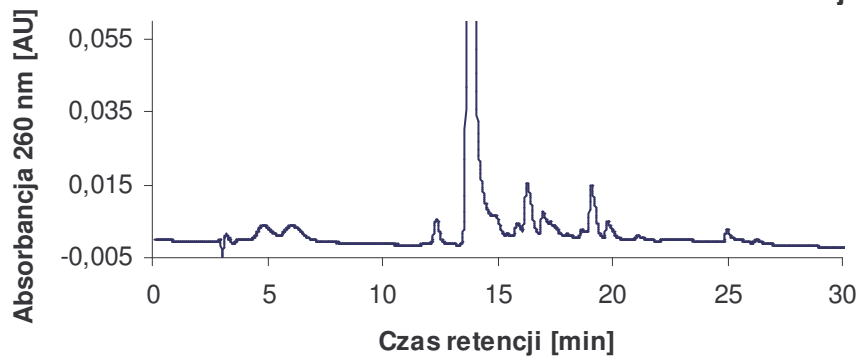


60 minut inkubacji

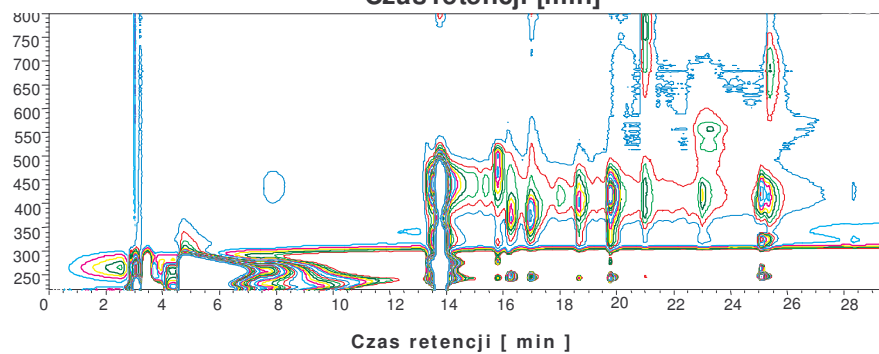
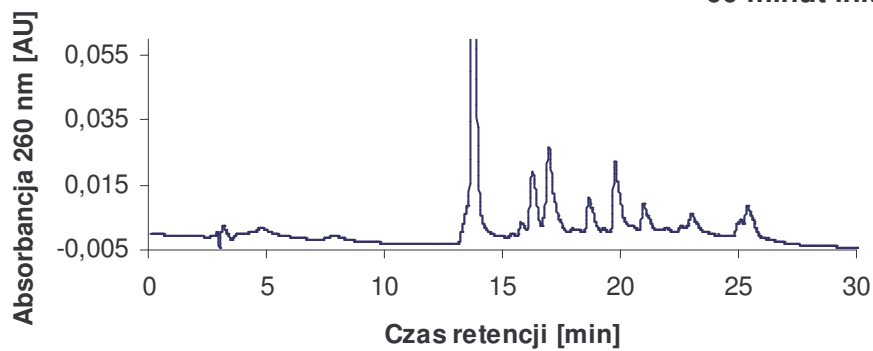


B ) CYP2B

start reakcji

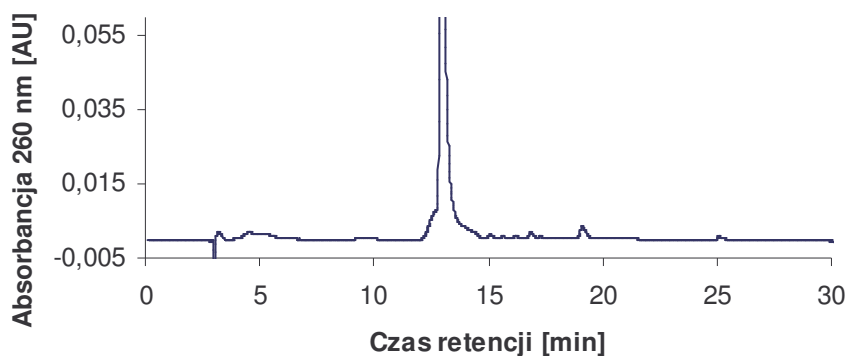


60 minut inkubacji

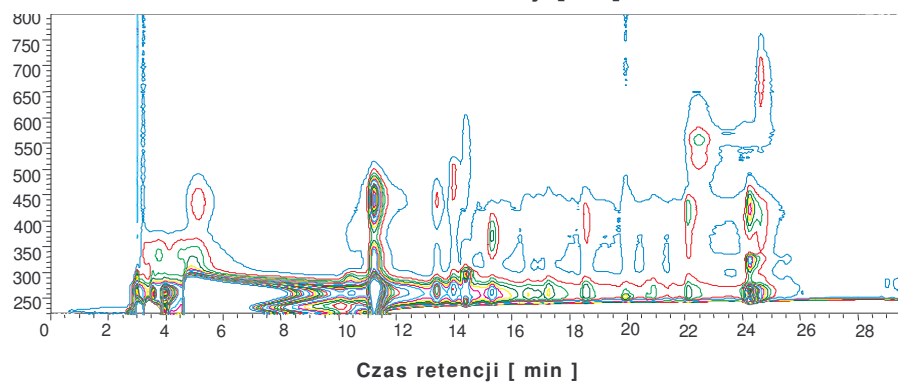
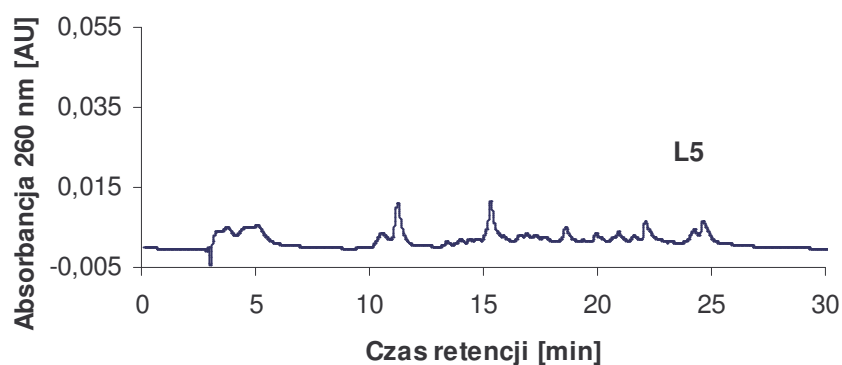


C ) CYP3A

start reakcji

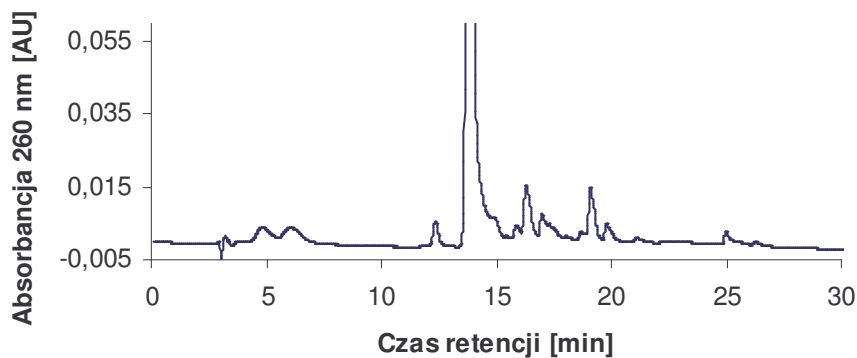


60 minut inkubacji

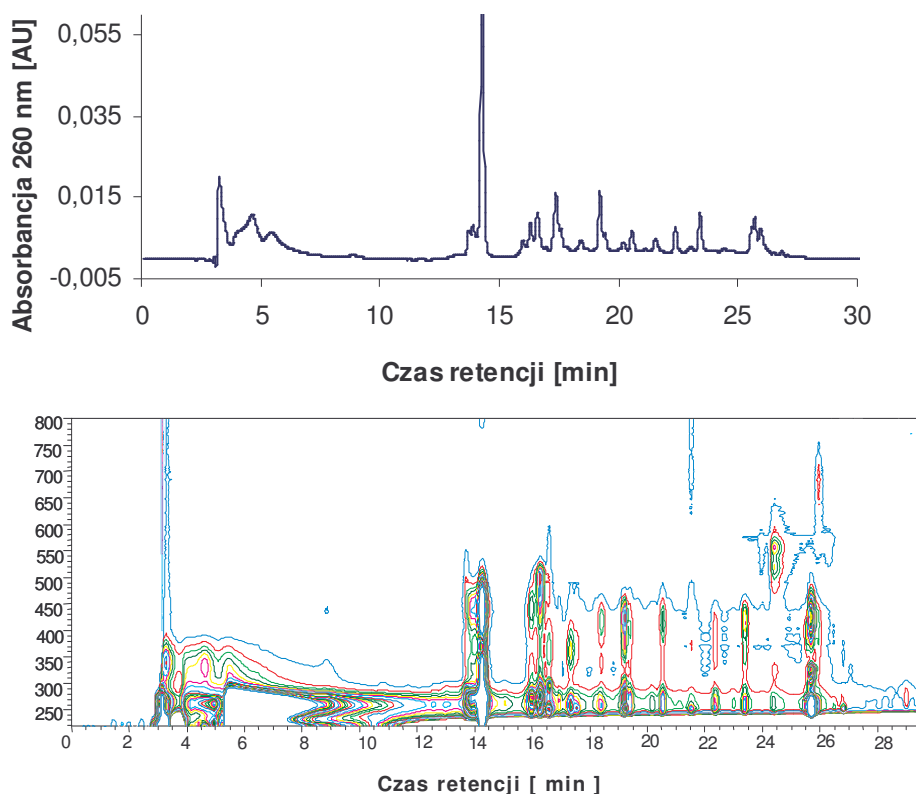


D ) CYP4A

start reakcji



## 60 minut inkubacji



Rys.76. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej 1 mM Ledakrin, 4 mM NADPH, 2 mg/ml enzymów o nadekspresji wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 wyizolowanych z komórek wątroby szczura, 60 minut reakcji: A ) CYP1A, B ) CYP2B, C ) CYP3A i D ) CYP4A.

Jak wynika z przedstawionych chromatogramów Ledakrin jest wrażliwy na przemiany metaboliczne wobec wszystkich frakcji enzymów mikrosomalnych tj. CYP1A, CYP2B, CYP3A i CYP4A, w wyniku czego powstaje wiele metabolitów o zróżnicowanych widmach UV-VIS. Tempo przemian Ledakrinu zależy jednak od rodzaju izoenzymu. Najwyższy stopień przereagowania substratu obserwujemy w przypadku CYP3A. Po 60 minutach reakcji przereagowuje prawie cały substrat, ale stężenie powstających produktów jest niższe, niż obserwowane przy słabszym przereagowaniu substratu. Podobny obraz występował wcześniej podczas metabolizmu C-857, ale w przypadku przemian Ledakrinu wobec CYP3A „znikanie” metabolitów z chromatogramów jest prawie całkowite.

Charakterystyczne dla enzymatycznej aktywacji Ledakrinu są produkty absorbujące światło przy długości fali 600 nm. Powstają one w obecności wszystkich badanych rodzin izoenzymów, a w szczególności wobec rodziny CYP1A i CYP2B.

## 4.2 Badanie produktów przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w modelowym układzie redukcji chemicznej w obecności ditiotreitolu (DTT)

Przeprowadzone dotychczas badania enzymatycznej aktywacji wybranych pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności różnych enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby szczura pozwoliły stwierdzić, że związek C-1748 jest mniej podatny na przemiany enzymatyczne, niż jego metylowy analog, pochodna C-857, a powstające metabolity są bardziej stabilne.

Celem dalszego etapu badań była identyfikacja powstających produktów. Niskie stężenie w mieszaninie reakcyjnej metabolitów po inkubacji z enzymami mikrosomalnymi uniemożliwiło badania ich struktur w tych warunkach. Podjęłam więc próbę określenia struktur chemicznych produktów redukcji badanych pochodnych 1-nitroakrydyny w układzie modelowym w obecności chemicznego czynnika redukcyjnego, jakim jest ditiotreitól (DTT). Związek ten stosowany był wcześniej w badaniach nad wiązaniem się Ledakrinu do DNA metodą  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Wykazano wówczas, że po reakcji z DTT powstawały takie same addukty z DNA, jak w obecności enzymów mikrosomalnych [21]. Wynik ten pozwolił przypuszczać, że niektóre produkty przemiany otrzymane z DTT będą identyczne jak te powstające w obecności enzymów mikrosomalnych. Badania chemicznej transformacji pochodnych 1-nitroakrydyny w układzie modelowym rozpoczęłam od porównania reaktywności związków C-857 i C-1748 w obecności DTT. Zastosowałam identyczne warunki prowadzenia reakcji, jak opisane wcześniej dla Ledakrinu [22].

- ◆ 1 mM C-857 lub C-1748
- ◆ 20 mM DTT
- ◆ roztwór buforowy Tris-HCl

Sposób postępowania opisałam w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.2.1. Podatność badanych związków na chemiczną redukcję w obecności DTT przedstawiłam w postaci histogramu obrazującego stopień przereagowania substratu po 10 i 20 minutach inkubacji w tych samych warunkach reakcji. Stopień przereagowania obliczyłam w oparciu o wzór (1):

Wzór (1)

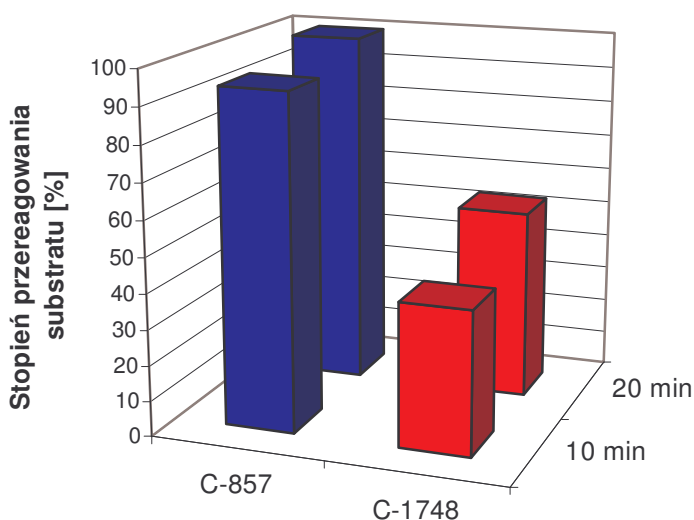
$$P = 100 - \frac{P_{10} \times 100}{P_0} [\%]$$

(1)

Gdzie:

- P - stopień przereagowania związku [%]  
 $P_{10}$  - pole powierzchni pod pikiem substratu po 10 minutach reakcji  
 $P_{20}$  - pole powierzchni pod pikiem substratu po 20 minutach reakcji  
 $P_0$  - pole powierzchni pod pikiem substratu na starcie reakcji

Otrzymane wyniki przedstawione na rys. 77 wskazują wyraźnie, że C-1748 jest wobec DTT, podobnie jak wobec enzymów mikrosomalnych znacznie słabiej reaktywny, niż jego analog bez grupy metylowej.



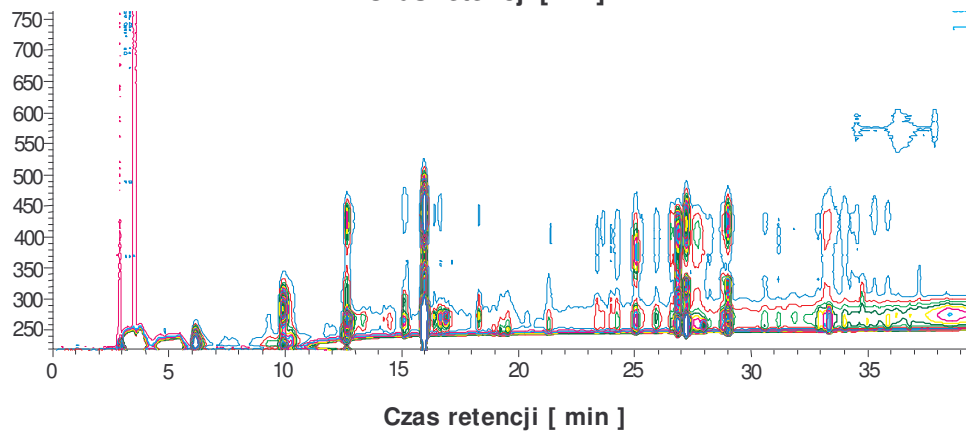
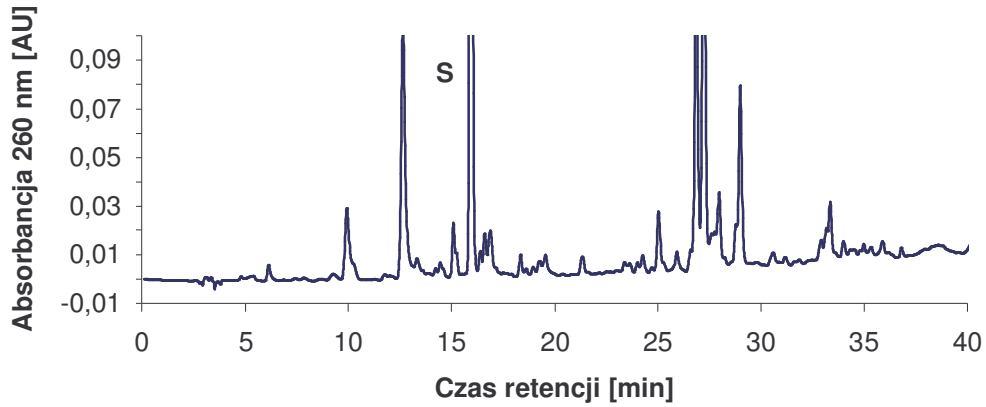
Rys.77. Stopień przereagowania C-857 i C-1748 w obecności DTT; 1 mM C-857 i C-1748, 20 mM DTT.

#### 4.2.1 Określenie struktur wybranych produktów związku C-857 z DTT

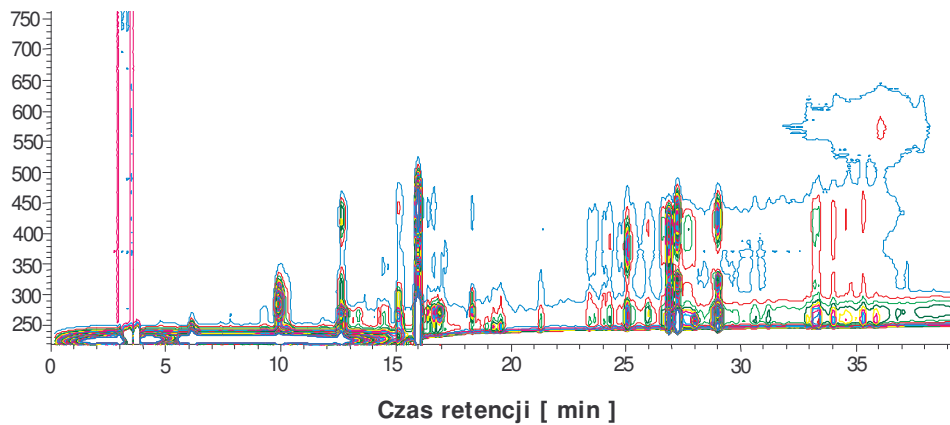
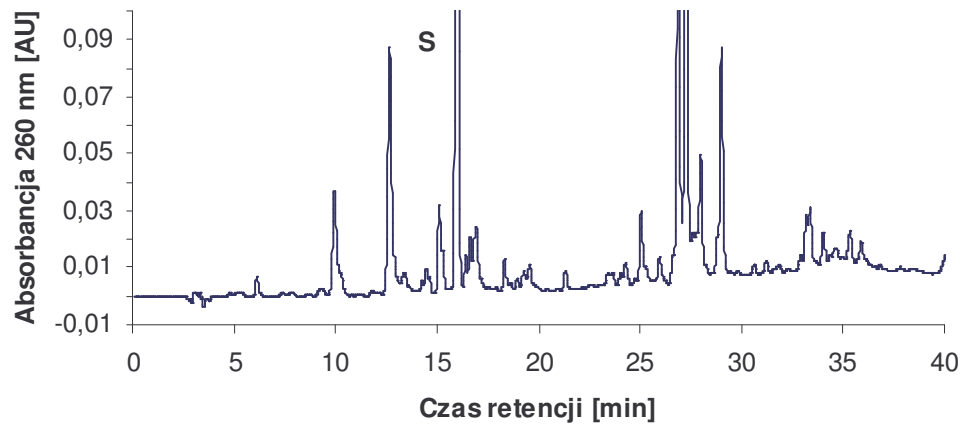
Zmierzając do znalezienia optymalnych warunków prowadzenia reakcji, w których powstawałoby maksymalnie dużo produktów określiłam wpływ czasu inkubacji na proces przemian związku C-857. Otrzymane chromatogramy mieszanin reakcyjnych dla pochodnej C-857 przedstawiłam na rys.78.

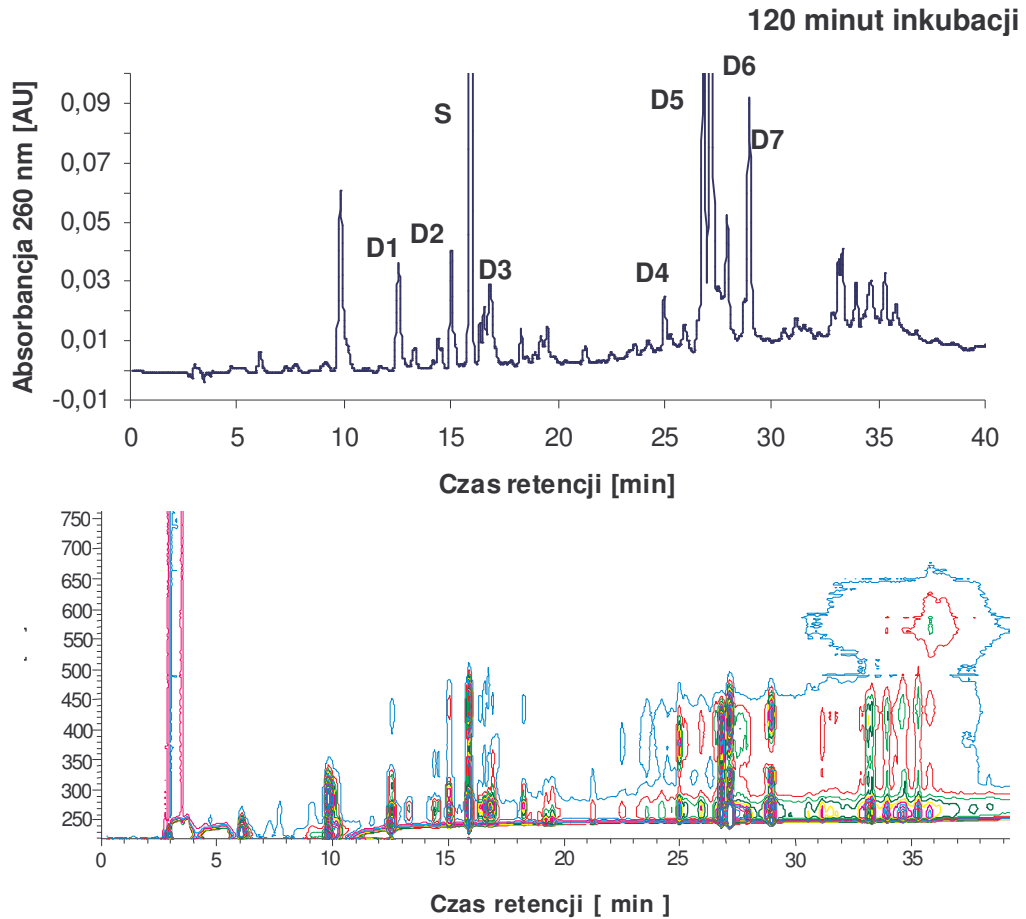
C-857

30 minut inkubacji



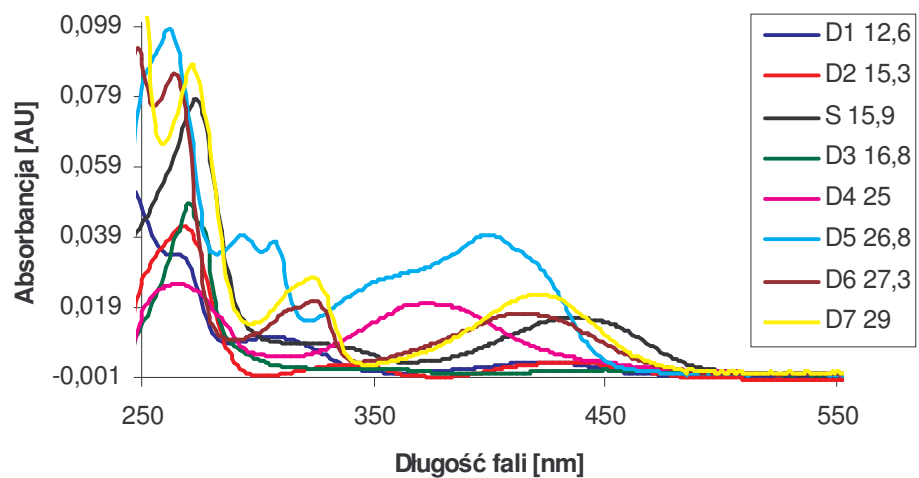
60 minut inkubacji





Rys.78. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej po 30, 60 i 120 minutach inkubacji 0,1 mM C-857, 2 mM DTT.

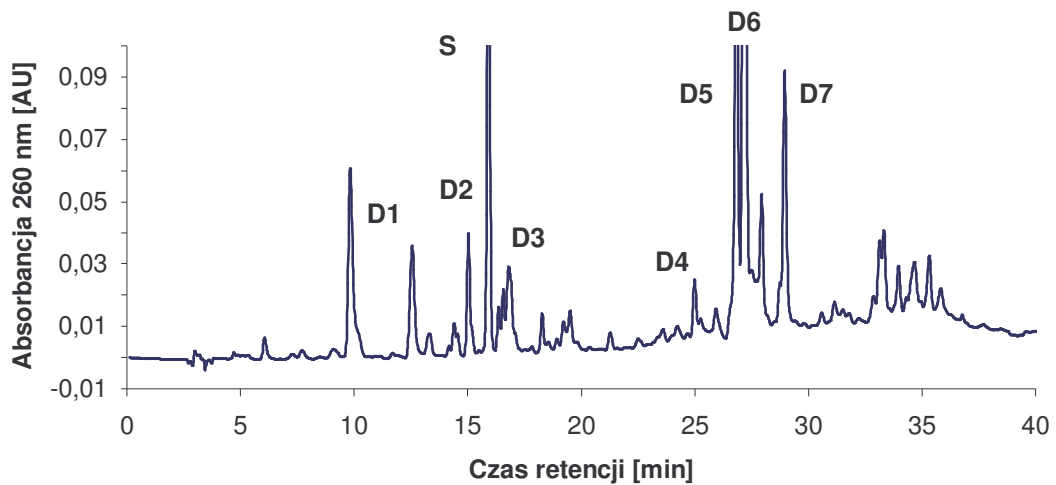
Transformacja związku C-857 w obecności DTT prowadzi do powstania wielu różnorodnych produktów, w tym 7 głównych. Ich widma UV-VIS przedstawione na rys.79 wskazują na obecność związków o zmienionej strukturze chromoforu, przy czym ważny jest fakt, że kilka widm produktów jest identycznych z otrzymanymi wcześniej po biotransformacji badanego związku w obecności enzymów mikrosomalnych.



Rys.79. Widmo UV-VIS substratu C-857 i jego produktów powstających w obecności DTT po 120 minutach inkubacji.

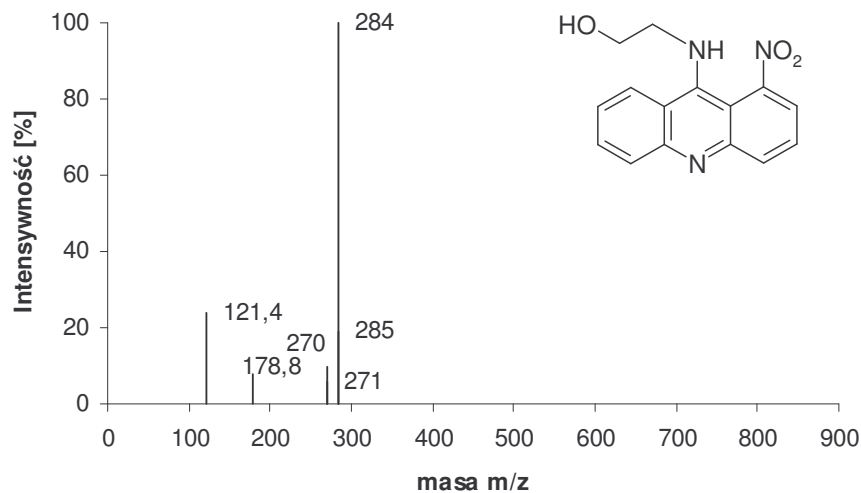


Podjęwając próbę określenia struktur chemicznych niektórych produktów przemian związku C-857 powstających w obecności DTT zastosowałam kilka technik identyfikacyjnych tj. HPLC-ESI-MS, MS/MS, a także w przypadku trwałych produktów spektroskopię MS o wysokiej rozdzielczości „High Resolution” – HR-MS. W wyniku analizy ESI-MS otrzymujemy jony masowe o ładunku dodatnim  $m/z = M+1$ ,  $m/z = M+2$ , a technika MS/MS, jony fragmentacyjne jonów molekularnych  $M+1$ . Natomiast HR-MS pozwala określić skład elementarny związku. Na rys.80 przedstawiłam chromatogram mieszaniny reakcyjnej, na podstawie którego określiłam widma ESI-MS powstających produktów.

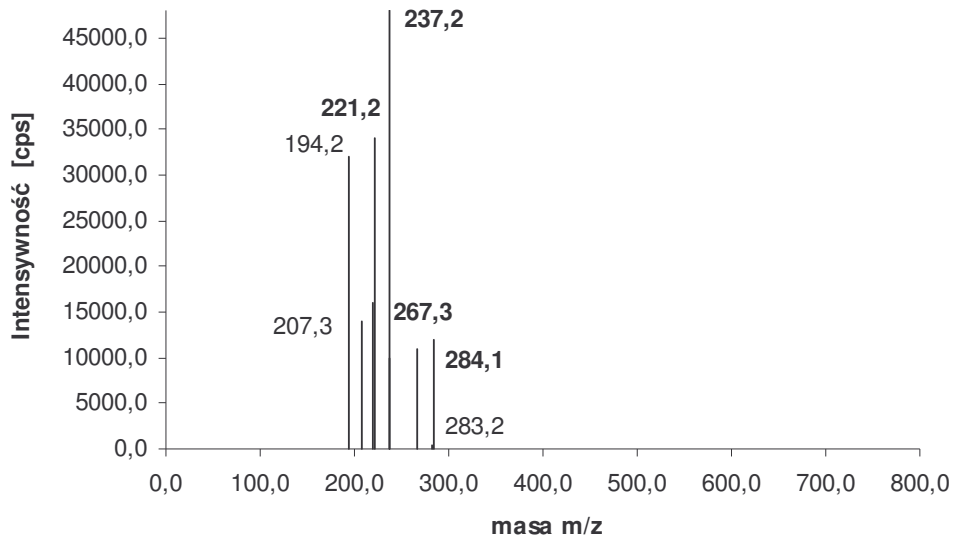


Rys.80. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej analizowanej techniką ESI-MS po 120 minutach inkubacji; 0,1 mM C-857, 2 mM DTT.

#### ◆ Analiza MS pików substratu S



Rys.81. Widmo masowe pików substratu S przy czasie retencji 15,9 min.



Rys.82. Widmo fragmentacyjne jonu *substratu*,  $m/z = 284$ .

Tabela 3. Jony fragmentacyjne jonu *substratu*  $m/z = 284$ .

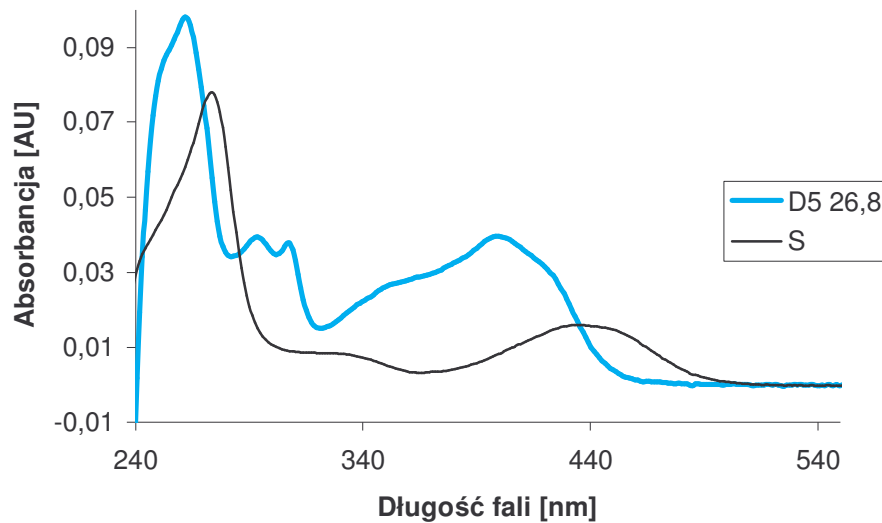
Jon fragmentacyjny ( $m/z$ )	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
267,3	M - 17	OH
237,2	M - 47	HNO <sub>2</sub>
221,2	M - 63	NO <sub>2</sub> , OH

Intensywny jon w widmie masowym piku substratu przedstawiony na rys. 81 to jon  $m/z = 284$ , co odpowiada wartości  $M+1$  dla substratu. Widmo fragmentacyjne dla jonu  $m/z = 284$  przedstawia rys.82. Otrzymane jony fragmentacyjne związku C-857 zestawiam w tabeli 3. Główny jon fragmentacyjny  $m/z = 237,2$  może powstawać przez odszczepienie od substratu cząsteczki HNO<sub>2</sub>, co wskazuje na obecność grupy nitrowej. Wartość jonu  $m/z = 221,2$  jest o 63 jednostki  $[M - 46-17]$  niższa od  $m/z$  substratu, co sugeruje, że prawdopodobnie odchodzi: grupa NO<sub>2</sub> z pierścienia akrydyny oraz podstawnik OH z łańcucha alkiloaminowego. Odszczepienie grupy OH zostało potwierdzone poprzez obecność jonu masowego  $m/z = 267,3$   $[M-17]$ .

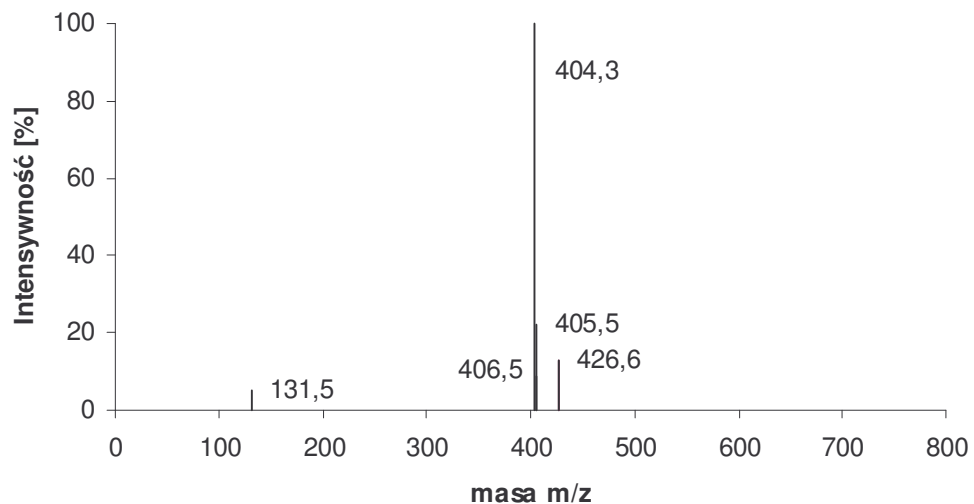
Obserwowane na chromatogramie (rys. 80) produkty redukcji związku C-857 można podzielić na dwie grupy różniące się polarnością i stabilnością. Nietrwale metabolity (D1-D4) powstające w niskim stężeniu oraz bardziej stabilne produkty przemian D5-D7, występujące w wyższym stężeniu, które udało się wyizolować z mieszaniny reakcyjnej.

◆ **Analiza struktury produktu zawartego w pikie D5.**

Jednym z wyróżniających się intensywnością produktów transformacji związku C-857 jest produkt reprezentowany przez pik o czasie retencji ok. 26,5 min. Jego widmo UV-VIS przedstawione na rys.83 wskazuje na strukturę o istotnie zmienionym układzie sprzężonych wiązań podwójnych, co może wskazywać na zmiany struktury w sąsiedztwie grupy nitrowej.



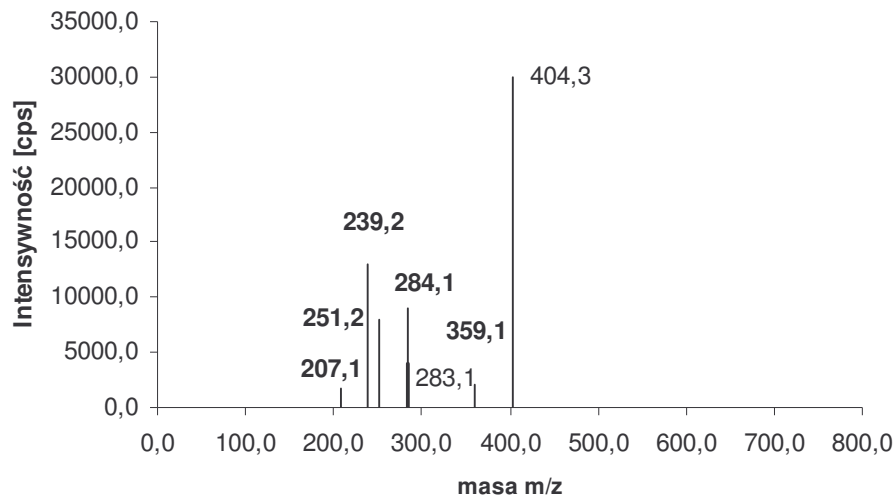
Rys.83. Widmo UV-VIS produktu **D5** powstającego przy czasie retencji 26,5 min.



Rys.84. Widmo ESI-MS pikie **D5** przy czasie retencji 26,5 min.

Widmo masowe pikie o czasie retencji 26,5min zawiera główny jon masowy  $m/z = 404,3$  (rys.84). Wartość ta jest o 120 jednostek wyższa od jonu masowego

substratu, ale na podstawie prostych obliczeń trudno zaproponować strukturę tego metabolitu. Wykonano zatem, widmo fragmentacyjne (rys. 85), a propozycję interpretacji tej fragmentacji przedstawiono w tab.4.



Rys.85. Widmo fragmentacyjne jonu molekularnego  $m/z = 404,3$ .

Tabela.4. Jony masowe powstające podczas fragmentacji produktu D5,  $m/z = 404,3$ .

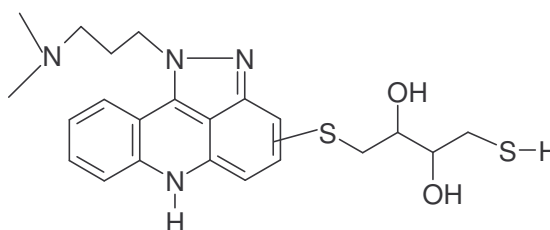
Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
359,1	M - 44	CH <sub>2</sub> CHOH
284,1	M - 120	CH <sub>2</sub> COHCHOHCH <sub>2</sub> SH
251,2	M - 153	SCHCHOHCHOHCH <sub>2</sub> SH (DTT)
239,2	M - 165 [-121 - 44]	CH <sub>2</sub> COHCHOHCH <sub>2</sub> SH + CH <sub>2</sub> CHOH
207,1	M - 197 [-153 - 44]	SCHCHOHCHOHCH <sub>2</sub> SH (DTT) + CH <sub>2</sub> CHOH

W widmie ESI-MS oprócz jonu molekularnego [M+1] występuje też jon [M+2], co może świadczyć o obecności atomu siarki w cząsteczce, a zatem o przyłączonej cząsteczce DTT. Spośród 5 głównych jonów fragmentacyjnych zestawionych w tabeli 4 dwa stanowią silną przesłankę, że jest to produkt z przyłączoną cząsteczką DTT. Wskazują one na odszczepienie całej cząsteczki DTT,  $m/z = 251,2$  [M-153], bądź jej fragmentu bez atomu siarki,  $m/z = 284,1$  [M-120]. Obecność łańcucha alkiloaminowego sugeruje natomiast jon:  $m/z = 359,1$  [M-44]. Ponadto dwa jony  $m/z = 239,2$  i  $m/z = 207,1$

można zaproponować jako wynik odszczepienia dodatkowo cząsteczki DTT albo jego fragmentu, jak przedstawiłam w tabeli 4.

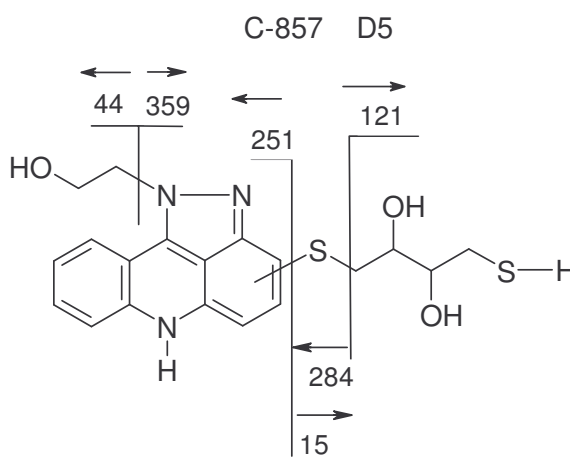
Powyższe wyniki wyraźnie wskazują na strukturę produktu i z zachowanym łańcuchem bocznymi przyłączoną do pierścienia akrydyny cząsteczką DTT. Nie ma natomiast prostej przesłanki dotyczącej podstawnika w pozycji 1. Masę jonu molekularnego  $m/z = 404,5$  porównano z wartościami  $m/z$  produktów przemian Ledakrinu z DTT, których struktury określono za pomocą widm NMR [22]. Uwzględniając różnice masy łańcucha bocznego ledakrinu i C-857 jon  $m/z = 404,5$  otrzymany dla C-857 jest analogiczny do otrzymanego jonu  $m/z = 445$  dla metabolitu Ledakrinu, którego strukturę przedstawiłam na rys. 86A. Jest to struktura, w której powstaje nowy heterocykliczny pierścień dihydropyrazolowy. Atom azotu grupy nitrowej utworzył wiązanie z drugim atomem azotu należącym do łańcucha bocznego cząsteczki C-857. Wobec tego na rys. 86B przedstawiono proponowany dla produktu D5 wzór strukturalny wraz prawdopodobną fragmentacją tej cząsteczki.

A)



Ledakrin P2  $m/z = 445$

B)



Rys.86. Struktury produktów przemian: A) Ledakrinu, [22]; P2  $m/z = 445$ ; B) C-857, D5  $m/z = 404,3$  wraz z możliwą fragmentacją.

Przedstawiona powyżej struktura chemiczna produktu D5 (rys. 86) została potwierdzona za pomocą widma wysokorozdzielczej spektroskopii masowej otrzymanego dla wyizolowanej z mieszaniny reakcyjnej (w warunkach chromatografii półpreparatywnej) frakcji pikowej produktu D5. Wyniki przedstawiłam w tabeli 5. Potwierdziły one zgodność

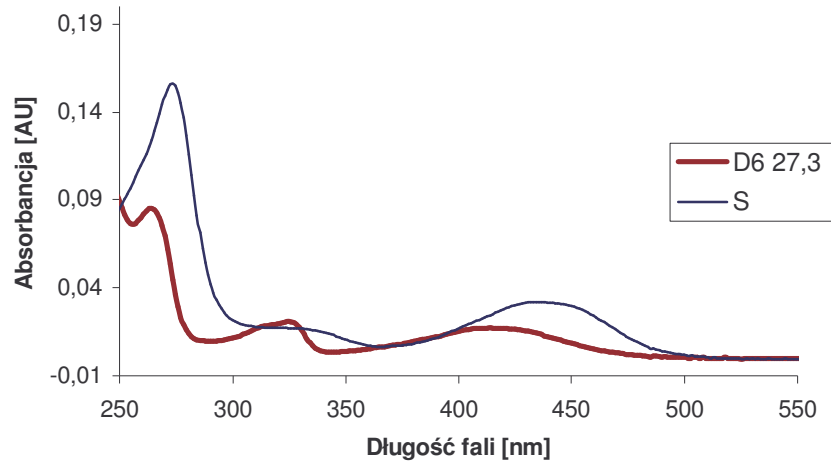
zmierzonej masy cząsteczkowej produktu o zaproponowanej strukturze z masą zakładaną na podstawie proponowanego wzoru sumarycznego z dopuszczalnym błędem oznaczenia 4,3 ppm. Graniczna wartość błędu oznaczenia masy cząsteczkowej badanego związku wynosi 10 ppm [147].

Tabela.5. Wyniki analizy HR-MS produktu **D5**,  $m/z = 404,1$ .

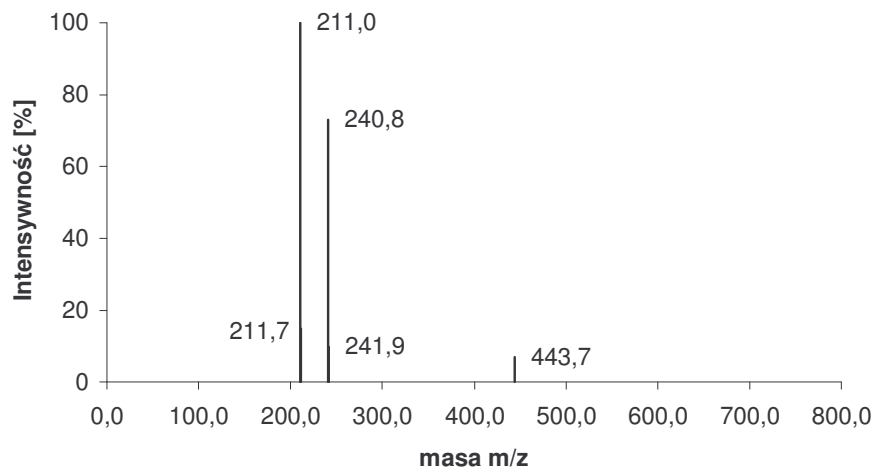
	Masa cząsteczki zmierzona [Da]	Masa cząsteczki obliczona [Da]	Błąd oznaczenia [mDa]	Błąd oznaczenia [ppm]	Wzór sumaryczny	Zgodność izotopowa
1	404,11145	404,11155	-0,1017	-0,2517	C5H14N19S2	0,994448
2	404,11145	404,11021	1,2356	3,0575	C4H18N15O4S2	0,990968
3	404,11145	404,1129	-1,4498	-3,5876	C8H22N9O6S32	0,994796
<b>4</b>	<b>404,11145</b>	<b>404,10971</b>	<b>1,7382</b>	<b>4,3012</b>	<b>C19H22N3O3S2</b>	<b>0,998829</b>
5	404,11145	404,11374	-2,2845	-5,6532	C9H18N13O2S2	0,994899

#### ◆ Analiza struktury produktu zawartego w pikie D6

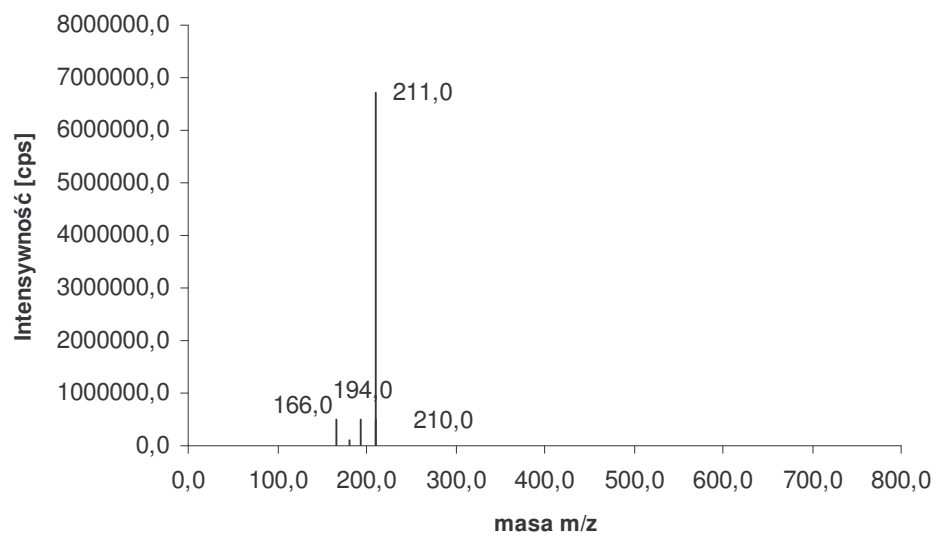
Bardzo charakterystycznym produktem przemian redukcyjnych związku C-857 jest produkt P6. Jego widmo UV-VIS zawiera wyraźne pasmo przy ok. 325 nm (rys. 87). HPLC-MS pikie P6 wykazało obecność dwóch jonów masowych: bardziej intensywnego  $m/z = 211$  oraz mniej intensywnego  $m/z = 240,8$ , co przedstawia rys.88. Obecność tych jonów masowych wskazuje na metabolity, które ze względu na bardzo zbliżone czasy retencji trudno było od siebie oddzielić podczas analizy HPLC. Spośród tych jonów to jon  $m/z = 211$  był w przewodzie i był trwały. Widmo masowe wyizolowanej w warunkach chromatografii preparatywnej frakcji pikie D6 zawierało intensywny jon masowy  $m/z = 211$ . Strukturę tego produktu zaproponowano wstępnie na podstawie trzech przesłanek tj. charakterystycznego widma UV-VIS, wartości jonu masowego  $m/z = 211$  oraz widma fragmentacyjnego MS/MS (rys. 89), które były identyczne, jak widma 1-aminoakrydonu otrzymanego w wyniku syntezy chemicznej.



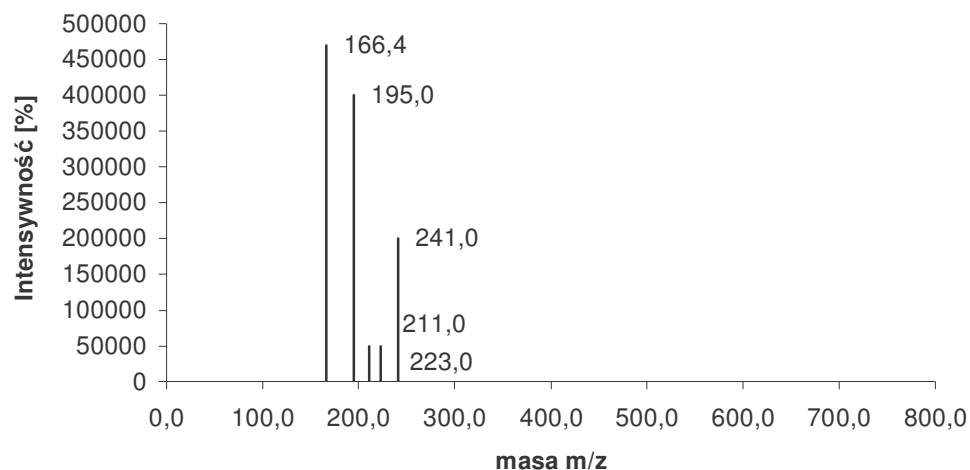
Rys.87. Widmo UV-VIS produktu **D6** wyizolowanego z mieszaniny reakcyjnej w warunkach chromatografii półpreparatywnej.



Rys.88. Widmo masowe piksu **D6** przy czasie retencji 27,5 min.



Rys.89. Widmo fragmentacyjne jonu molekularnego  $m/z = 211,0$ .



Rys.90. Widmo fragmentacyjne jonu molekularnego  $m/z = 241,0$ .

Ponadto widmo HR-MS frakcji chromatograficznej piksu D6 (tabela 6) wykazało obecność cząsteczki o identycznym wzorze sumarycznym i masie cząsteczkowej, co przedstawiłam w tabeli 6.

Tabela.6. Wyniki analizy HR-MS produktu D6,  $m/z = 211$ .

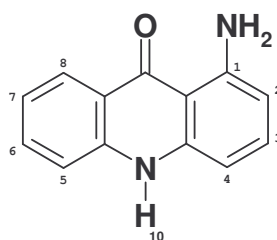
	Masa cząsteczki zmierzona [Da]	Masa cząsteczki obliczona [Da]	Błąd oznaczenia [mDa]	Błąd oznaczenia [ppm]	Wzór sumaryczny	Zgodność izotopowa
<b>1</b>	<b>211,08751</b>	<b>211.08659</b>	<b>0,9205</b>	<b>4,3607</b>	<b>C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O</b>	<b>0,995948</b>

Dla produktu D6 wykonane też zostało widmo  $H^1$  NMR oraz eksperymenty NOESY. Wartości przesunięć chemicznych poszczególnych protonów przedstawione w tabeli 7 potwierdzają obecność grupy aminowej w pozycji 1. Wykorzystanie eksperymentów NOE pozwoliło przyporządkować sygnały należące do protonów 4 i 5 oraz potwierdzić brak łańcucha bocznego w pozycji 9 pierścienia akrydyny.



Tabela 7. Wartości przesunięć chemicznych dla Ledakrinu i związku C-857 uzyskane podczas eksperymentu  $H^1$  NMR

Proton/grupa	Przesunięcie chemiczne (ppm)	
	1-amino-9-akrydon	C-857
2	6,26	8,26
3	7,25	8,28
4	6,44	8,12
5	7,37	7,85
6	7,61	7,98
7	7,14	7,63
8	8,1	8,56
10	11,3	11,8

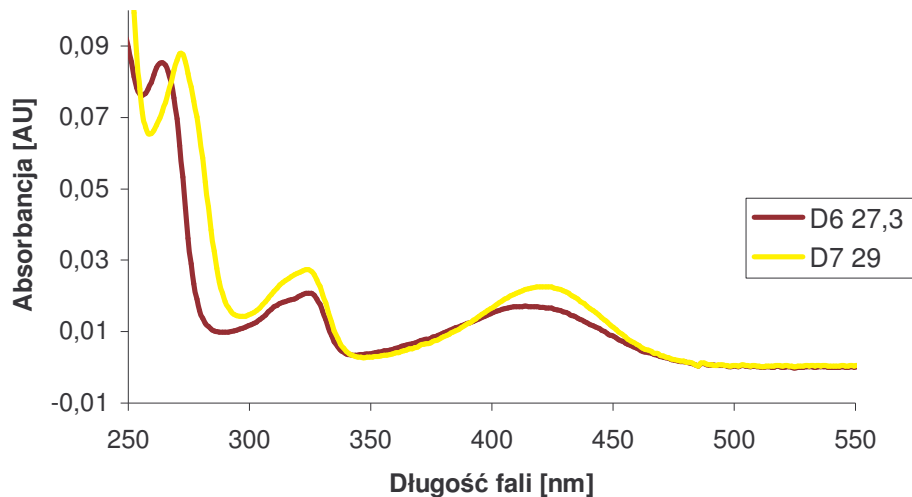


Rys.91. Struktura chemiczna produktu D6, 1-amino-9-nitroakrydonu.

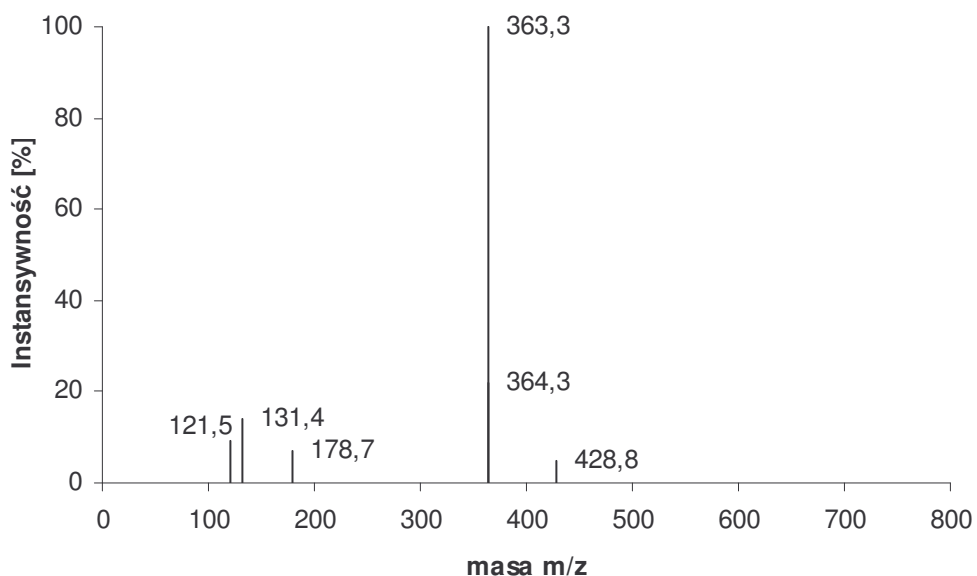
Przeprowadzone eksperymenty NMR potwierdziły, że wyizolowany przeze mnie produkt D6 ma strukturę 1-aminoakrydonu. Jest to pochodna związku C-857, która powstała po całkowitej redukcji grupy nitrowej w pozycji 1 pierścienia akrydyny do grupy aminowej i odszczepieniu aminoalkilowego łańcucha bocznego. Z wcześniejszych badań produktów redukcji Ledakrinu, wśród których również znajduje się ten produkt, wiadomo że atom tlenu w pozycji 9 pierścienia akrydyny pochodzi z grupy nitrowej znajdującej się w pozycji 1 pierścienia akrydyny, a nie z cząsteczki wody [21,22]. Wskazuje to na wpływ oddziaływań pomiędzy podstawnikami w pozycji 9 i 1 na przebieg transformacji tych związków, co zaobserwowano też np. dla omówionego wcześniej produktu P5 z dodatkowym pierścieniem dihydropyrazolowym.

◆ Analiza struktury produktu zawartego w pikie D7

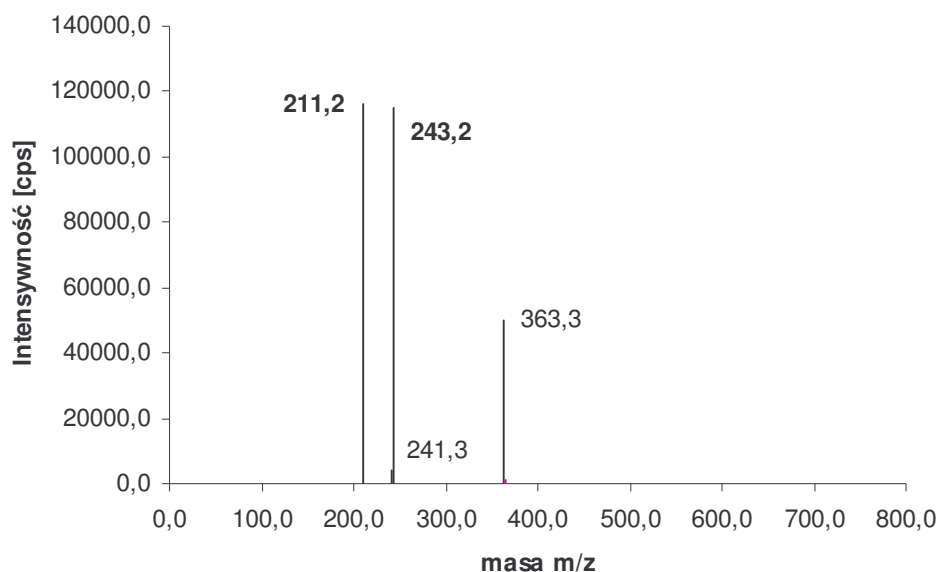
Widmo UV-VIS obu produktów D6 i D7 są zbliżone do siebie (rys.92). Główny jon masowy tego pikę przedstawiony na rys. 93 ma wartość  $m/z = 363,3$  i jest ona wyższa o 152 od wartości  $m/z$  poprzedniego produktu D6 [211+152]. Wyniki te wskazują na możliwość struktury 1-aminoakrydonu z przyłączoną cząsteczką DTT, co obrazuje rysunek 95.



Rys.92. Widmo UV-VIS produktów: **D6** (23,3min) i **D7** (29 min).



Rys.93. Widmo masowe pikę **D7** przy czasie retencji 29 min  $m/z = 363,3$ .

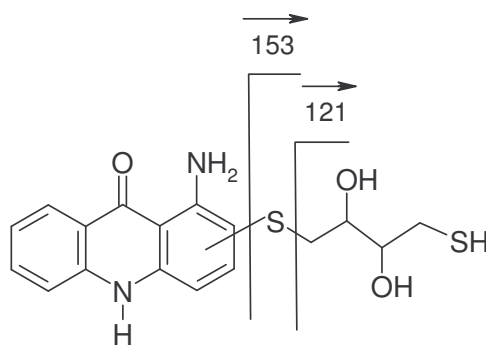


Rys.94. Widmo fragmentacyjne jonu molekularnego  $m/z = 363,3$ .

Natomiast przedstawione na rys. 94 widmo fragmentacyjne jonu  $m/z = 363$  zawiera dwa charakterystyczne jony masowe  $m/z = 243$  oraz  $m/z = 211$ . Różnice między tymi jonami, a jonem  $M+1$  wynoszą odpowiednio:  $[363-243=120]$  i  $[363-211=153]$ , co wskazuje na odszczepienie cząsteczki DTT (tab. 8) obecnej w strukturze D7. Proponowana struktura chemiczna produktu D7 została potwierdzona analizą HR-MS (tab. 9). Różnica między wartością zmierzoną i obliczoną na podstawie propozycji wzoru sumarycznego wynosi 4,03 ppm. Próby izolacji tego metabolitu w celu pełnej identyfikacji struktury chemicznej przy pomocy techniki NMR nie powiodły się.

Tabela 8. Jony masowe powstające podczas fragmentacji jonu molekularnego  $m/z = 363,3$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
243,2	$M - 120/121$	$\text{CH}_2\text{COHCHOHCH}_2\text{SH}$
211,2	$M - 153$	$\text{SCHCHOHCHOHCH}_2\text{SH}$ (DTT)



Rys.95. Struktura produktu D7,  $m/z = 363,3$  wraz z fragmentacją.

Tabela 9. Wyniki analizy HR-MS produktu D7,  $m/z = 363,1$ .

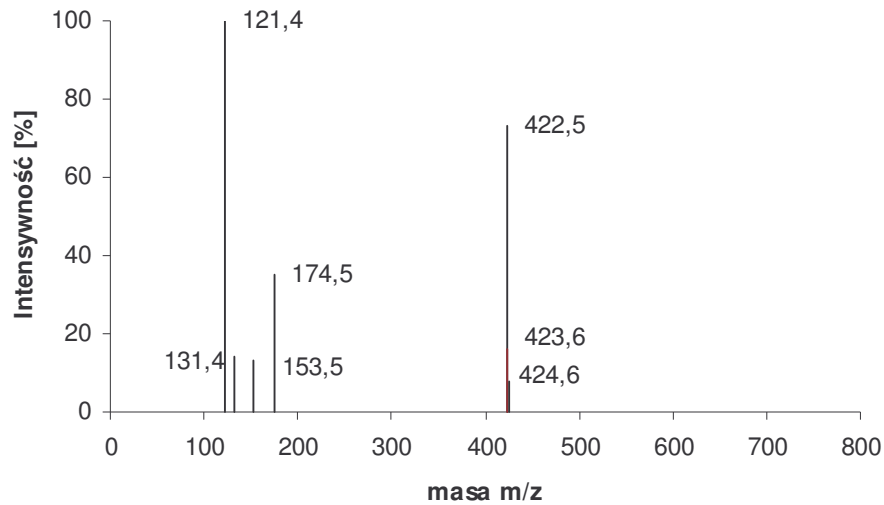
	Masa cząsteczki zmierzona [Da]	Masa cząsteczki obliczona [Da]	Błąd oznaczenia [mDa]	Błąd oznaczenia [ppm]	Wzór sumaryczny	Zgodność izotopowa
1	363,0817	363,08048	1,2227	3,3675	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	0,987861
<b>2</b>	<b>363,0817</b>	<b>363,08316</b>	<b>-1,4627</b>	<b>-4,0286</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub></b>	<b>0,986689</b>
3	363,0817	363,08367	-1,9653	-5,4128	C <sub>2</sub> H <sub>15</sub> N <sub>14</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	0,975247
4	363,0817	363,07914	2,56	7,0507	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	0,985308
5	363,0817	363,0850	-3,3026	-9,096	C <sub>3</sub> H <sub>11</sub> N <sub>18</sub> S <sub>2</sub>	0,981478

Na podstawie prezentowanych powyżej badań określiłam struktury chemiczne trzech produktów reakcji C-857 wobec DTT tj.: D5, D6 i D7. Poniżej przedstawię próby zaproponowania struktur chemicznych dla pozostałych produktów: D1-D4 obserwowanych podczas redukcji związku C-857 z DTT.

#### 4.2.2 Analiza HPLC z detekcją widm UV-VIS i ESI-MS dla pozostałych produktów

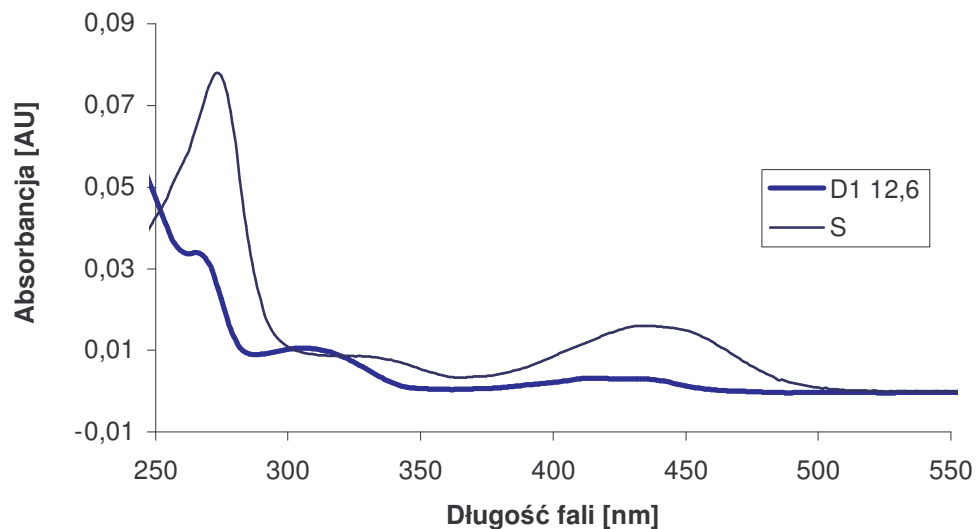
Produkty D1-D4 w przeciwieństwie do omówionych powyżej produktów: D5-D7 występowały w niskich stężeniach i były nietrwałe, co znacznie utrudniło ich identyfikację. W tych przypadkach propozycja struktury była oparta tylko na analizie HPLC-ESI-MS oraz MS/MS.

◆ Analiza struktury produktu zawartego w pikie D1



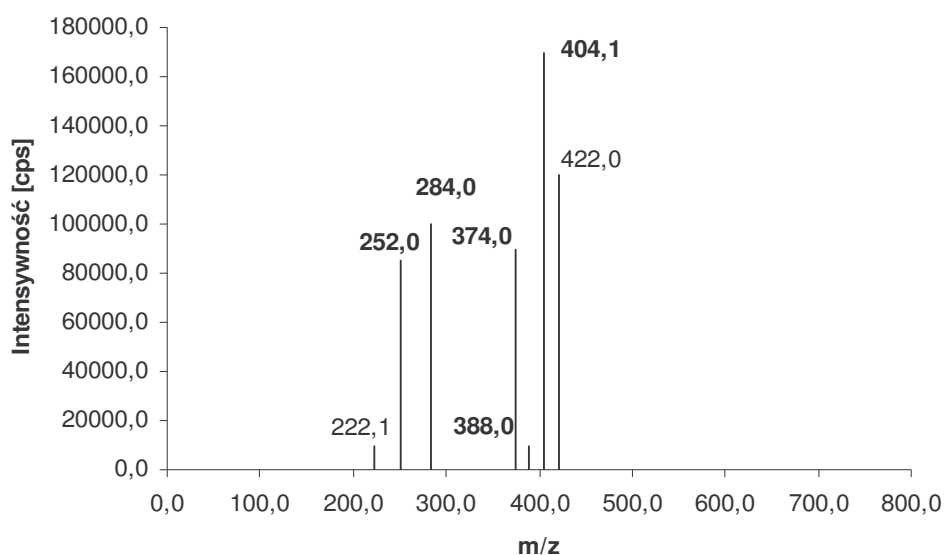
Rys.96. Widmo masowe pikie **D1** przy czasie retencji 12,5 min.

Analiza widma masowego pikie D1 wykazała obecność kilku jonów masowych o wartości  $m/z < 200$  oraz jon  $m/z = 422,5$ . Ostatnia wartość jest znacznie wyższa od  $m/z$  dla substratu i sugeruje, że jon ten pochodzi od produktu przyłączenia cząsteczki ditiotreitolu do pierścienia akrydyny. Obecność jonu  $M+2$  potwierdza obecność atomu siarki w cząsteczce. Przedstawione na rys. 97 widmo UV-VIS produktu D1 różni się nieznacznie od widma substratu, co wskazuje na ograniczone zmiany w strukturze chromoforu mogące być wynikiem: podstawienia atomu wodoru w pierścieniu grupą o niskiej elektroujemności lub zmiany właściwości podstawnika np. grupy nitrowej.



Rys.97. Widmo UV-VIS produktu **D1** powstającego przy czasie retencji 12,5 min.

Wydaje się, iż związek D1 jest prawdopodobnie produktem przyłączenia cząsteczki DTT do pierścienia akrydyny zaktywowanego metabolizowaną grupą nitrową. Gdyby było to podstawienie w niezmienionej cząsteczce C-857, m/z powinno być równe 436. Skoro m/z = 422,5, czyli [436-14], to prawdopodobny jest brak w cząsteczce jednego atomu tlenu z przyłączeniem 2 protonów, czyli produkt o zredukowanej grupie nitrowej do hydroksyloaminowej, NHOH.



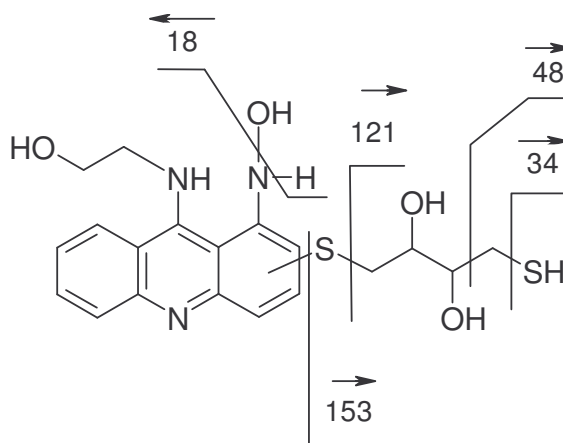
Rys.98. Widmo fragmentacyjne D1, m/z = 422,0.

Powyższe przypuszczenia znajdują swoje potwierdzenie w analizie jonów fragmentacyjnych produktu D1 (rys.98), które wraz z interpretacją wartości odpowiednich jonów fragmentacyjnych zebrano w tabeli 10.

Tabela.10. Jony masowe powstające podczas fragmentacji jonu molekularnego, m/z = 422,5

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
404,1	M - 18	H <sub>2</sub> O
388,0	M - 34	H <sub>2</sub> S
374,0	M - 48	CH <sub>3</sub> SH
284,0	M - 138 [-121-17]	CH <sub>2</sub> COHCHOHCH <sub>2</sub> SH + OH
252,0	M - 170 [-153 - 17]	SCHCHOHCHOHCH <sub>2</sub> SH (DTT) + OH

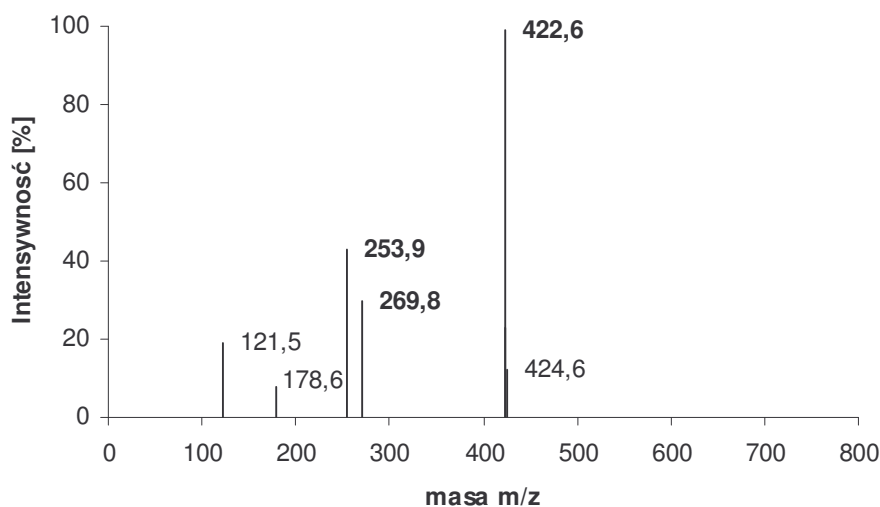
Cechą charakterystyczną widma fragmentacyjnego produktu D1 jest intensywny pik jonu [M-18] wskazujący na odszczepienie cząsteczki H<sub>2</sub>O. Fakt ten wraz z niską trwałością frakcji tego piku stanowią silną przesłankę, że produkt D1 posiada podstawnik hydroksyloaminy w pozycji 1 pierścienia akrydyny. Natomiast pozostałe jony sugerujące odszczepienie różnych fragmentów zawierających atom siarki tj. H<sub>2</sub>S [m/z =388], czy cząsteczki DTT wraz z OH [m/z =252] lub DTT pozbawionego atomu siarki [m/z = 284] wyraźnie wskazuje na strukturę akrydyny z przyłączoną do pierścienia cząsteczką DTT (rys.99).



Rys.99. Proponowana struktura chemiczna produktu **D1**, m/z =422,0.

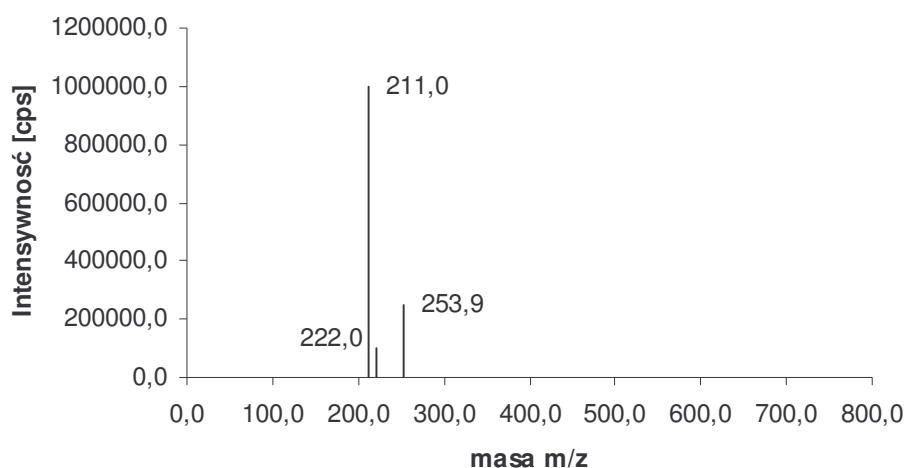
#### ◆ Analiza strukturalna produktu zawartego w piku D2

Redukcja związku C-857 prowadzi też do powstania piku D2 o czasie retencji 14,2 min. W widmie ESI-MS tego piku pojawiają się trzy charakterystyczne jony masowe: m/z = 422,6 m/z =269,8 i m/z = 253,9 (rys. 100).



Rys.100. Widmo masowe piku **D2** przy czasie retencji 14,2 min.

Można przyjąć, że wartość pierwszego z jonów,  $m/z = 422,6$  odpowiada strukturze produktu D1, który również występuje w pikie D2. Wartość ta jest o 153 jednostki wyższa od  $m/z = 269,6$ , a ta z kolei o 16 jednostek wyższa od wartości masy  $m/z = 253,9$ . Proste zależności liczbowe oraz proporcje intensywności tych trzech jonów masowych sugerują, że pik D2 może powstawać z produktu D1. Również badania kinetyki reakcji redukcji związku C-857 wobec DTT wykazały spadek stężenia produktu D1 i wzrost intensywności pikie D2 (rys. 78). Jon  $m/z = 269,8$  ma wartość o 16 a jon  $m/z = 253,9$  o 30 jednostek niższą od wartości  $m/z$  substratu, co wskazuje, że może powstawać produkt pozbawiony jednego albo dwóch atomów tlenu z dodatkowymi atomami wodoru  $[M-16+2]$   $[M-32+2]$ , a więc cząsteczka o zredukowanej grupie nitrowej odpowiednio do NHOH i  $NH_2$ , jak przedstawiłam na rys.102.



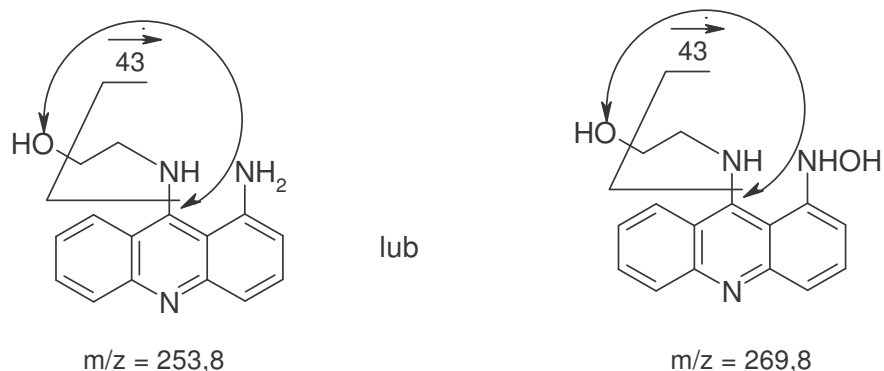
Rys.101. Widmo fragmentacyjne produktu **D2**,  $m/z = 253,9$ .

Tabela 11. Jon masowy powstający podczas fragmentacji jonu molekularnego  $m/z = 253,9$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
211,0	M - 43	$CH_2CHNH_2$

Charakterystyczna jest wartość jonu fragmentacyjnego  $m/z = 211$ , co można wyrazić jako M-43, a nie M-44, co z kolei wskazuje, że fragmentem odchodzącym jest nie  $CH_2CHOH$ , a -  $CH_2CHNH_2$ .

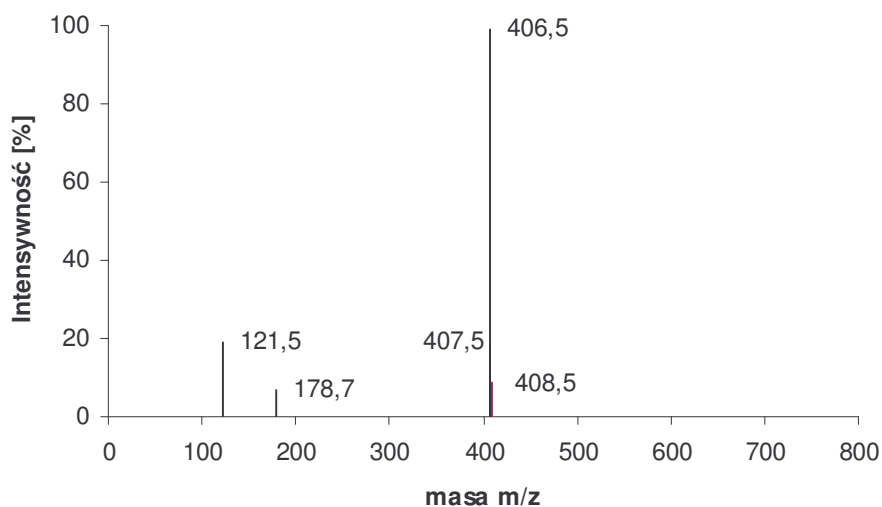




Rys.102. Proponowane struktury produktu **D2**,  $m/z = 253,9$  i  $m/z = 269,8$ .

Niskie stężenie i nietrwałość produktu D2, a przede wszystkim brak syntetycznego wzorca uniemożliwiło udowodnienie proponowanej struktury chemicznej za pomocą innych technik identyfikacyjnych jak: HR-MS, czy NMR.

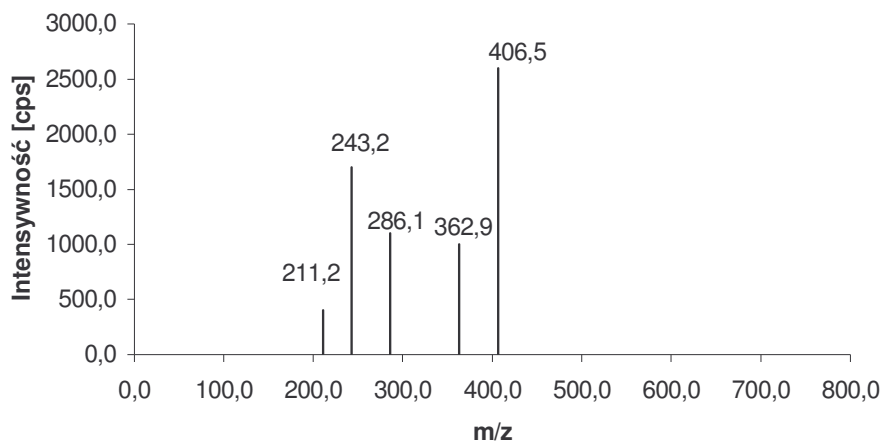
♦ **Analiza strukturalna produktu zawartego w pikie D3**



Rys.103. Widmo masowe pikie **D3** przy czasie retencji 16,5 min.

Kolejnym pikem chromatograficznym, który poddałam analizie ESI-MS jest pik D3 o czasie retencji ok. 16,5 min. Pik tego produktu podobnie jak D1 i D2 ma niską intensywność i jest nietrwały, co uniemożliwiło jego izolację i utrudniło identyfikację pełnej struktury chemicznej produktu. Wartość jonu masowego wynosi  $m/z = 406,5$  i jest wyższa o 123 od wartości jonu masowego substratu i o 2 jednostki wyższa od opisanego wcześniej jonu masowego produktu D5  $m/z = 404,5$ . Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że produkt D3 zawiera w porównaniu z D5 dwa dodatkowe atomy wodoru i podobnie, jak metabolit D5 cząsteczkę DTT.

Na podstawie tych informacji dla produktu D3 zaproponowałam strukturę z grupą aminową i przyłączoną cząsteczką DTT, którą przedstawiłam na rysunku 105.



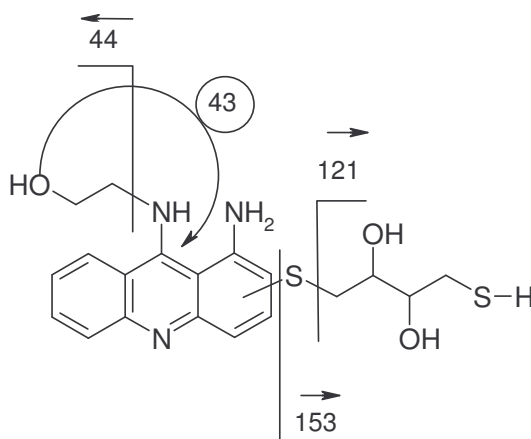
Rys.104. Widmo fragmentacyjne produktu **D3**,  $m/z = 406,5$ .

Tabela 12. Jony masowe powstające podczas fragmentacji jonu molekularnego  $m/z = 406,5$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
362,9	M - 43	CH <sub>2</sub> CH NH <sub>2</sub>
286,1	M - 120/121	CH <sub>2</sub> COHCHOHCH <sub>2</sub> SH
243,2	163 [-120/121 - 43]	CH <sub>2</sub> COHCHOHCH <sub>2</sub> SH CH <sub>2</sub> CHNH <sub>2</sub>
211,2	195 [-153 - 43]	SCHCHOHCHOHCH <sub>2</sub> SH (DTT) CH <sub>2</sub> CH NH <sub>2</sub>

Widmo pików D3 zawiera oprócz jonu M+1  $m/z = 406,5$  także jon [M+2],  $m/z = 408,5$ , a tym samym wskazuje na obecność atomu siarki w analizowanej cząsteczce. Jon masowy  $m/z = 286$  [M-120], wskazuje jak opisałam poprzednio, na pękanie wiązania między atomem siarki i węglem i odszczepianie od pierścienia akrydyny cząsteczki DTT pozbawionej atomu siarki (tab. 12). Podobnie powstaje jon  $m/z = 243$  [M-120-43], przy czym zachodzi dodatkowa fragmentacja łańcucha aminoalkilowego [M-43], ale jak dla pików D2, atom tlenu pozostaje w cząsteczce. Z kolei wartość  $m/z = 211$  powstaje po odjęciu od masy substratu wartości 153 i 42 czyli następuje fragmentacja całej cząsteczki DTT, jak przedstawiłam wcześniej w tab. 10 i łańcucha bocznego w sposób opisany poniżej. Zwraca uwagę, że jony  $m/z = 362,9$ ,  $243,2$  i  $211,2$  mają w przeciwieństwie do

$m/z = 286$  wartość nieparzystą, czyli w sfragmentowanej cząsteczce znajduje się parzysta liczba atomów azotu, co świadczy o odejściu fragmentu łańcucha z grupą aminową, a nie hydroksylową. Można przypuszczać, że jest to wynikiem przegrupowania łańcucha bocznego podczas fragmentacji  $[M-43]$ . Na rys. 105 przedstawiłam strukturę chemiczną wraz z możliwą fragmentacją produktu D3.

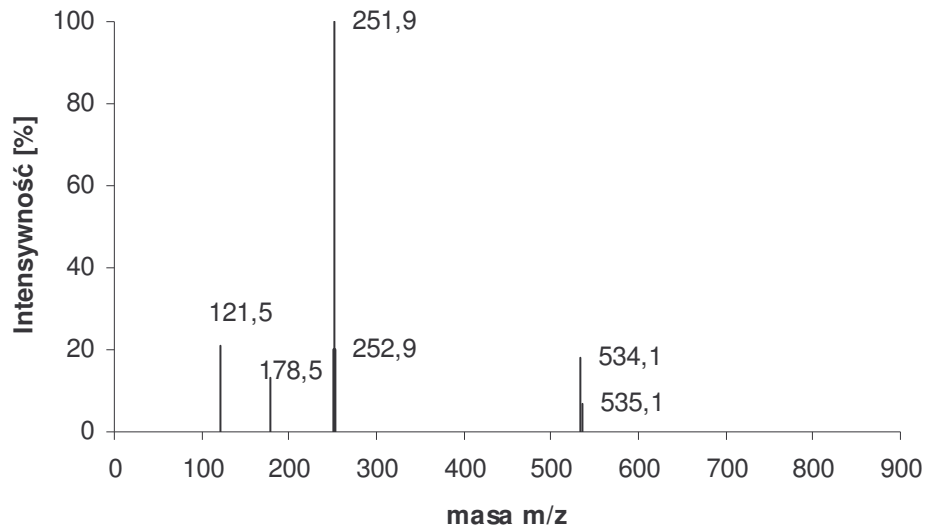


Rys.105. Proponowana struktura produktu D3,  $m/z = 406,5$ .

Przeprowadzone badania kinetyki reakcji związku C-857 z DTT wykazały zależność między ilością produktu D3 i produktu D5 (rys. 78). Ilość produktu D3 maleje kosztem powstającego produktu D5 oraz innych produktów metabolizmu, co sugeruje, że metabolit D3 ulega dalszej reakcji tworząc produkt D5 z utworzeniem wiązania między atomami azotu w pozycji 1 i 9.

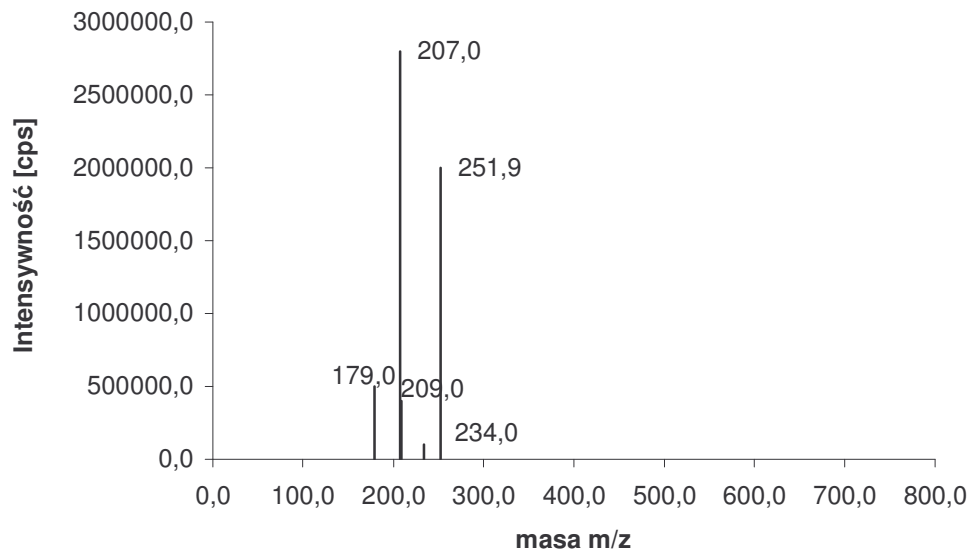
#### ♦ Analiza strukturalna produktu zawartego w pikie D4

Na chromatogramie obrazującym przemiany C-857 o czasie retencji ok. 25 min zaobserwowałam dla słabo intensywnego pikie D4 jon masowy  $m/z = 252$ . Wartość  $m/z = 252$  jest o 2 jednostki, czyli o dwa protony niższa od wartości jonu masowego produktu D2  $m/z = 254$ . Ponadto porównanie jonów masowych dwóch występujących blisko siebie produktów D4 ( $m/z = 252$ ) i D5 ( $m/z = 404$ ) wykazało różnicę 152 jednostek, co wyraźnie wskazuje na różnicę o cząsteczkę DTT.



Rys.106. Widmo masowe piksu **D4** o czasie retencji 25 min.

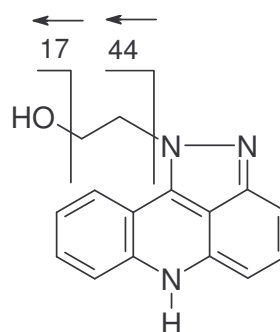
Podobna do produktu D5 fragmentacja cząsteczki (rys.85), podczas której odszczepiany jest cały łańcuch boczny [M-45] wskazuje wyraźnie, że produkt D4 ma strukturę analogiczną do D5, ale pozbawioną nukleofilowego podstawnika DTT (rys.108). Analiza jonów fragmentacyjnych przedstawiona w tabeli 13 potwierdza obecność łańcucha bocznego.



Rys.107. Widmo fragmentacyjne produktu **D4**  $m/z = 251,9$ .

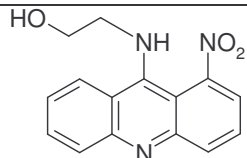
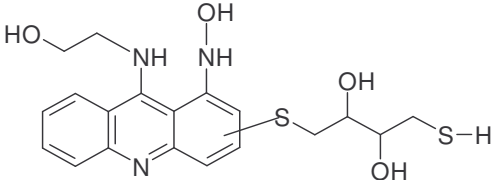
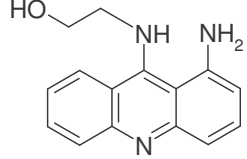
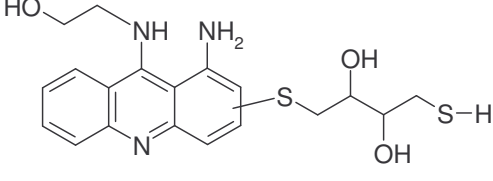
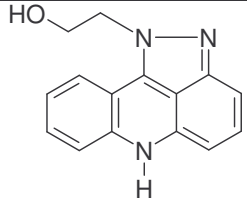
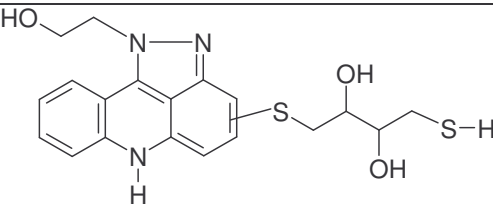
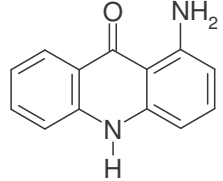
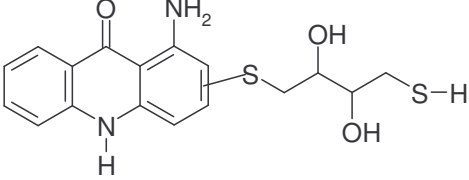
Tabela 13. Jony masowe powstające podczas fragmentacji jonu molekularnego  $m/z = 251,9$ .

Jon fragmentacyjny ( $m/z$ )	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
234,0	M - 17	OH
207,0	M - 44	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH

Rys.108. Proponowana struktura produktu **D4**,  $m/z = 251,9$ .

Podsumowując wykazałam, że transformacja związku C-857 w obecności DTT prowadzi do powstania licznej grupy produktów, o zróżnicowanej trwałości, których struktury chemiczne przedstawiłam w tabeli 14.

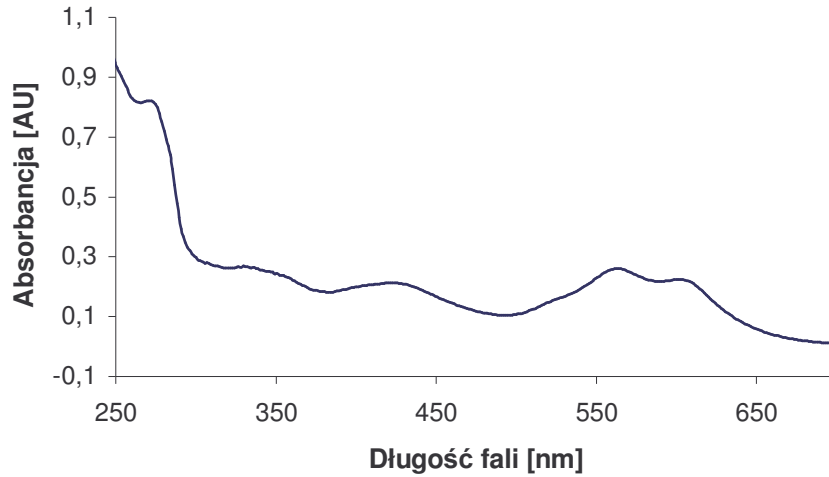
Tabela 14. Produkty chemicznej transformacji związku C-857 powstające w obecności ( DTT ).

		m/z	struktura
	Substrat	284	
Zaproponowane struktury chemiczne produktów	D1	422,5	
	D2	253,9	
	D3	406,5	
	D4	251,9	
Udowodnione struktury chemiczne produktów (NMR, HR-MS)	D5	404,5	
	D6	211,0	
	D7	363,1	

Na podstawie zaproponowanych struktur 7 produktów można stwierdzić, że wszystkie one poza produktem D1, dla którego prawdopodobna jest obecność grupy hydroksyloaminowej mają zredukowaną grupę nitrową albo do pochodnej aminowej (D2 i D3), albo do cyklicznej struktury dihydroprazoloakrydiny (D4 i D5). Z całej gamy produktów redukcji związku C-857 najtrwalsze są pochodne akrydonu (D6 i D7). Zarówno nietrwałe pochodne 1-aminoakrydiny oraz trwalsze, z pierścieniem dihydroprazolowym, jak i pochodne 1-aminoakrydonu zawierają w cząsteczce ugrupowanie DTT, będące wynikiem ataku nukleofilowego tego związku na zaaktywowaną cząsteczkę 1-nitroakrydiny. Nasuwa się pytanie, jaka jest sekwencja tych zdarzeń, co zostanie przedyskutowane w dalszej części pracy.

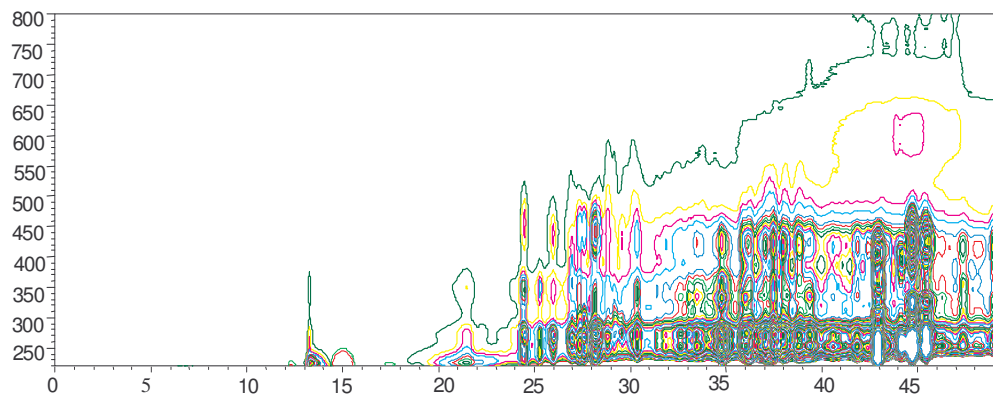
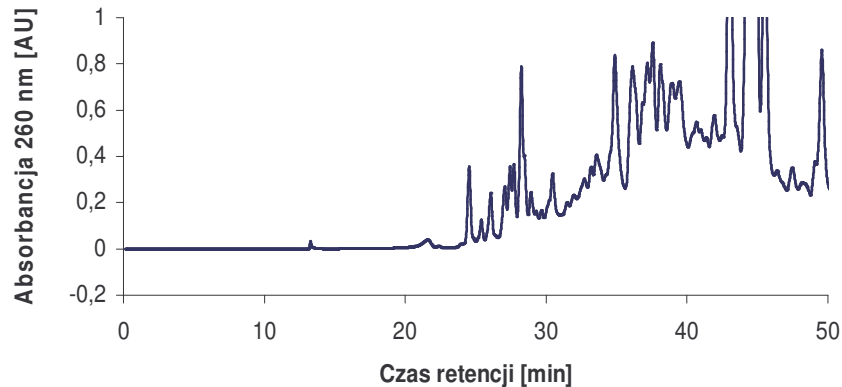
### 4.2.3 Barwny produkt redukcji związku C-857

Spośród produktów chemicznej redukcji C-857 w obecności DTT przedstawionych na rys. 78, zwraca uwagę mało intensywny szeroki pik o czasie retencji ok. 35 min i dodatkowym maksimum absorpcji powyżej 600 nm. Warto podkreślić, iż podobne produkty, czyli absorbujące światło powyżej 600 nm obserwowane były także podczas przemian Ledakrinu (dane niepublikowane). Poza tym w przypadkach obu związków obserwovałam szarofioletowe zabarwienie roztworu zarówno po reakcji z DTT, jak i w obecności enzymów mikrosomalnych. Aby wyjaśnić powyższe fakty przeprowadziłam analizę przemian redukcyjnych w skali półpreparatywnej. W wyniku reakcji związku C-857 z DTT w tych warunkach z mieszaniny reakcyjnej wytrącił się szaro-fioletowy osad. Okazał się on bardzo trudno rozpuszczalny w wodzie i w wielu rozpuszczalnikach organicznych takich jak: metanol, aceton czy chloroform, co znacznie utrudniało jego analizę. Poszukując dobrego rozpuszczalnika dla tej substancji wykazałam, że rozpuszcza się ona częściowo w dichlorku metylenu i DMSO. Wobec powyższego barwny osad z mieszaniny reakcyjnej rozpuściłam w roztworze dichlorku metylenu z metanolem (1:2) i analizowałam spektrofotometrycznie, a uzyskane widmo przedstawiłam na rys. 109.



Rys.109. Widmo UV-VIS osadu rozpuszczonego w dichloroku metylenu.

W kolejnym etapie przeprowadziłam analizę chromatograficzną tego roztworu, a uzyskany chromatogram przedstawiłam na rys. 110.



Rys.110. Chromatogram osadu otrzymanego z mieszaniny reakcyjnej związku C-857 z DTT, rozpuszczonego w roztworze dichloroku metylenu z metanolem (1:2); 1 mM C-857, 20 mM DTT, 60 minut.

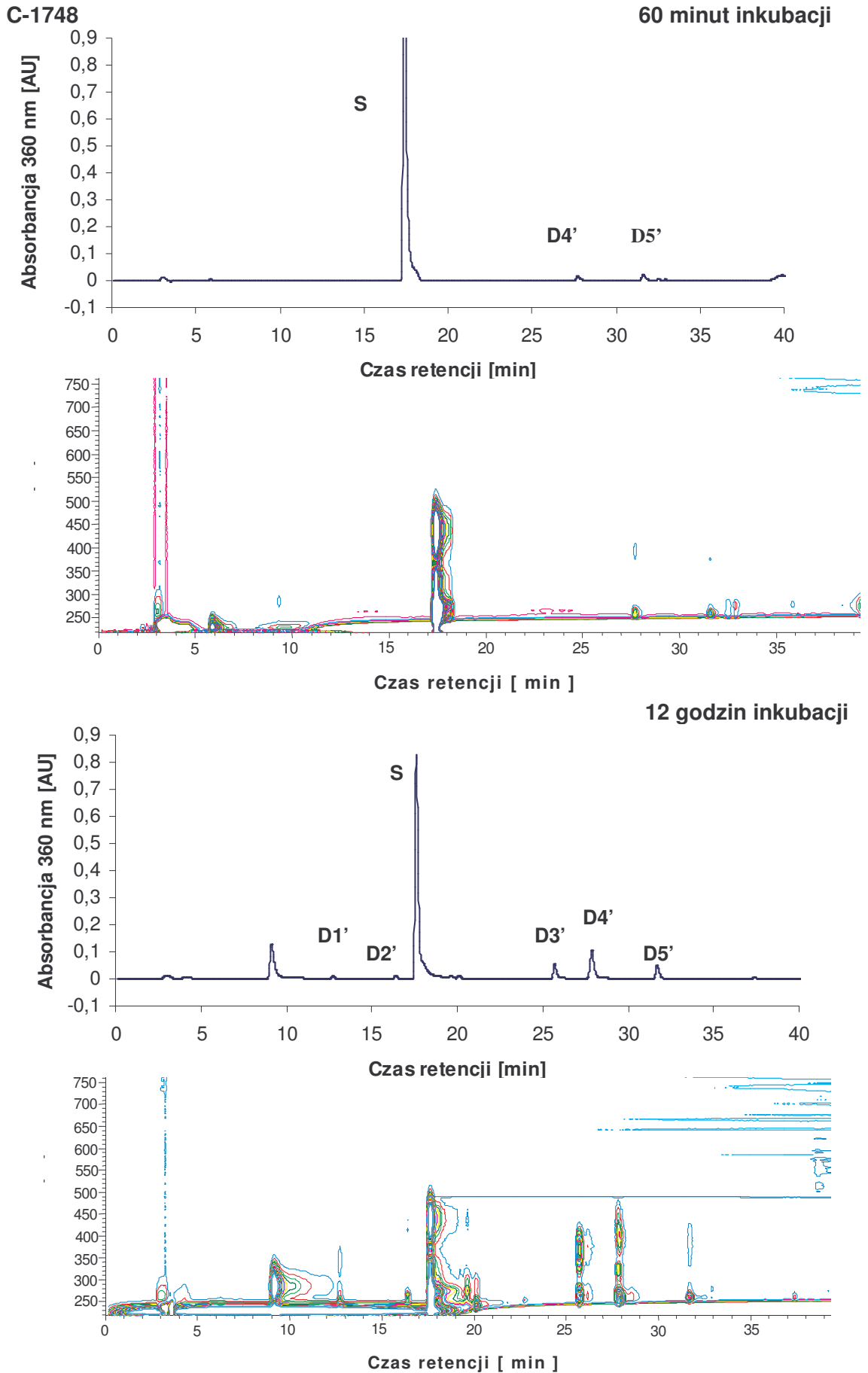


Niezależnie od rodzaju stosowanego rozpuszczalnika, na chromatogramie oprócz poszukiwanych niebieskich produktów widoczne były znane i opisane powyżej główne produkty redukcji związku C-857 np. D4, D5, D6. Analiza MS tak przygotowanych roztworów również nie wykazała obecności nowych produktów przemian związku C-857.

Przeprowadzone analizy spektrofotometryczne i chromatograficzne nie pozwoliły ostatecznie rozstrzygnąć kwestii skąd pochodzi produkt absorbujący światło powyżej 600 nm. Być może jego niska intensywność na chromatogramie wynika z jego zdolności do sorbcji na kolumnie chromatograficznej. Najbardziej prawdopodobnym wydaje się jednak, że niebieskie, czasem intensywne zabarwienie roztworu, którego widmo UV-VIS udało się zarejestrować pochodzi od tworzących się kompleksów np. typu „charge transfer” (z przeniesieniem ładunku) pomiędzy produktami redukcji badanego nitrozwiązku.

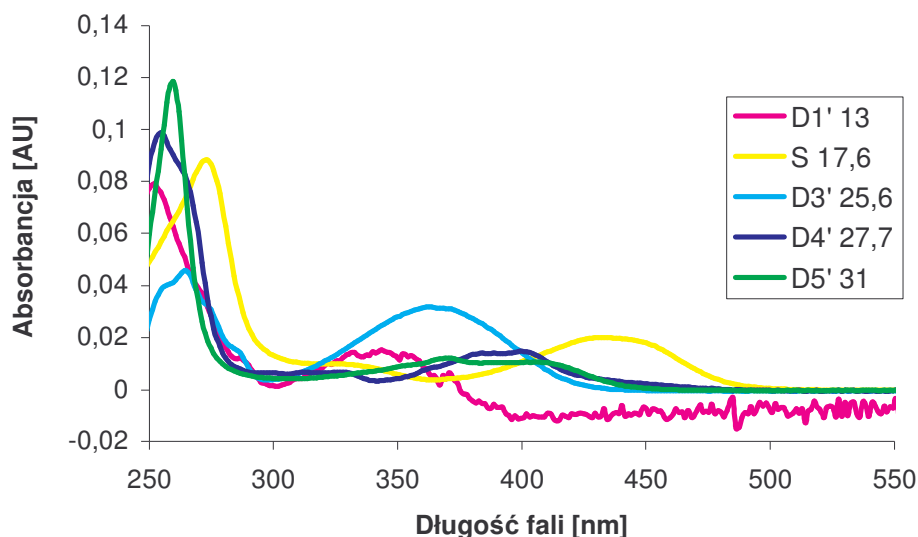
#### **4.2.4 Produkty reakcji związku C-1748**

Wstępne badania wykazały, że związek C-1748 znacznie trudniej ulega transformacji w obecności DTT, niż C-857 (rys. 111). Opis przebiegu reakcji oraz stosowane warunki zostały opisane w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.2. Badając kinetykę tej przemiany zaobserwowałam, że dopiero po znacznie wydłużonym czasie inkubacji mieszaniny reakcyjnej tzn. po 14 czy 17 godzinach powstaje pięć głównych metabolitów, z których tylko trzy: D3', D4' i D5' występują w wysokim stężeniu. Produkty te są znacznie bardziej trwałe od pozostałych i ich zawartość w mieszaninie reakcyjnej wzrasta wraz z wydłużaniem czasu inkubacji.



Rys. 111. Chromatogram mieszaniny reakcyjnej w zależności od czasu inkubacji: C-1748 1 mM, DTT 20 mM A ) 60 minut inkubacji, B ) 12h inkubacji, C ) 14h inkubacji.

Analiza widm UV-VIS otrzymanych produktów wykazała, że redukcja prowadzi do powstania kilku zróżnicowanych pod względem struktury produktów, które wydają się być podobne do metabolitów związku C-1748 powstających w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych np. D3' = P3'

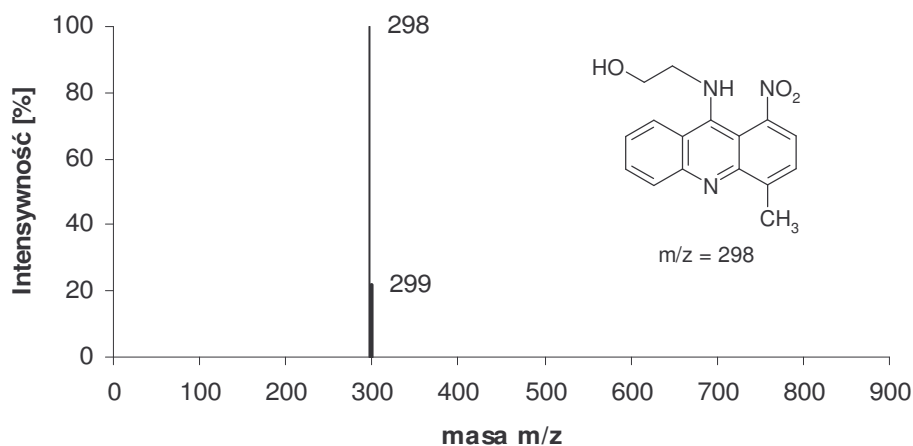


Rys. 112. Widmo UV-VIS produktów przemian C-1748 wobec DTT.

Wobec powyższego podjęłam próbę izolacji produktów chemicznej transformacji związku C-1748 i identyfikacji ich struktury chemicznej stosując metody wymienione wcześniej podczas opisu badań reakcji C-857 z DTT.

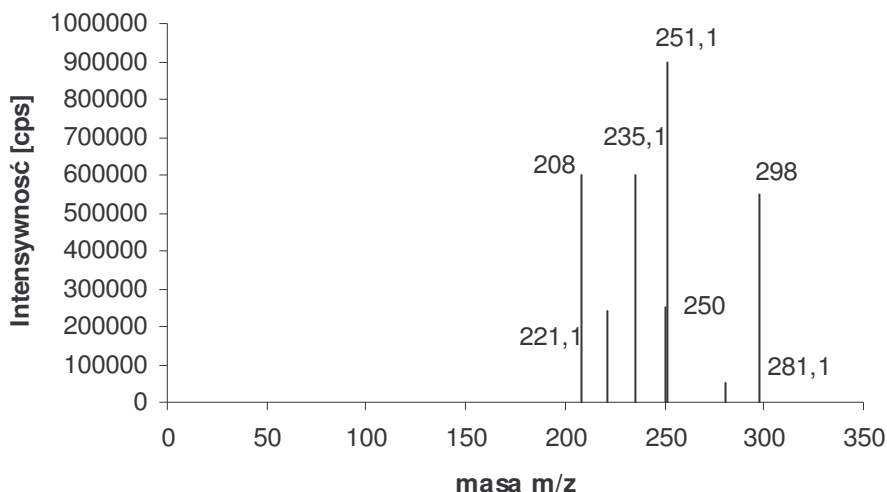
#### ◆ Analiza MS piku substratu C-1748

Widmo masowe piku substratu zawiera jeden intensywny jon masowy odpowiadający masie cząsteczkowej badanego związku powiększonej o 1 (S +1),  $m/z = 298$  (rys.113).



Rys. 113. Widmo ESI-MS i struktura chemiczna substratu  $m/z = 298$ .

Fragmentacja jonu związku C-1748,  $m/z=298$  zachodzi trudniej, niż w przypadku pochodnej C-857 i prowadzi do powstania kilku intensywnych jonów masowych. Widmo fragmentacyjne zostało przedstawione na rys. 114, natomiast w tabeli 14 zestawiałam wyniki fragmentacji w porównaniu z otrzymanymi wcześniej dla związku C-857. Interpretację strukturalną przedstawiłam w tabeli 14.

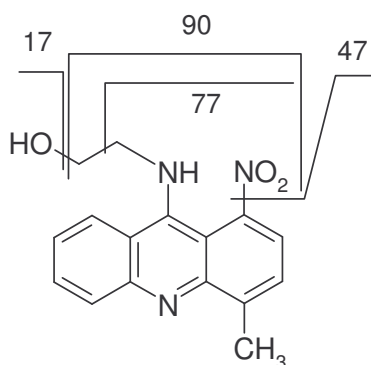


Rys. 114. Widmo fragmentacyjne jonu związku C-1748,  $m/z = 298$ .

Analiza wartości uzyskanych jonów masowych wykazała, że mimo obecności grupy metylowej przebieg fragmentacji związku C-1748 jest identyczny dla obu badanych pochodnych 1-nitroakrydyny. Fragmenty odchodzące są charakterystyczne dla grupy nitrowej i łańcucha alkiloaminowego, czyli kluczowych elementów struktury odgrywających istotną rolę w przemianach metabolicznych tych związków.

Tabela 15. Jony fragmentacyjne związków: C-857,  $m/z = 284$  i C-1748,  $m/z = 298$ .

	C-857		C-1748	
	[M+1] <sup>+</sup> =284		[M+1] <sup>+</sup> =298	
formuła	(m/z)	Fragment odchodzący	(m/z)	Fragment odchodzący
M - 17	267,3	OH	281,1	OH
M - 47	237,2	HNO <sub>2</sub>	251,1	HNO <sub>2</sub>
M - 63	221,1	NO <sub>2</sub> + OH [HNO <sub>3</sub> ]	235,1	NO <sub>2</sub> + OH [HNO <sub>3</sub> ]
M-90	194	NO <sub>2</sub> + CH <sub>2</sub> CHOH	208	NO <sub>2</sub> + CH <sub>2</sub> CHOH

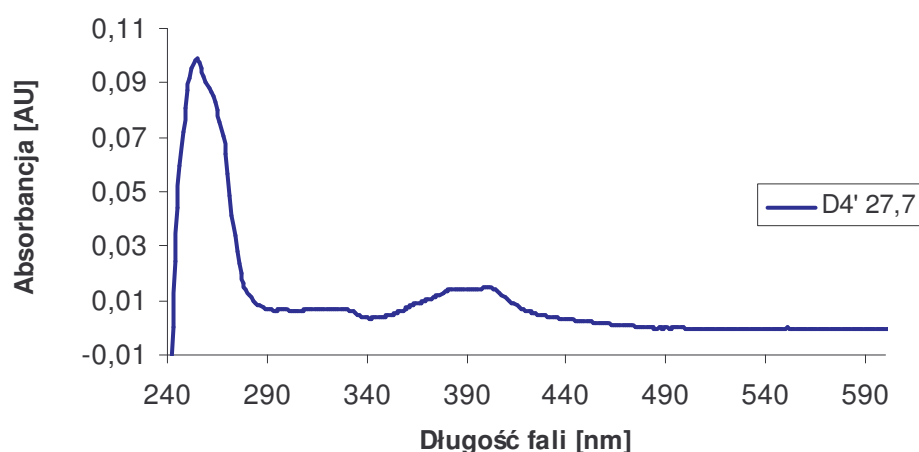


Rys. 115. Struktura chemiczna C-1748,  $m/z=298$  wraz z fragmentacją.

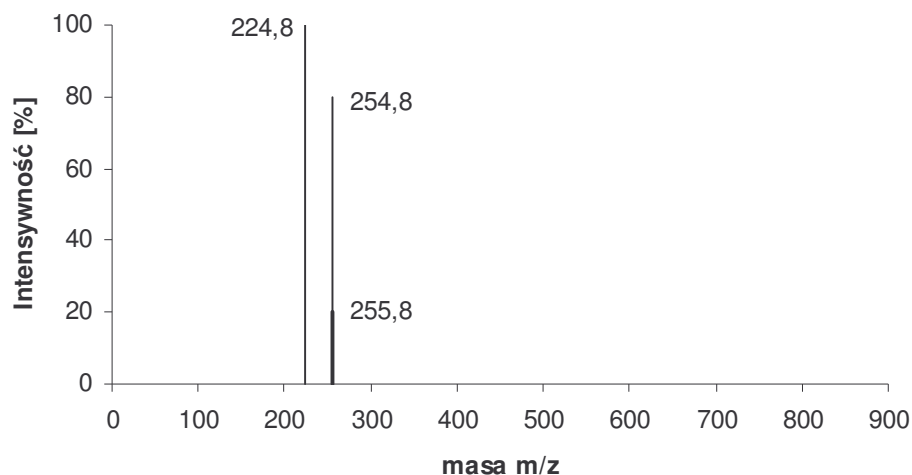
Identyfikację powstających produktów redukcji związku C-1748 rozpoczęłam od stabilnego produktu D4', który powstawał w najwyższym stężeniu.

#### ◆ Analiza strukturalna produktu zawartego w pikie D4'

Widmo masowe pikie D4' wykonane podczas analizy chromatograficznej HPLC-ESI-MS zawierało dwa wyraźne jony masowe  $m/z = 254,8$  i  $m/z = 224,8$ . Analiza porównawcza widm UV-VIS oraz ESI-MS wskazywała, że mogą to być dwa związki zidentyfikowane podczas reakcji redukcji pochodnej C-857: 1-nitroakrydon i 1-aminoakrydon. Nieznaczne różnice we właściwościach tych produktów powodują, że niemożliwy był ich podział chromatograficzny.

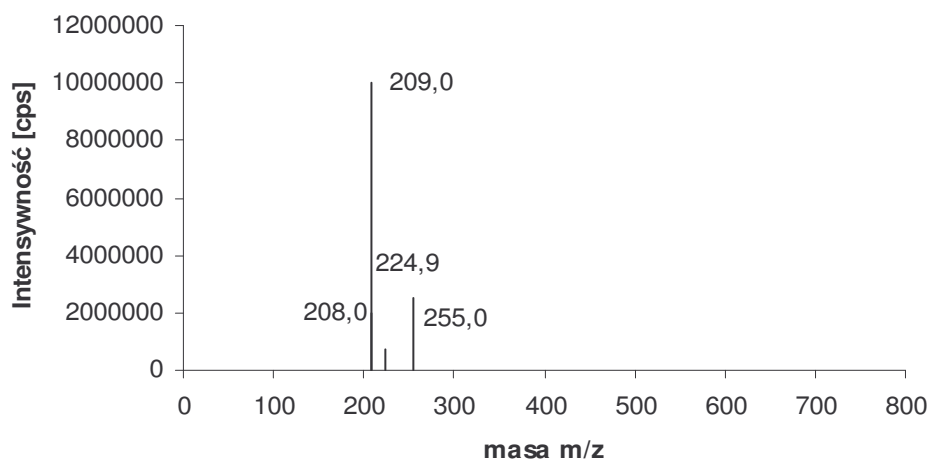


Rys. 116. Widmo UV-VIS produktu D4',  $m/z 254,8$ , o czasie retencji 27,7 min.



Rys. 117. Widmo masowe piku **D4'** czas retencji. 27,7 min.

Widmo masowe wykonane z wyizolowanej w warunkach preparatywnych frakcji piku D4 wykazało obecność jonu masowego,  $m/z = 254,8$ . Widmo fragmentacyjne zawiera jeden główny jon masowy  $m/z = 209$  i kilka jonów o bardzo małej intensywności (rys.118 i tabela15).



Rys. 118. Widmo fragmentacyjne związku produktu **D4'**,  $m/z = 255,0$

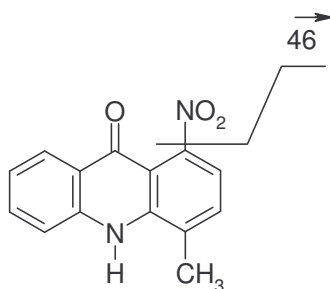
Tabela 16. Jon masowy powstający podczas fragmentacji produktu **D4'**,  $m/z = 255,0$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
209,0	M - 46	NO <sub>2</sub>

Jon masowy  $m/z = 209$  powstaje przez odszczepienie fragmentu o masie 46 jednostek, co może być związane z odejściem charakterystycznego elementu struktury, cząsteczki  $\text{NO}_2$ . Dowodem proponowanej struktury przedstawionej na rys. 119 jest zgodność widm MS i MS/MS wyizolowanego produktu ze wzorcem otrzymanym na drodze chemicznej syntezy. Wzór sumaryczny produktu D4 został też potwierdzony za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas, HR-MS, której wyniki prezentuję w tab. 16. 1-nitro-4-metyloakrydon jest prawdopodobnie produktem reakcji hydrolizy łańcucha bocznego, który obserwowany jest w mieszaninie reakcyjnej z powodu długiego czasu inkubacji związku z cząsteczką DTT.

Tabela 16. Wyniki analizy HR-MS produktu D4',  $m/z = 255,0$ .

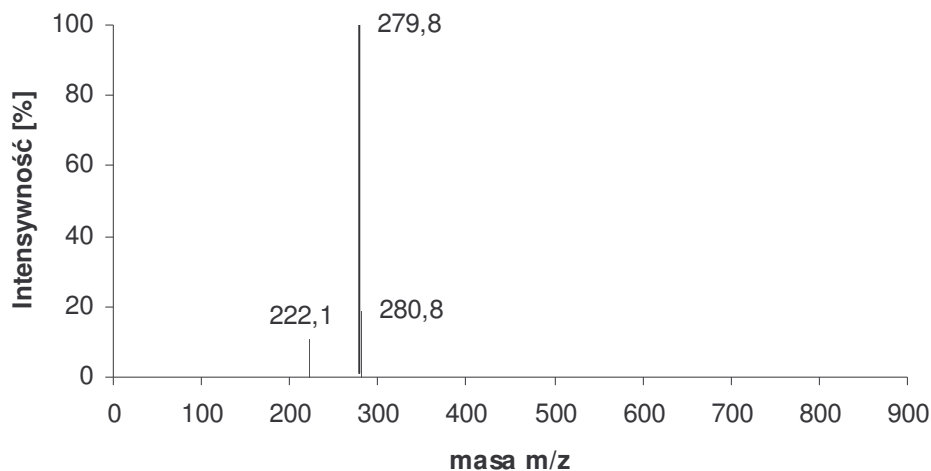
	Masa cząsteczki zmierzona [Da]	Masa cząsteczki obliczona [Da]	Błąd oznaczenia [mDa]	Błąd oznaczenia [ppm]	Wzór sumaryczny	Zgodność izotopowa
1	255,07685	255,07642	0,4312	1,6905	<b>C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,999513</b>
2	255,07685	255,07826	-1,4087	-5,5226	H <sub>3</sub> N <sub>18</sub>	0,992848



Rys. 119. Struktura produktu D4' o czasie retencji ok. 28 min,  $m/z = 255,0$  wraz z możliwą fragmentacją.

Dla pozostałych produktów przemian nie mogłam przeprowadzić analizy wyizolowanych frakcji. W tych przypadkach otrzymałam widma ESI-MS pików mieszaniny reakcyjnej.

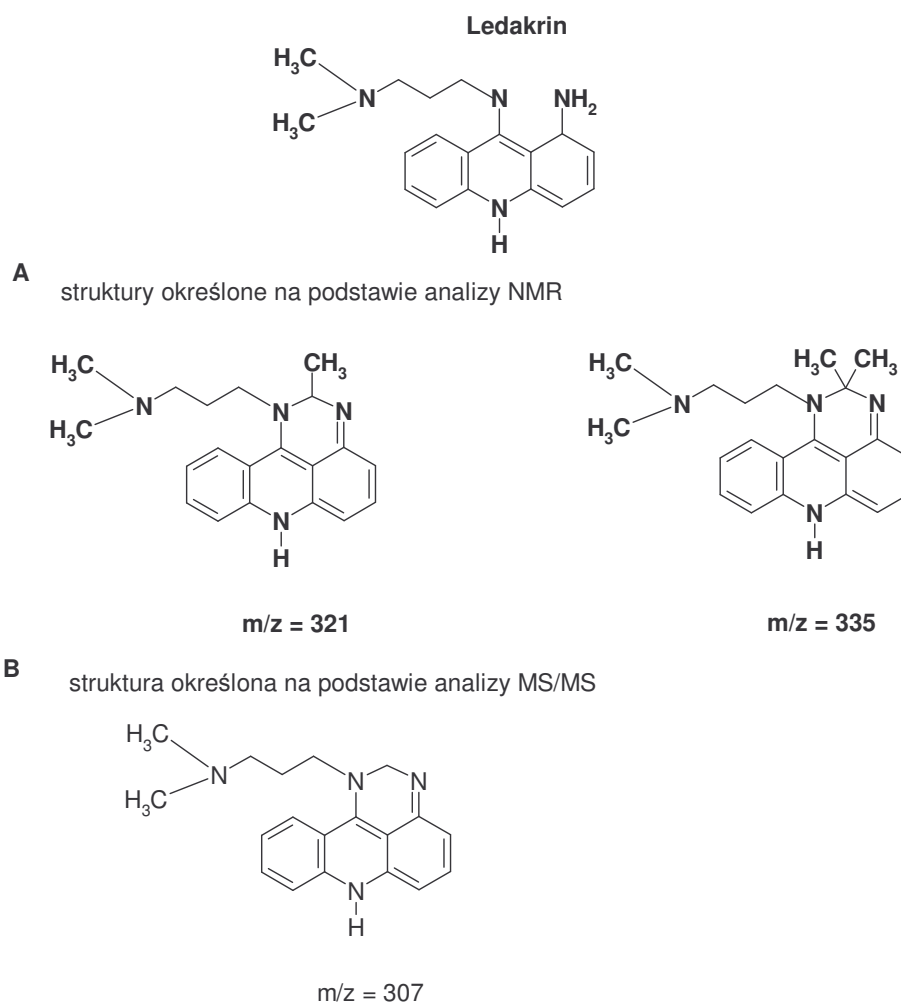
## ♦ Analiza ESI-MS pików D3'



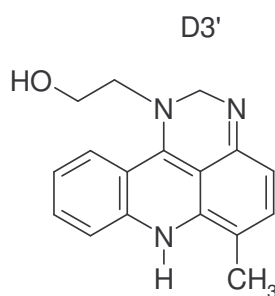
Rys. 120. Widmo ESI-MS pików D3' o czasie retencji ok. 25,5 min.

Widmo masowe intensywnego pików D3' powstającego o czasie retencji 25,5 minuty zawiera główny jon  $m/z = 279,8$  i mało intensywny jon  $m/z = 222,1$ . Pierwsza wartość jest o 18 jednostek niższa od jonu masowego substratu C-1748 [M-18], co mogłoby odpowiadać odsczepieniu cząsteczki wody w łańcuchu bocznym. W celu zaproponowania struktury produktu D3' przeprowadziłam szeroką analizę struktur określonych wcześniej dla produktów metabolizmu Ledakrinu [22]. Kilka z nich zawierało zamknięty pierścień pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny. Struktury te wraz z odpowiednimi wartościami jonów masowych  $m/z$  przedstawiłam na rys.121. Na tej podstawie przyjąłam wstępnie, że struktura produktu D3' powstająca w wyniku przemiany C-1748 może również posiadać dodatkowy analogiczny pierścień. Wskazuje na to porównanie wartości  $m/z = 279,8$  i wartości  $m/z = 307$  odpowiadającej po uwzględnieniu różnic strukturalnych (łańcuch boczny i grupa  $\text{CH}_3$ ) produktowi Ledakrinu (rys. 121). Proponowaną strukturę produktu D3' przedstawiłam na rys. 122.



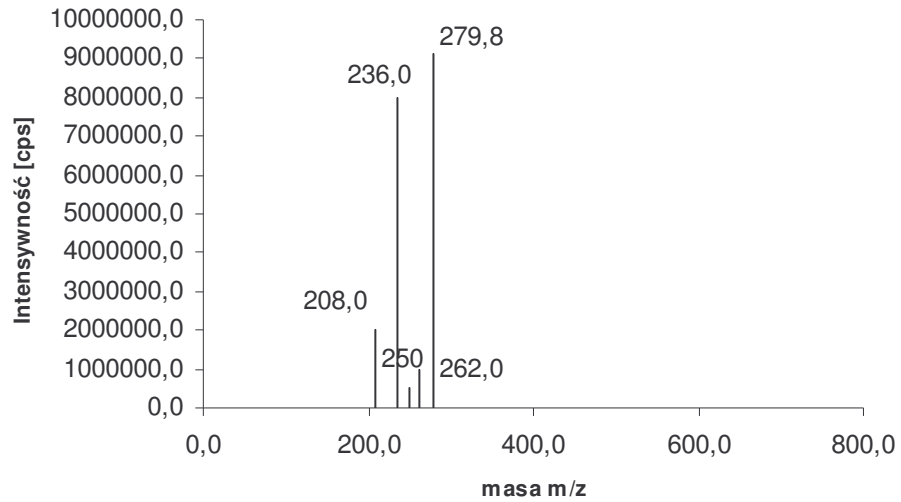


Rys. 121. Struktury chemiczne (A) produktów redukcji Ledakrinu z  $\text{SnCl}_2$ , (B) metabolitu Ledakrinu zidentyfikowanego po inkubacji z enzymami mikrosomalnymi wg. [21, 22].



Rys. 122. Proponowana struktura chemiczna dla produktu C-1748 z DTT, **D3'** o wartości  $m/z = 279,8$ .

Widmo fragmentacyjne produktu **D3'**  $m/z = 279,8$ , (rys. 123, tab. 17), wskazuje na fragmentację w obrębie łańcucha alkiлоaminowego ( $m/z = 236,0$ ,  $m/z = 208,0$ ) oraz na obecność dodatkowego atomu węgla ( $m/z = 208,0$ ). Potwierdza to powyższą propozycję, iż **D3'** może być produktem powstającym poprzez zamknięcie pierścienia sześciocząłowego przez dwa zaaktywowane atomy azotu w pozycji 1 i 9 (rys. 122), jak przedstawiono powyżej na rys. 121 dla Ledakrinu.

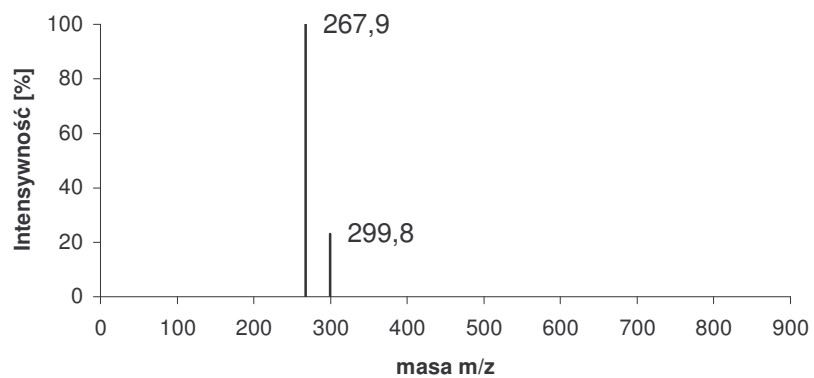


Rys. 123. Widmo fragmentacyjne produktu **D3'**,  $m/z = 279,8$ .

Tabela 17. Jony masowe powstające podczas fragmentacji produktu **D3'**,  $m/z = 279,8$ .

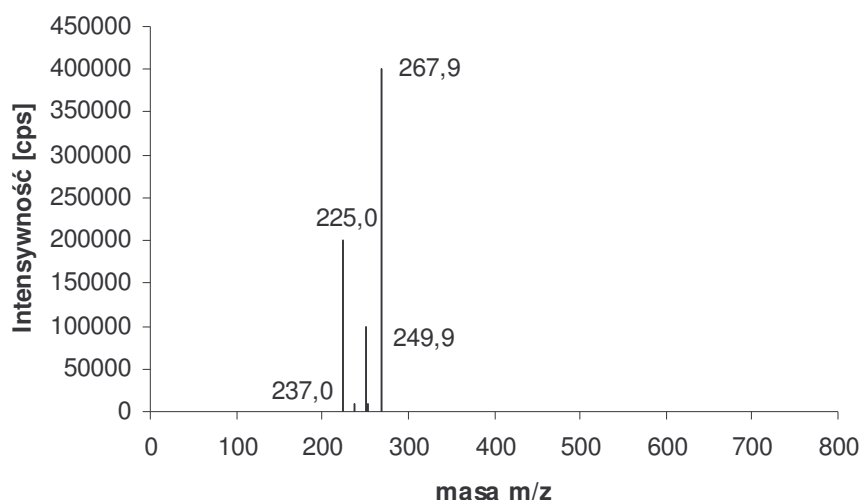
Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
262,0	M - 17	OH
236,0	M - 44	OHCHCH <sub>2</sub>
208,0	M - 72	CH <sub>2</sub> CHOH CO

◆ Analiza ESI-MS piku **D1'**



Rys. 124. Widmo ESI-MS piku **D1'** o czasie retencji ok. 12,8 min.

Pik D1 charakteryzował się niską intensywnością, jego widmo MS zawiera intensywny jon masowy  $m/z = 267,9$ . Wartość tego jonu jest niższa od wartości  $m/z$  substratu o 30 jednostek, czyli może odpowiadać produktowi pozbawionemu dwóch atomów tlenu z dodatkowymi atomami wodoru. Przyjęłam, wstępnie, że jest to cząsteczka z całkowicie zredukowaną grupą nitrową (rys.126). Widmo fragmentacyjne jonu  $m/z=267,9$  (rys. 125) wykazało obecność kilku jonów o małej intensywności i jednego głównego  $m/z = 225,0$ , (M-43), który jest wspólny dla fragmentacji tego produktu oraz jego analogu pozbawionego grupy metylowej w pozycji 4 powstającego w wyniku redukcji związku C-857 rys. 101 i tab. 11.

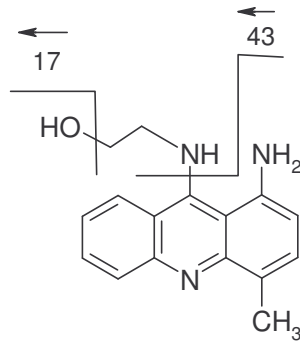


Rys. 125. Widmo fragmentacyjne produktu **D1'**,  $m/z = 267,9$ .

Tabela.18. Jony masowe powstające podczas fragmentacji produktu **D1'**,  $m/z = 267,9$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
225,0	M - 43	CH <sub>2</sub> CHNH <sub>2</sub>
249,9	M - 17	OH

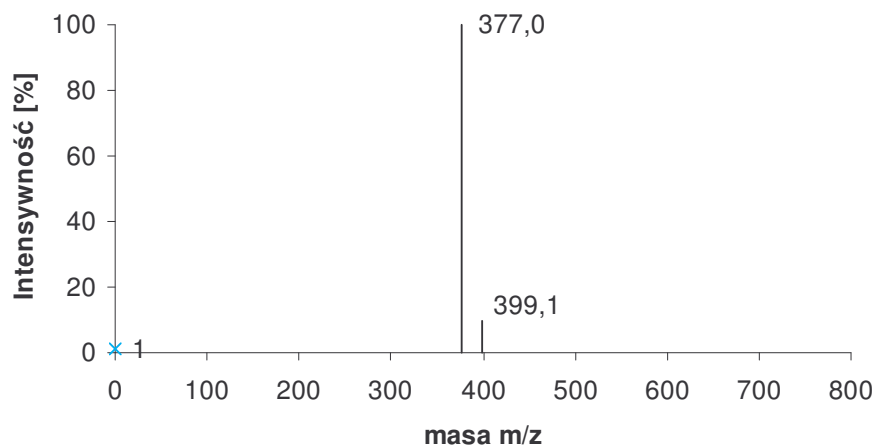
Tak jak w przypadku  $m/z = 211$  dla C-857 wartość  $m/z = 225,0$  świadcząca o parzystej liczbie atomów azotu w jonie fragmentacyjnym wskazuje na fragmentację w łańcuchu hydroksyetyloaminowym z odejściem fragmentu zawierającego atom azotu, a nie tlenu, czyli CH<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>. Jon masowy  $m/z = 249,9$  mógł powstawać w wyniku rozpadu wiązania między atomem węgla i grupą hydroksylową. Wyniki te potwierdzają obecność łańcucha bocznego w proponowanej strukturze **D1'** (rys. 126).



Rys. 126. Prawdopodobna struktura produktu **D1'** o czasie retencji ok. 12,8 min,  $m/z = 267,9$  wraz proponowaną fragmentacją.

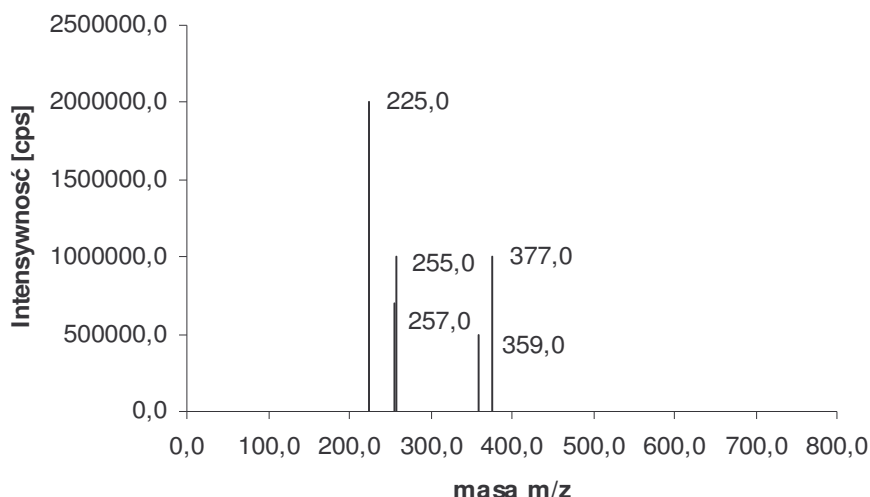
#### ◆ Analiza ESI-MS pików **D5'**

Ostatni pik, jaki poddałam analizie HPLC-MS to pik **D5'**. Główny jon masowy obecny w widmie MS pików **D5'** to  $m/z = 377,0$ .



Rys. 127. Widmo ESI-MS pików **D5'** o czasie retencji ok. 32 min.

Cenną wskazówką dla identyfikacji tego produktu, stanowiło widmo fragmentacyjne i obecne na nim charakterystyczne jony  $m/z = 225,0$  oraz  $m/z = 255,0$ , których interpretację przedstawiałam w tabeli 19.

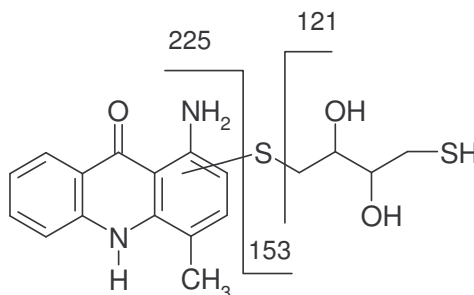


Rys. 128. Widmo fragmentacyjne produktu **D5'** o czasie retencji ok. 25 min.

Tabela 19. Jony masowe powstające podczas fragmentacji produktu **D7'**,  $m/z = 377,0$ .

Jon fragmentacyjny (m/z)	Równanie jonu fragmentacyjnego	Fragment odchodzący
255,0	$M - 122/121$	$\text{CH}_2\text{CHOHCHOHCH}_2\text{SH}$
225,0	$M - 153$	$\text{SCHCHOHCHOHCH}_2\text{SH}$ (DTT)

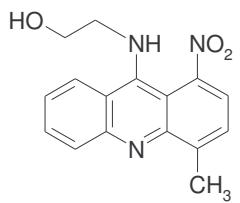
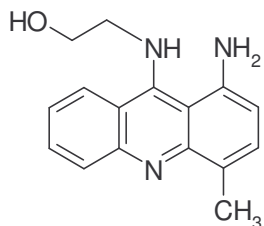
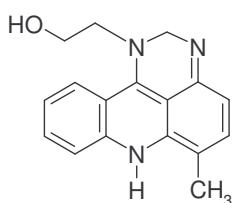
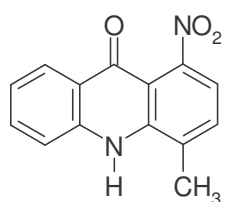
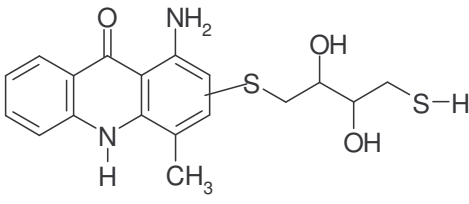
Wskazują one na odszczepienie odpowiednio całej cząsteczki DTT,  $[M - 153]$  bądź jej fragmentu bez atomu siarki,  $m/z = 255,0$   $[M - 122]$ . Jon fragmentacyjny  $m/z = 225,0$  jest identyczny z jonem masowym cząsteczki 1-aminoakrydonu, dlatego dla **D5'** proponujemy strukturę przedstawioną na rys. 129.



Rys. 129. Prawdopodobna struktura produktu **D7'** czas retencji ok. 32 min,  $m/z = 377,0$  wraz z proponowaną fragmentacją.

Reasumując, transformacja związku C-1748 w obecności DTT zachodzi znacznie trudniej, niż w przypadku pochodnej C-857 i prowadzi do powstania mniejszej liczby produktów. Spośród czterech zidentyfikowanych produktów przemian związku C-1748 tylko jeden produkt jest wspólny dla przemian obu badanych pochodnych 1-nitroakrydyny. Jest to produkt z całkowicie zredukowaną grupą nitrową do aminowej i zachowanym łańcuchem bocznym: D2 = D1'. Inny, analogiczny w strukturze chemicznej do produktu D7 związku C-857 to produkt D5'. Jest to 1-amino-4-metyloakrydon z cząsteczką DTT. Nowy produkt powstający w wyniku redukcji związku C-1748 w obecności DTT to produkt D3' zawierający dodatkowy pierścień sześciocłonowy, chociaż w przypadku C-857 powstawał produkt z pięciocłonowym pierścieniem. Struktura chemiczna D5' wskazuje, na istotną rolę metylowego podstawnika w pozycji 4 pierścienia akrydyny, którego obecność znacznie obniża reaktywność związku C-1748 i utrudnia reakcję nukleofilowego podstawienia cząsteczką DTT, gdyż obserwujemy tylko jeden taki produkt, D5'. Charakterystycznym produktem przemian związku C-1748 występującym w wysokim stężeniu jest 1-nitro-4-metyloakrydon, D4', który powstaje w wyniku reakcji hydrolizy związku podczas jego długiej inkubacji, a nie zaś z udziałem czynnika redukcyjnego. Podczas przemian związku C-1748 powstaje także w bardzo niskim stężeniu 1-amino-4-metyloakrydon, który jest analogiem 1-aminoakrydonu, charakterystycznego produktu przemian związku C-857. Główne produkty przemian związku C-1748 powstające w obecności DTT przedstawiłam w tabeli 20.

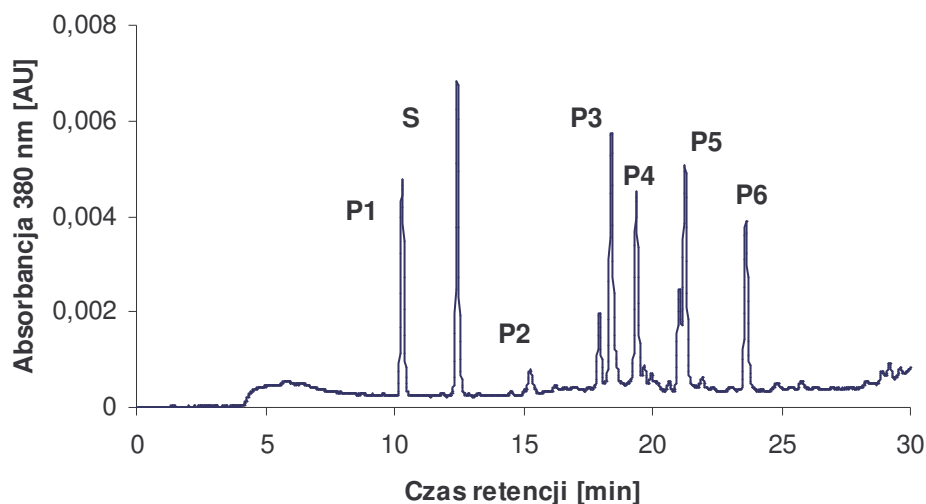
Tabela 20. Produkty chemicznej transformacji związku C-1748 powstające w obecności DTT.

		m/z	struktura
Substrat		298	
Produkt redukcji grupy nitrowej	D1'	267,8	
Produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocznowym	D3'	279,8	
Pochodne akrydonu	D4'	254,8	
	D5'	377,0	

### 4.3 Identyfikacja produktów metabolizmu pochodnych C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów

W dalszym etapie badań, na podstawie zdobytej wiedzy o produktach chemicznej redukcji podjęłam próbę określenia struktur chemicznych niektórych metabolitów związków C-857 i C-1748 powstających w omówionych wcześniej reakcjach enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura (rozdział 4.1.). W tym celu wykonałam widma ESI-MS poszczególnych pików chromatograficznych.

#### C-857

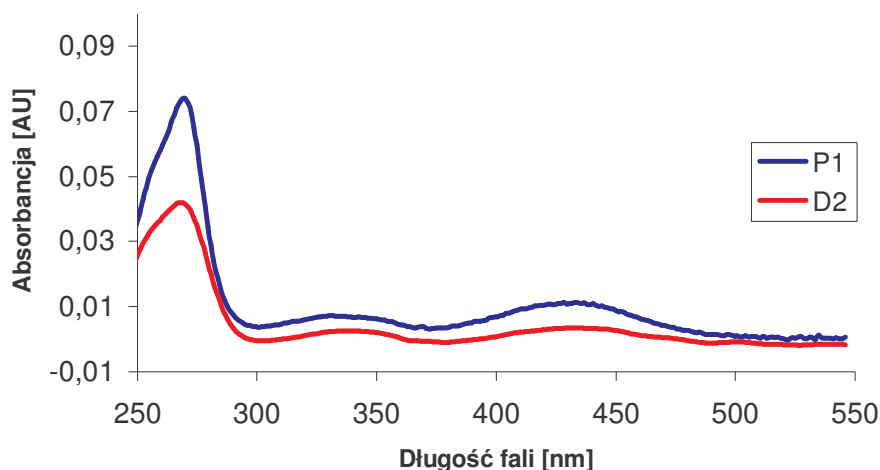


Rys. 130. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej po 10 minutach inkubacji; 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH 2 mg/ml enzymu.

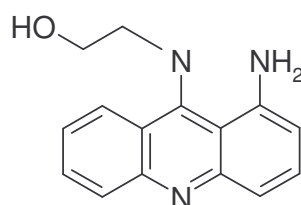
#### 4.3.1 Metabolity związku C-857

Produkt P1 powstający podczas enzymatycznej transformacji związku C-857 ma widmo UV-VIS zbliżone do widma produktu D2 powstającego w obecności DTT rys.131. Widmo masowe tego metabolitu zawiera jon  $m/z = 254,8$ , co wskazuje na produkt ze zredukowaną całkowicie grupę nitrową (rys. 132).



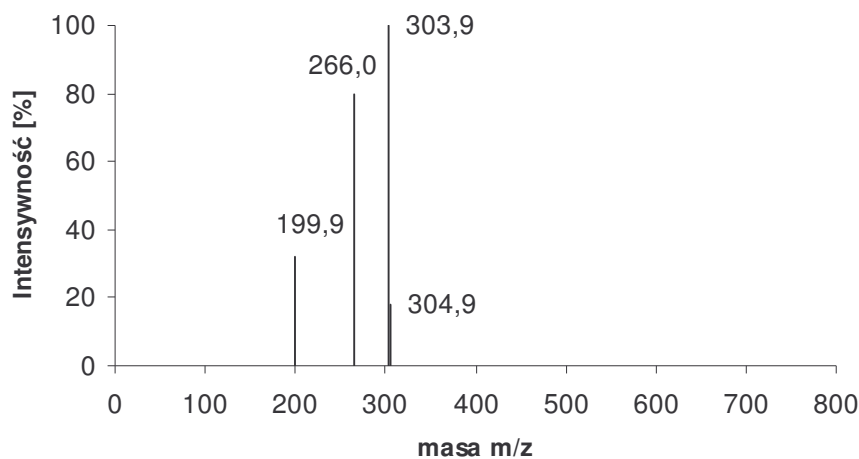


Rys.131. Porównanie widm UV-VIS produktów przemian metabolicznych związku C-857 w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura, *P1* i w obecności DTT, *D2*.

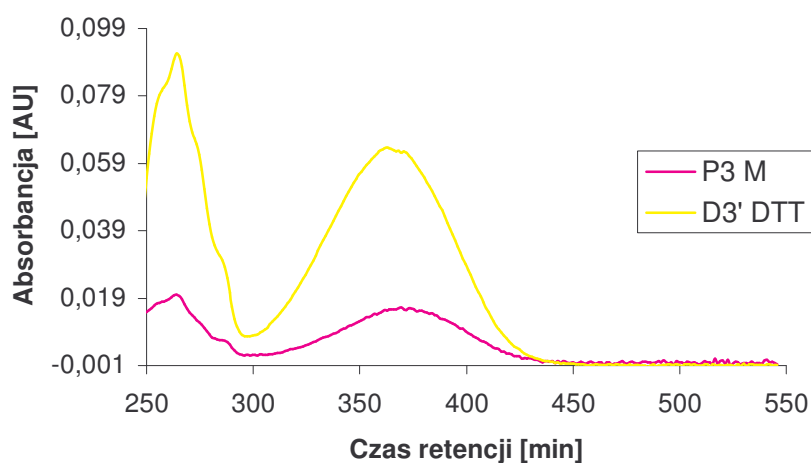


Rys.132. Proponowana struktura produktu *P1*  $m/z = 254,8$ .

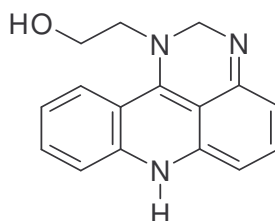
Na chromatogramie obrazującym przemiany C-857 przy czasie retencji ok.17 min zaobserwowałam dla intensywnego piku P3 dwa jony masowe  $m/z = 303,9$  i  $m/z = 266,0$ . Wartość pierwszego z nich jest wyższa o 20 od piku substratu, co trudno było zinterpretować na podstawie prostych przeliczeń. Strukturę dla produktu o jonie masowym  $m/z=266,0$ , zaproponowałam na podstawie dodatkowych dwóch przesłanek: charakterystycznego widma UV-VIS tego produktu (rys. 134) i znajomości opisanych wcześniej produktów przemian redukcyjnych pochodnych 1-nitroakrydiny (rys. 121 i 122). Prawdopodobną dla niego strukturę chemiczną przedstawiałam na rys. 135.



Rys.133. Widmo ESI-MS pików **P3** o czasie retencji 18 min.



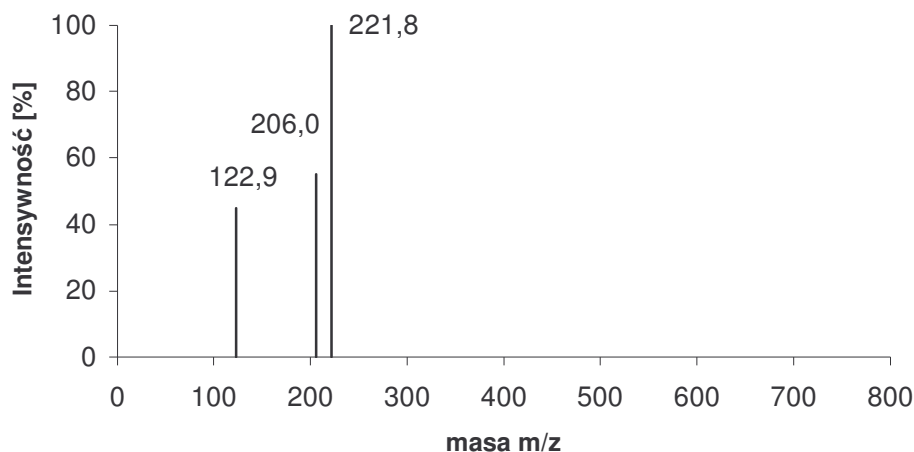
Rys.134. Porównanie widm UV-VIS produktu przemian związku **C-857** w obecności enzymów mikrosomalnych, **P3** i produktu redukcji związku **C-1748** z DTT, **D3'**.



Rys.135. Proponowana struktura produktu **P3**,  $m/z = 266,0$ .

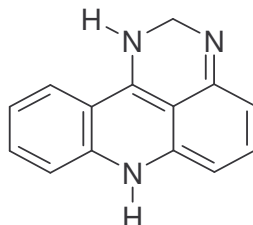
#### ◆ Analiza ESI-MS pików **P5**

Analiza widma masowego pików **P5** o czasie retencji 21 minut przedstawiona na rys.137 wykazała obecność dwóch głównych jonów masowych o wartości  $m/z = 221,8$  oraz  $m/z = 206,0$ .



Rys.136. Widmo ESI-MS pików **P5** o czasie retencji ok 21min.

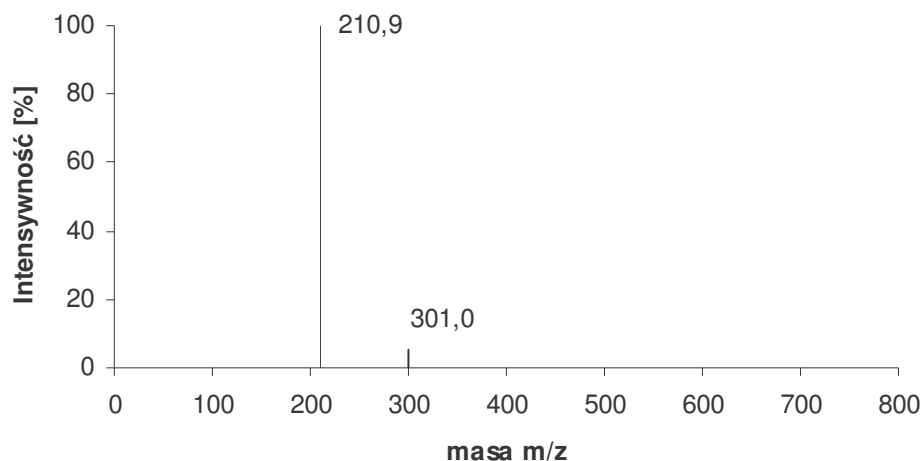
Widmo UV-VIS produktu **P5** jest zbliżone do widma produktu **P3** omówionego powyżej, co może świadczyć o zbliżonej do **P3** strukturze chemicznej. Różnica wartości między jonem  $m/z = 266,0$  (rys. 133) i jonem  $m/z = 221,8$  wynosi 44, co odpowiada fragmentacji łańcucha bocznego i sugeruje, że produkt **P5** pozbawiony jest tego elementu struktury. Na podstawie powyższych danych dla produktu **P5** zaproponowałam strukturę chemiczną przedstawioną na rys. 137.



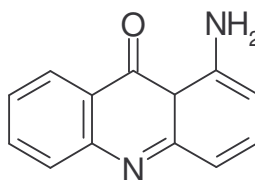
Rys.137. Proponowana struktura chemiczna produktu **P5**,  $m/z = 221,8$ .

#### ◆ Analiza ESI-MS pików **P6**

Ostatni pik chromatograficzny, jaki poddałam analizie HPLC-MS to pik **P6** o czasie retencji 24,3 min. W widmie ESI-MS na rys. 138 tego pików zwraca uwagę intensywny jon masowy:  $m/z = 211$ . Wartość ta odpowiada strukturze 1-aminoakrydonu, który powstawał także podczas przemian Ledakrinu oraz związku C-857 wobec DTT i którego strukturę określono wcześniej (rys. 91).



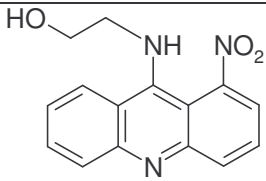
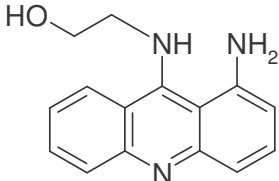
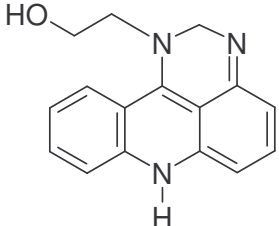
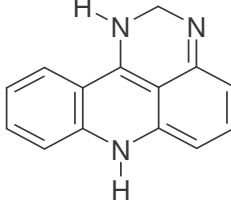
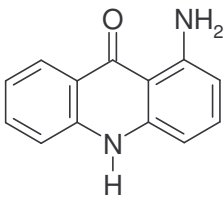
Rys.138. Widmo masowe piksu **P6** o czasie retencji 24,3 min.



Rys.139. Proponowana struktura chemiczna produktu **P6**,  $m/z = 210,9$ .

Biotransformacja związku C-857 w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych oraz frakcji enzymów o podwyższonej ekspresji wybranych rodzin cytochromu P450 daje identyczne produkty. Metabolizm związku C-857 w obecności enzymów mikrosomalnych przebiega nieco inaczej, niż w obecności chemicznego czynnika redukującego – ditionitritolu. Tylko dwa z sześciu metabolitów powstających w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych są identyczne, jak produkty chemicznej redukcji związku C-857. Są to: produkt P1 ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej oraz 1-aminoakrydon. Podczas enzymatycznej transformacji pochodnej C-857 powstają także dwa inne produkty niż z DTT zawierające w swej strukturze pierścień sześciocłonowy. Są to: produkt P3 i jego analog pozbawiony łańcucha bocznego. Produkt o strukturze identycznej z P3 powstawał już wcześniej podczas enzymatycznych przemian Ledakrinu [22].

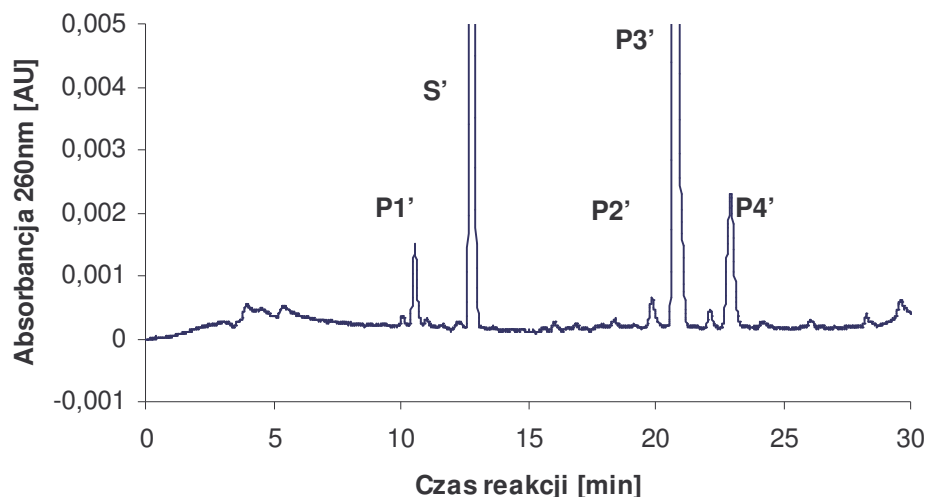
Tabela 21. Produkty metabolizmu związku C-857 powstające pod wpływem enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów.

		m/z	Struktura
	Substrat	284	
Produkt redukcji grupy nitrowej	P1	254,8	
Produkty z dodatkowym pierścieniem sześciocznowym	P3	266,0	
	P5	221,9	
1-aminoakrydon	P6	210,9	

### 4.3.2 Metabolity związku C-1748

Jak wykazałam wcześniej w punkcie 4.1.2 biotransformacja związku C-1748 w obecności szczurzych enzymów mikrosomalnych zachodzi łatwiej niż w obecności DTT, ale trudniej, niż przemiany pochodnej C-857 w tych samych warunkach. W obecności enzymów mikrosomalnych powstają 4 główne metabolity związku C-1748.

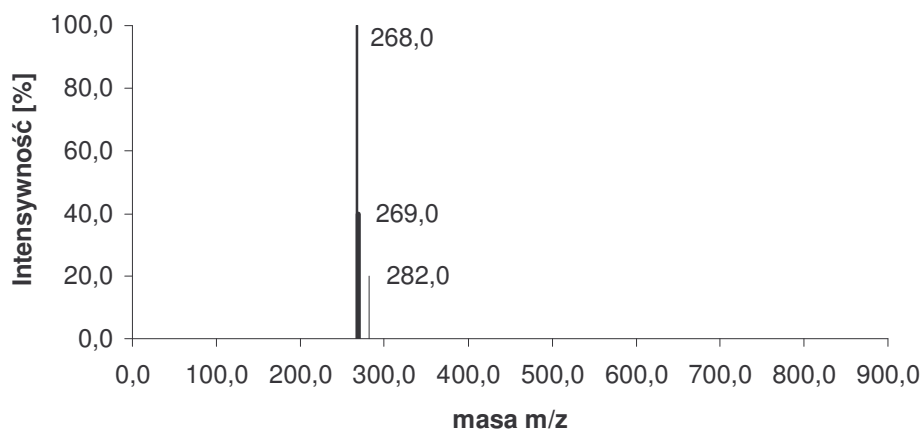
#### C-1748



Rys.140. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura.

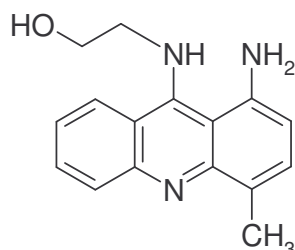
Na podstawie wyników badań struktur produktów chemicznej redukcji pochodnych 1-nitroakrydyny z DTT przeprowadziłam analizę struktur chemicznych metabolitów powstających wobec czynników enzymatycznych.

#### ◆ Analiza ESI-MS piku P1'



Rys.141. Widmo ESI-MS piku P1', o czasie retencji 12 min.

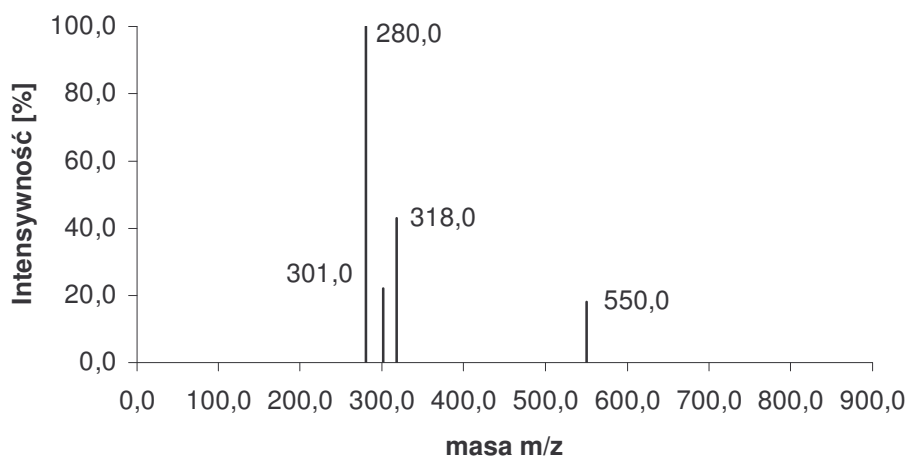
Widmo ESI-MS pików P1' to mieszanina dwóch produktów, których nie udało się podzielić w warunkach chromatograficznych. Główny jon masowy obserwowany w tym widmie MS ma wartość  $m/z = 268,0$ , co można zapisać jako: (S+1-30). Zależność ta oraz znajomość produktów redukcji związku C-1748 w obecności ditiotreitolu (pik D1', rozdz.4.2.4.) pozwala zaproponować dla produktu P1 strukturę chemiczną przedstawioną na rys. 142.



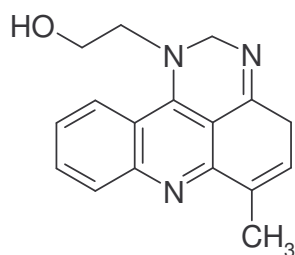
Rys.142. Proponowana struktura chemiczna dla pików **P1'**  $m/z = 268,0$ .

#### ◆ Analiza ESI-MS pików P3'.

Analiza widma masowego pików P3' wykazała obecność dwóch jonów masowych: intensywnego jonu  $m/z = 280$  oraz jonu  $m/z = 318,0$ . Wartość  $m/z$  pierwszego z jonów jest o 18 niższa od jonu masowego substratu C1748 (S+1-18). Drugi jon masowy  $m/z = 318,0$  można przestawić za pomocą zależności (S+1+20). Podobne zależności liczbowe uzyskałam w przypadku produktu D3' powstałego w wyniku redukcji C-1748 w obecności ditiotreitolu oraz produktu P3 dla pochodnej C-857 w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych. Powyższe fakty sugerują, iż produkt P3' może mieć strukturę chemiczną przedstawioną na rys. 145, czyli zawiera dodatkowy sześciocłonowy pierścień. Należy dodać, że spośród czterech metabolitów związku C-1748 powstających wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych, produkt P3' powstaje w najwyższym stężeniu.

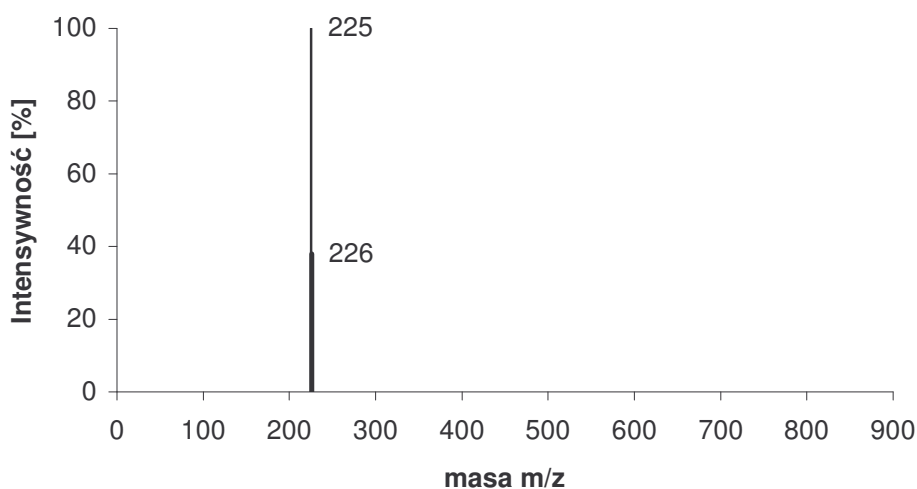


Rys.143. Widmo ESI-MS pików **P3'** o czasie retencji 21min.



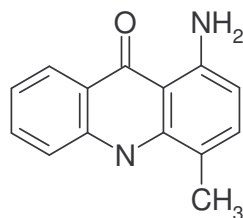
Rys.144. Proponowana struktura chemiczna produktu **P3'**  $m/z = 280,0$ .

◆ **Analiza ESI-MS piku P4'.**



Rys.145. Widmo ESI-MS piku **P4'**, czas retencji 22 min.

Charakterystyczny jon masowy  $m/z = 225,0$  występujący w widmie masowym piku **P4'** oraz jego widmo UV-VIS wskazują, że podobnie jak w przypadku chemicznej redukcji związku w obecności enzymów również w tym przypadku powstaje 1-amino-4-metylo-9-akrydon.



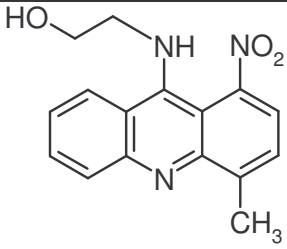
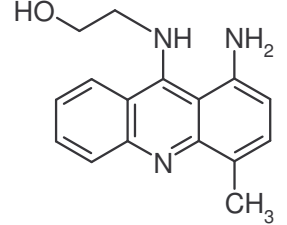
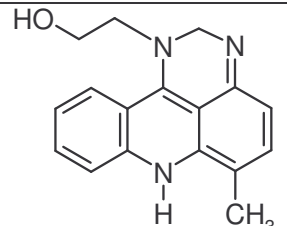
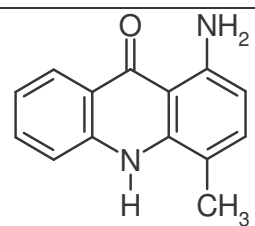
Rys.146. Proponowana struktura chemiczna produktu **P4'**,  $m/z = 225,0$ .

Reasumując, przemiany metaboliczne związku C-1748 w obecności chemicznego czynnika redukującego, ditiotretolu oraz w obecności enzymów mikrosomalnych prowadzą do powstania 4 głównych metabolitów, z których trzy **P1'**, **P3'** oraz **P4'** są analogiczne do produktów przemian C-857, co przedstawiłam tabeli 22. Dodatkowo podczas przemian związku C-857. W obecności enzymów mikrosomalnych w wyniku



biotransformacji związku C-857 powstały produkty P1 i P5 (tab. 21), z których P5 ma strukturę cykliczną identyczną jak metabolit P3' pochodnej C-1748.

Tabela 22. Produkty metabolizmu związku C-1748 powstające w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura.

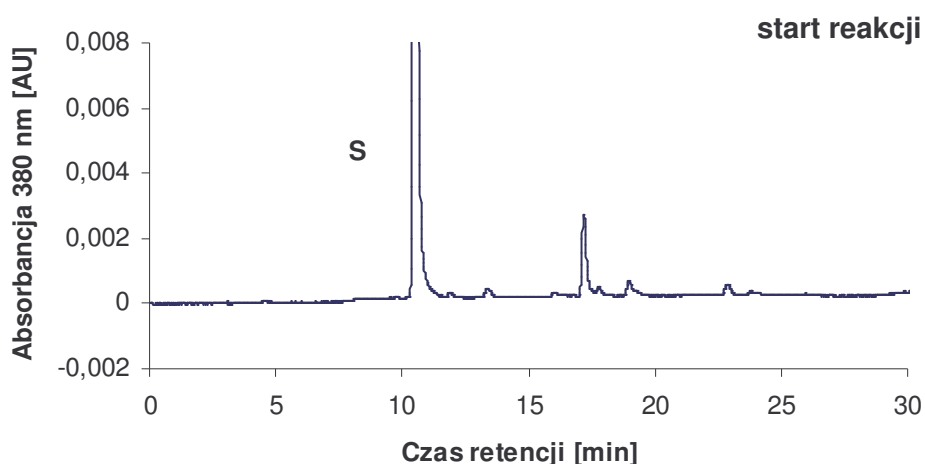
	m/z	struktura
Substrat	298	
P1'	268,0	
P3'	280,0	
P4'	225,0	

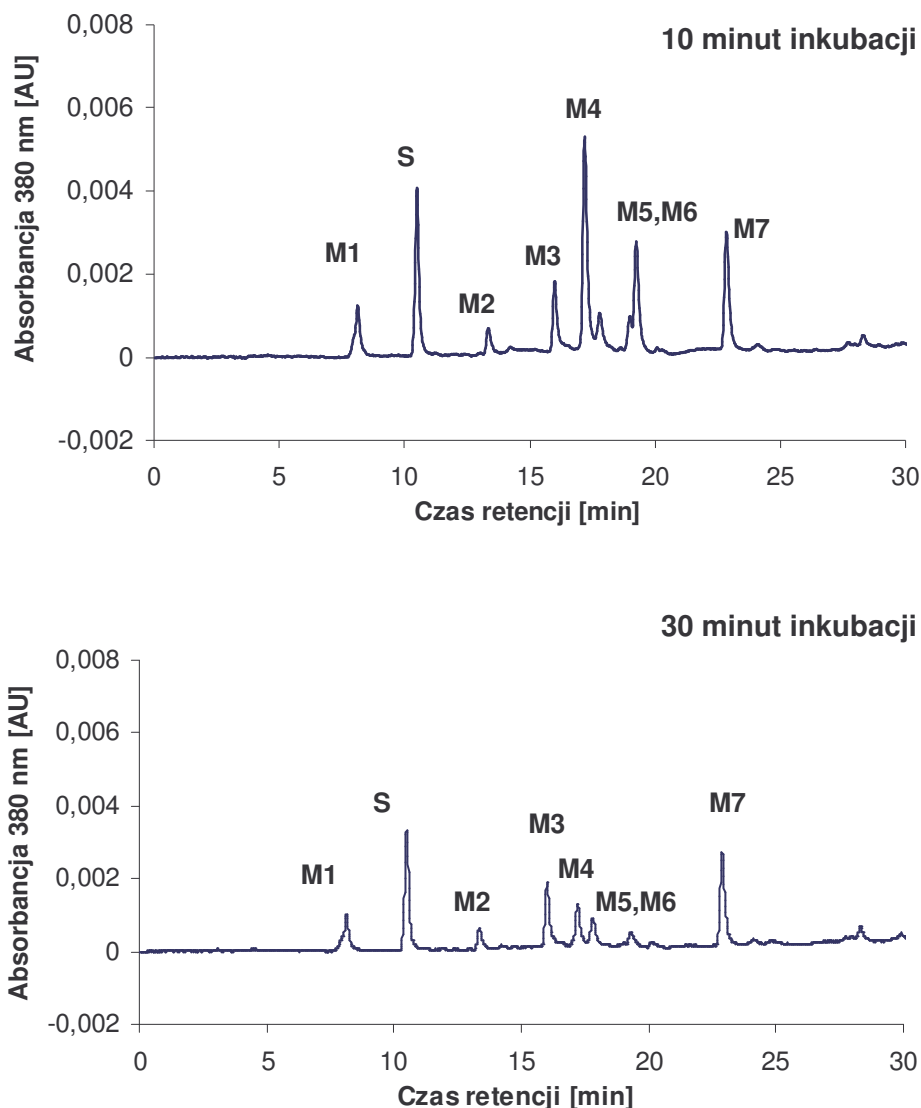
#### 4.4 Badanie przemian metabolicznych związków C-857 i C-1748 obserwowanych pod wpływem różnych enzymów mikrosomalnych wątroby człowieka

Dążąc do poznania metabolizmu związków C-857 i C-1748 zachodzących w organizmie człowieka zbadalam transformację tych pochodnych w obecności wybranych enzymów mikrosomalnych pochodzenia ludzkiego tj. frakcji enzymów mikrosomalnych wątroby, rekombinantowej reduktazy cytochromu P450 oraz wybranych rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450, które charakteryzowały się dodatkowo różnym poziomem koekspresji reduktazy cytochromu P450.

##### 4.4.1 C-857 wobec enzymów mikrosomalnych

Badania przemian metabolicznych związku C-857 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych prowadziłam w takich samych warunkach, jak reakcję z enzymami mikrosomalnymi wyizolowanymi z komórek wątroby szczura (część eksperymentalna, punkt 5.7.3.). Analizę HPLC badanej przemiany prowadzoną w optymalnych warunkach reakcji przedstawiłam na rys.147.





Rys. 147. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej w zależności od czasu inkubacji 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2 mg/ml frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z wątroby człowieka.

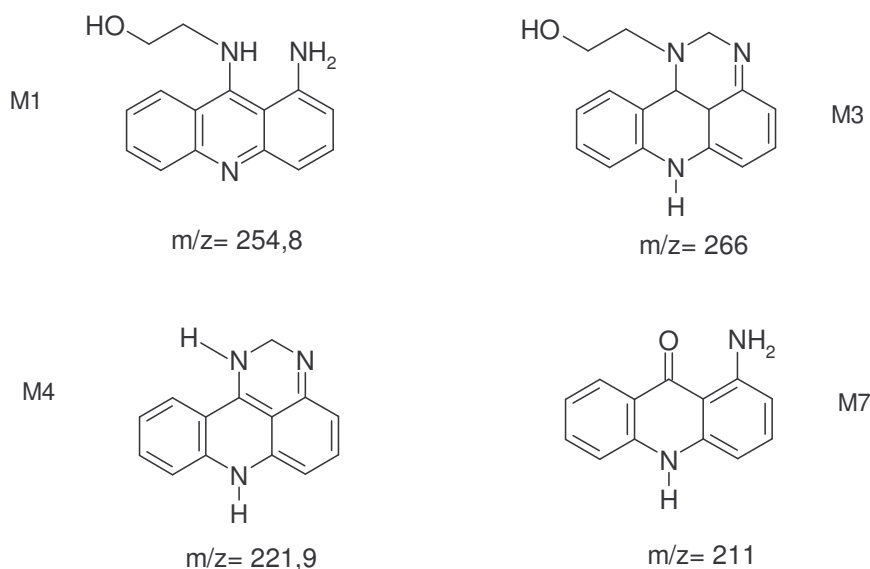
Wykazałam, że charakter reakcji biotransformacji związku C-857 pod wpływem ludzkich enzymów mikrosomalnych jest podobny do obserwowanego wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby szczura (rys.70). Jednocześnie stopień przereagowania ( $S_s$ ) i stężenie powstających produktów (C) różnią się nieco po inkubacji z enzymami mikrosomalnymi wyizolowanymi z komórek wątroby szczura, ( $M_s$ ), od tych obserwowanych dla enzymów wyizolowanych z komórek wątroby szczura, którym wcześniej podawano związki podwyższające ekspresję enzymów cytochromu P450 – (E), a także ludzkich enzymów mikrosomalnych, ( $M_L$ ). Różnice te można opisać następującymi równaniami:

$$S_s (E) \sim S_s (M_L) > S_s (M_S)$$

$$C (M_S) > C (M_L) \sim C (E)$$

Stężenie produktów powstających w reakcji z ludzkimi enzymami mikrosomalnymi jest niższe, niż wobec mieszaniny szczurzych enzymów mikrosomalnych, ale zbliżone do stężenia produktów w obecności szczurzych izoenzymów z rodziny: CYP1A, CYP2B, CYP3A i CYP4A.

Na podstawie porównania widm UV-VIS oraz ESI-MS wykazałam, że cztery powstające produkty są identyczne z produktami powstającymi wcześniej wobec różnych szczurzych enzymów mikrosomalnych. Ich struktury chemiczne przedstawiłam na rys. 148.

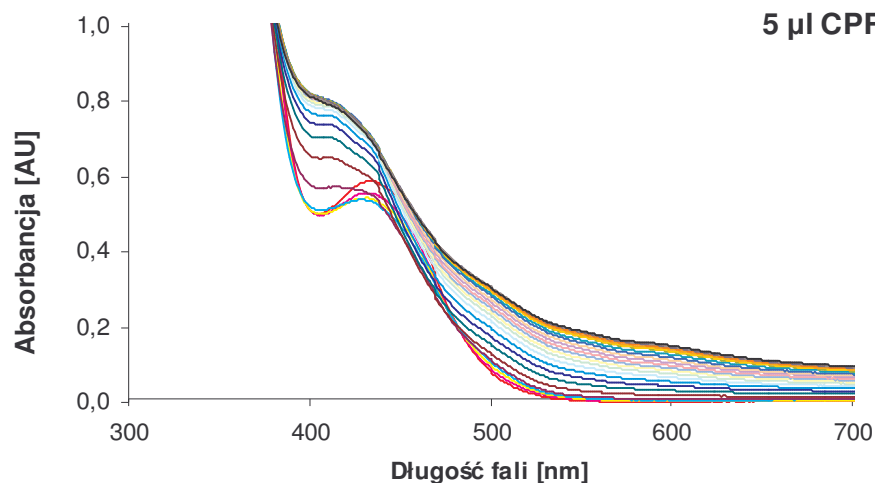


Rys. 148. Struktury chemiczne produktów przemian związku C-857 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych.

#### 4.4.2 C-857 wobec reduktazy cytochromu P450, CPR

W sytuacji, gdy nie zaobserwowałam istotnych różnic między produktami powstającymi po inkubacji związku C-857 ze szczurzymi białkami mikrosomalnymi o podwyższonej ekspresji wybranych rodzin izoenzymów cytochromu P450 postanowiłam zbadać, jaką rolę odgrywa w tych przemianach enzym współpracujący z kompleksem monooksygenazy cytochromu P450, NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450. Dzięki uprzejmości prof. C.R. Wolfa z Biomedical Research Centre, Uniwersytetu w Dundee otrzymaliśmy rekombinantową u *E. coli* ludzką reduktazę cytochromu P450. Badania te były częścią pracy magisterskiej Pani Karoliny Jagiełło.

Przeprowadzone wstępnie badania spektrofotometryczne (część eksperymentalna rozdz. 5.7.4.1.), których wyniki przedstawione na rys. 149 pozwoliły wybrać warunki reakcji:



Rys. 149. Widmo absorpcyjne mieszaniny reakcyjnej związku C-857 z CPR; 0,2 mM C-857, 1 mM NADPH.

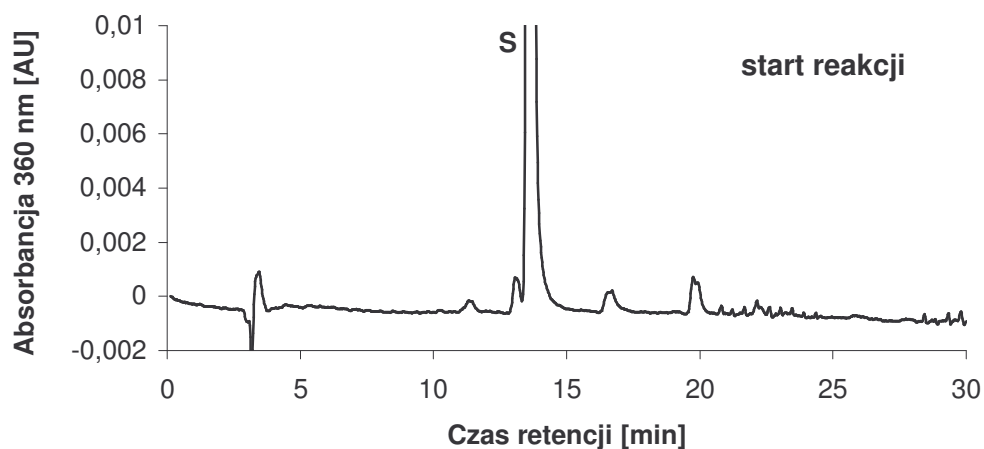
Optymalne warunki reakcji to:

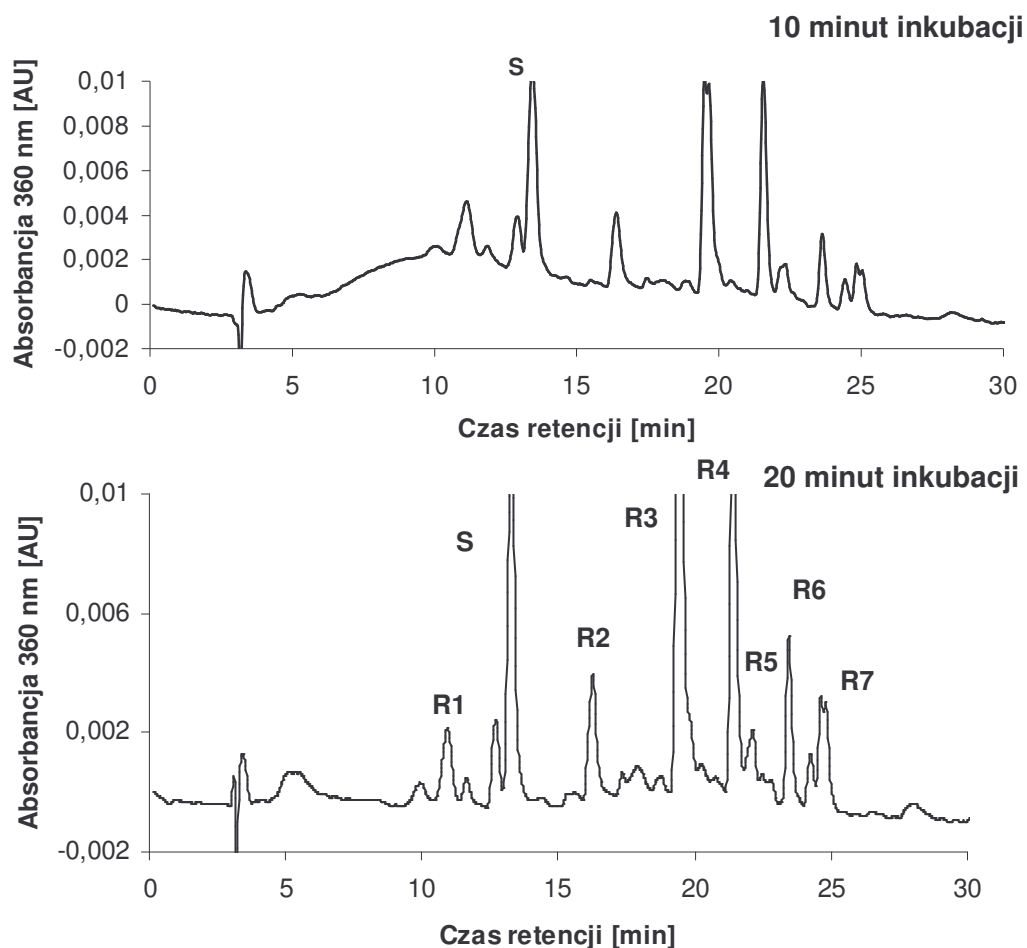
- ◆ 0,2 mM C-857
- ◆ 1 mM NADPH
- ◆ 5 µl reduktazy cytochromu P450 o stężeniu 1 U/1 µl
- ◆ roztwór buforowy, RCPR o pH 7,4

#### 4.4.2.1 Przemiany metaboliczne wobec CPR

Chromatogramy mieszanin reakcyjnych otrzymanych według opisu w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.4.2. przedstawiłam na rys. 150.

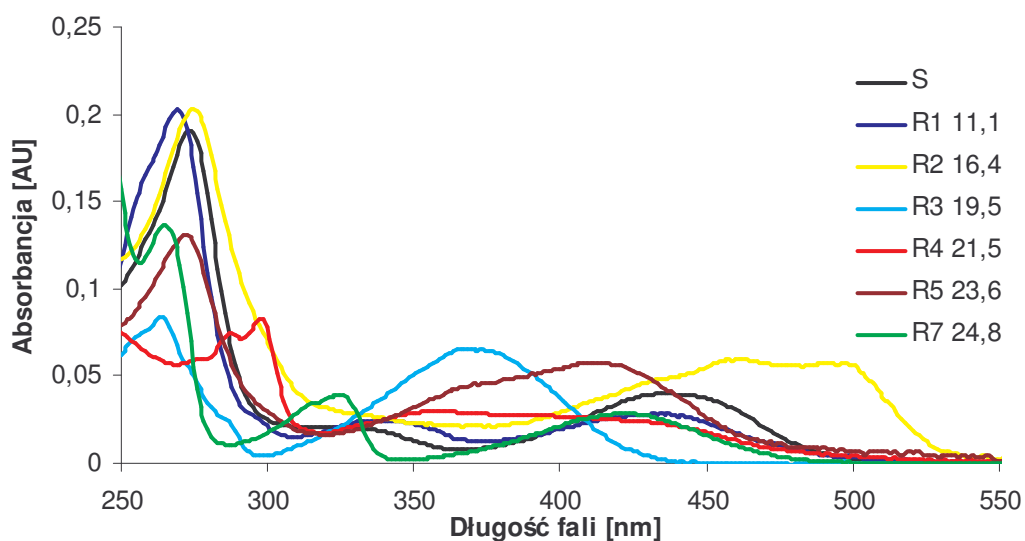
#### C-857





Rys. 150. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej zależności od czasu; 0,2 mM C-857, 0,8 mM NADPH, 0,5  $\mu$ l CPR po 0, 10 i 20 minutach inkubacji.

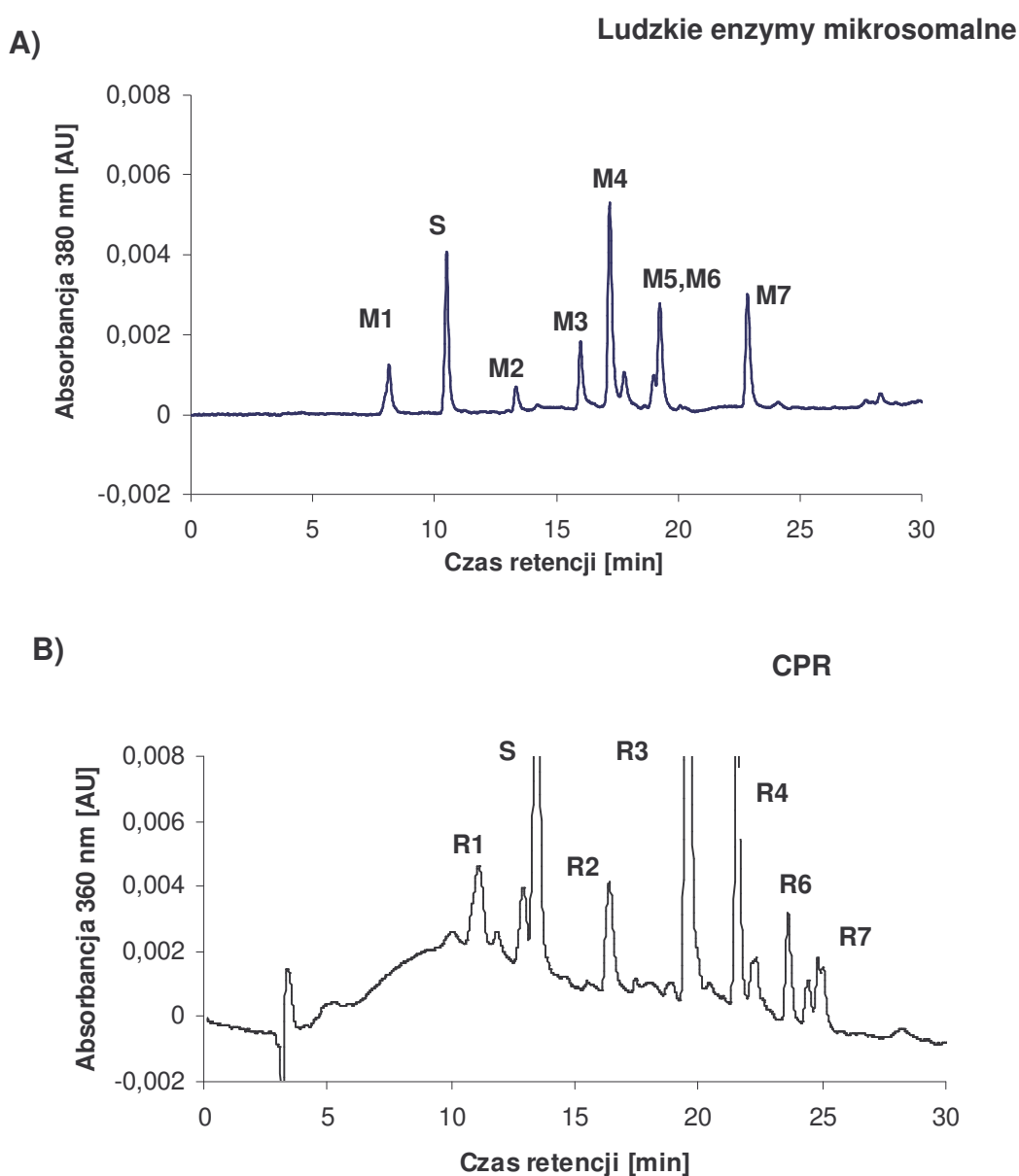
Przemiany metaboliczne związku w obecności reduktazy prowadzą do powstania 7 głównych metabolitów o bardzo zróżnicowanych widmach UV-VIS (rys. 151).



Rys. 151. Widma UV-VIS substratu i produktów przemian metabolicznych związku C-857 w obecności CPR.

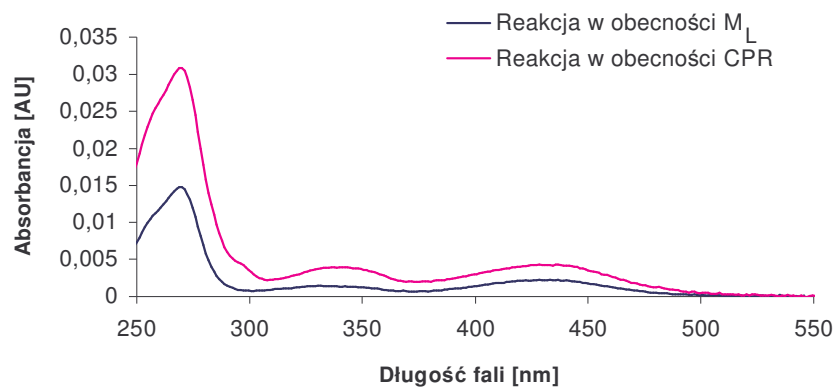
#### 4.4.2.2 Reduktaza cytochromu P450, a enzymy mikrosomalne w metabolizmie pochodnej C-857

Otrzymane powyżej wyniki przemian metabolicznych pochodnej C-857 w obecności reduktazy cytochromu P450 porównałam z biotransformacją związku wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych. Chromatograficzne obrazy tych reakcji przedstawiłam na rys.152. Wskazały one, że reakcja biotransformacji badanego związku przebiega bardzo podobnie w obu przypadkach. Czasy retencji pików produktów związku C-857 powstających w obecności enzymów mikrosomalnych i reduktazy cytochromu P450 okazały się być bardzo zbliżone. W celu potwierdzenia identyczności struktury tych metabolitów porównałam ich widma absorpcyjne, co przedstawiłam na rys. 153.

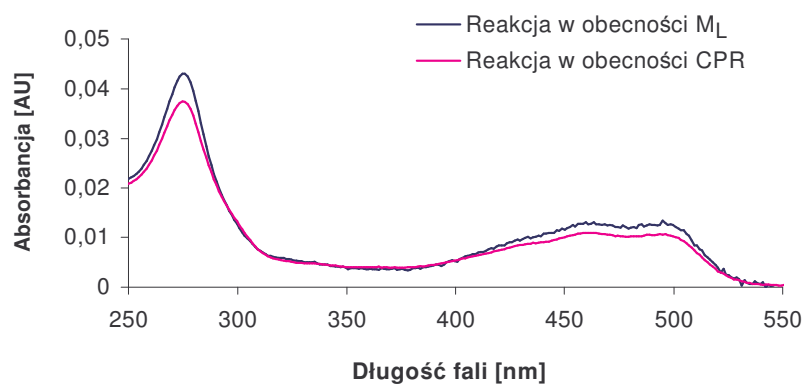


Rys. 152. Porównanie przebiegu przemian metabolicznych pochodnej C-857 po 10 minutach inkubacji wobec: A ) ludzkich enzymów mikrosomalnych, 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2mg/ml białka B ) CPR 0,2 mM C-857, 0,8 mM NADPH, 1  $\mu$ l CPR..

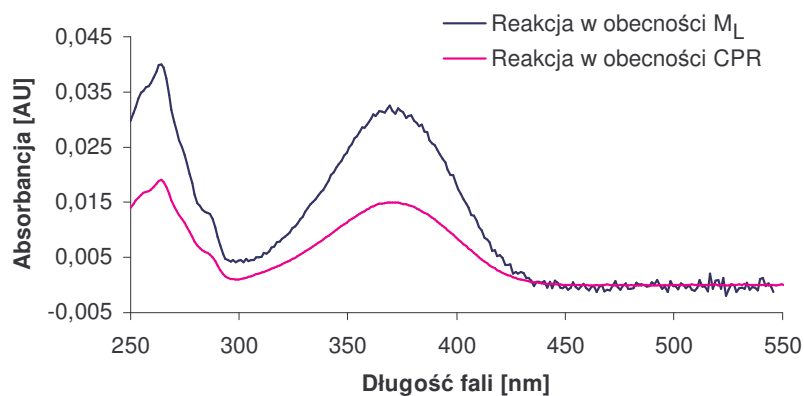
A) R1/M1



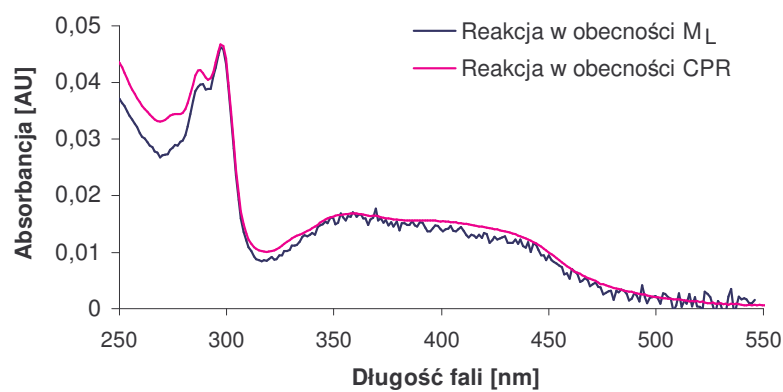
B) R2/M2



C) R3/M3

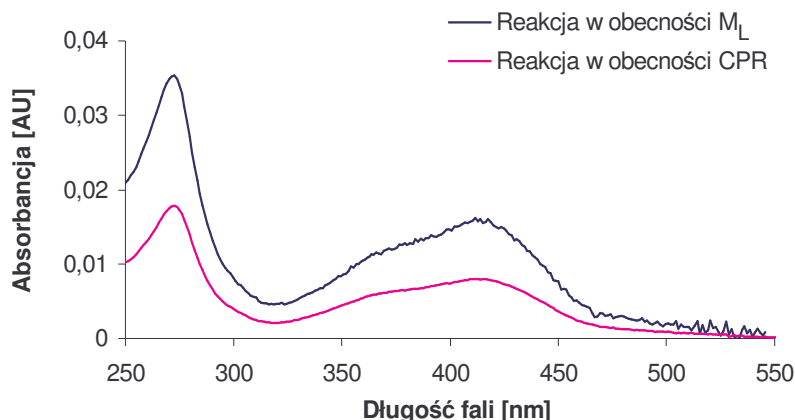


D) R4/M4

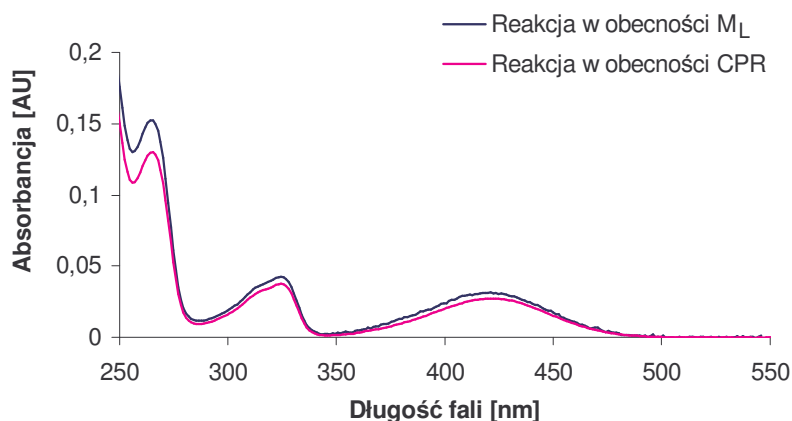




E ) R6/M6



F ) R7/M7



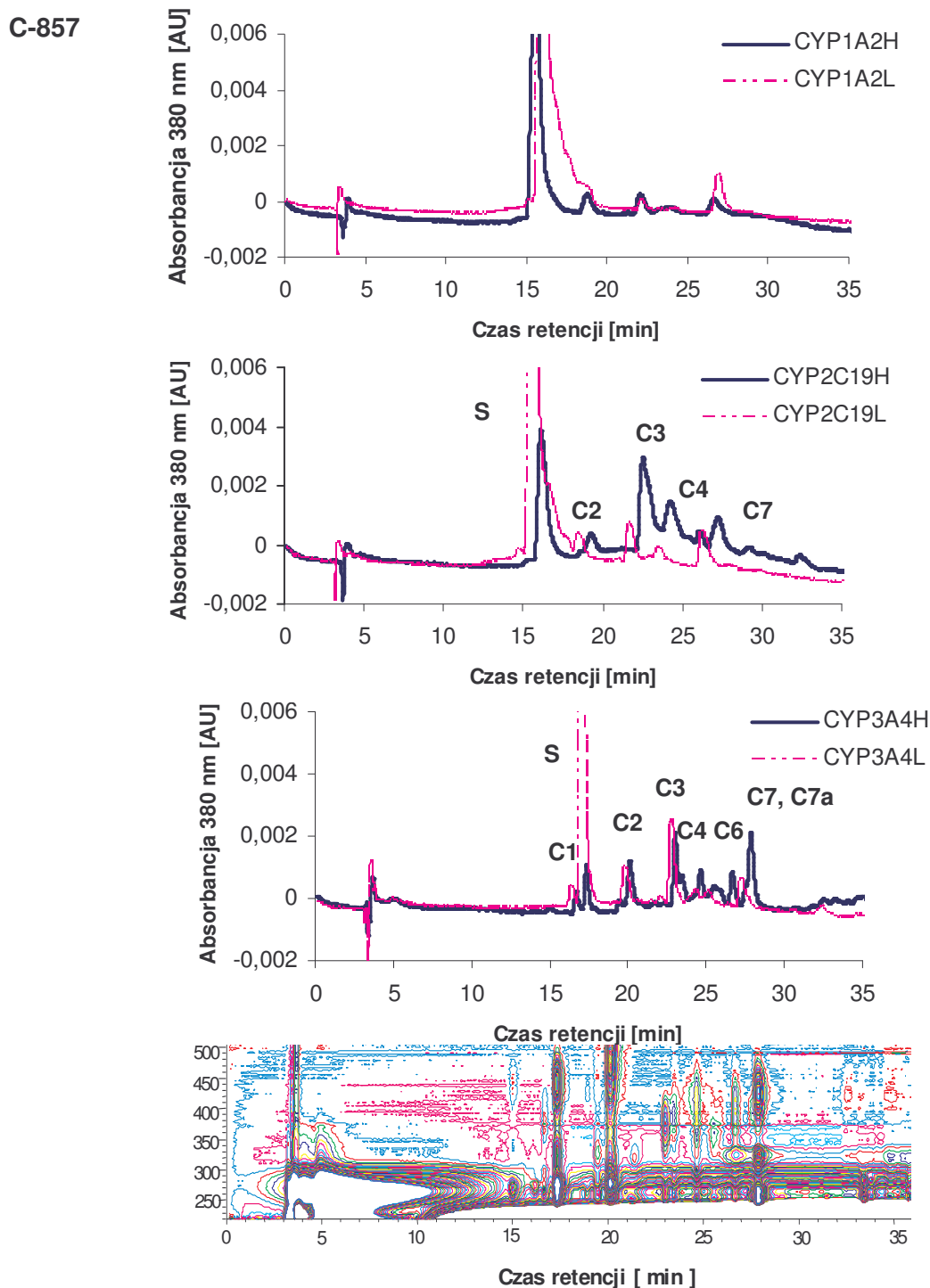
Rys. 153. Porównanie widm UV-VIS wybranych produktów aktywacji C-857 w obecności CPR i ludzkich enzymów mikrosomalnych A) R1/M1; B) R2/M2; C) R3/M3; D) R4/M4; E) R6/M6; F) R7/M7.

Przedstawiona analiza widm UV-VIS porównywanych pików chromatograficznych wskazuje jednoznacznie, że sześć produktów metabolizmu pochodnej C-857 powstających z udziałem reduktazy obserwowano również podczas przemian tego związku w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych. Struktury chemiczne trzech z tych produktów: R1, R3, R7 przedstawiłam wcześniej w rozdziale 4.4.1.

#### 4.4.3 Biotransformacja związku C-857 wobec rekombinantowych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4

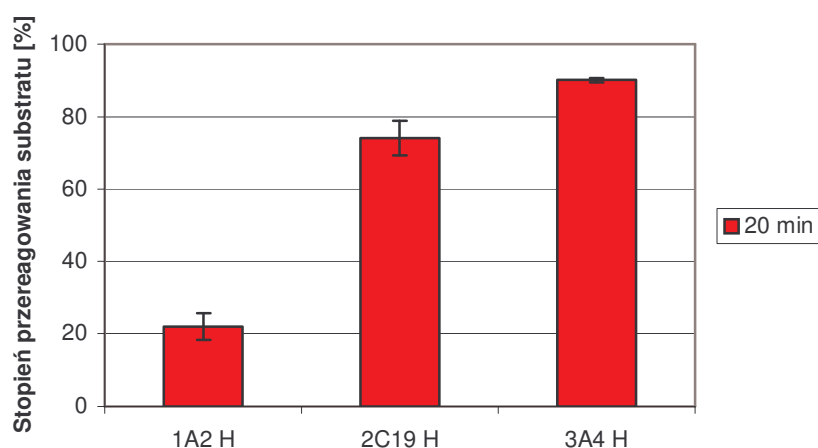
Prowadzone dotychczas badania udowodniły, że pochodna C-857 jest niemal w identyczny sposób metabolizowana zarówno przez mieszaninę enzymów mikrosomalnych zawierających cytochromy P450, jak i ludzką rekombinantową NADPH-zależną reduktazę cytochromu P450. Poszukując więc, selektywności w metabolizmie C-857 w następnym etapie pracy porównałam dotychczasowe wyniki z wynikami transformacji enzymatycznej tego związku w obecności ludzkich rekombinantowych

u *E. coli* izoenzymów cytochromu P450: 1A2, 2C19 oraz 3A4. Izoenzymy te dodatkowo charakteryzowały się niskim (L) lub wysokim (H) poziomem koekspresji genu reduktazy cytochromu P450. Wobec wyników przedstawionych powyżej można było spodziewać się, że wyizolowane izoenzymy P450 będą słabiej indukowały przemiany związku C-857 przy obniżonej ekspresji reduktazy cytochromu P450. Analizę HPLC mieszanin reakcyjnych dla związku C-857 inkubowanego z izoenzymami cytochromu P450 przedstawiłam na rysunku 154.



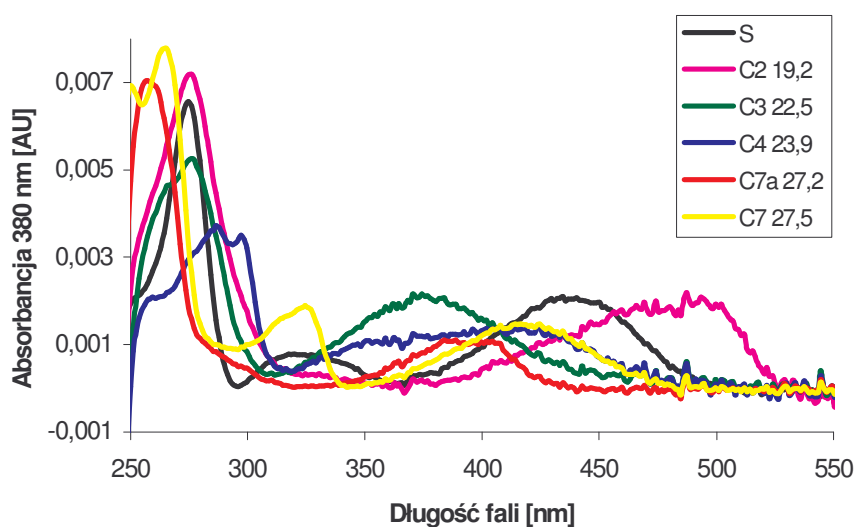
Rys. 154. Chromatograficzny obraz metabolizmu związku C-857 wobec izoenzymów cytochromu P450 z różnym poziomem koekspresji CPR: A ) CYP1A2; B ) CYP2C19; C ) CYP3A4-wykres liniowy; D ) CYP3A4 –wykres poziomicowy; 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 50 pmol enzymu.

Wskazuje ona, że związek C-857 jest wrażliwy na przemiany w obecności wszystkich wybranych izoenzymów cytochromu P450, jednak stopień przereagowania substratu oraz stężenie powstających produktów są silnie określone przez rodzaj izoenzymu P450 i poziom reduktazy P450. Wyraźnie tylko dwa spośród badanych enzymów są zaangażowane w transformację związku C-857: CYP2C19 i CYP3A4, co ilustruje rys 154. Izoenzym CYP1A2 metabolizuje związek C-857 tylko w niewielkim stopniu. Ponadto reduktaza z nim współpracująca wywiera znacznie słabszy wpływ na aktywność izoenzymu CYP1A2, niż w przypadku reakcji katalizowanych przez pozostałe izoenzymy. (rys.155).



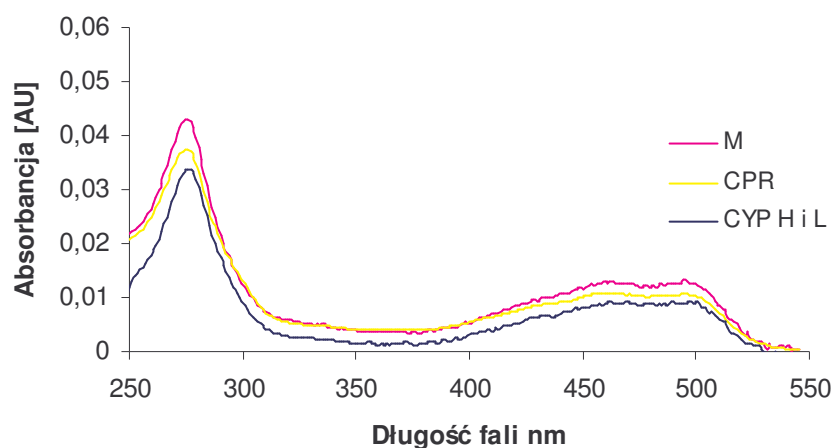
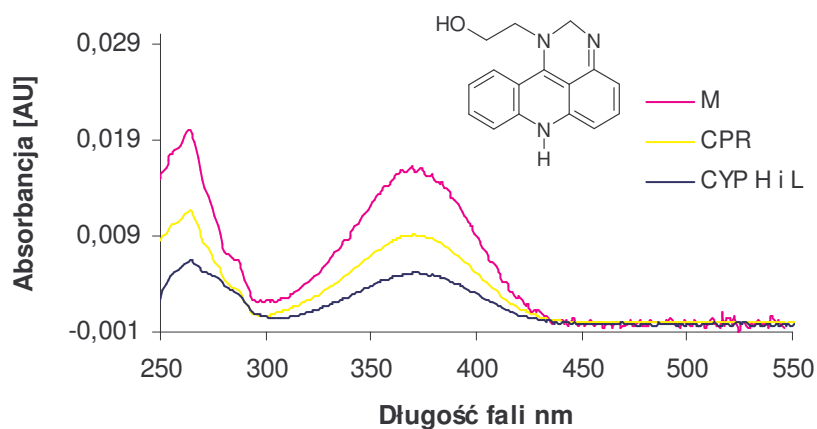
Rys. 155. Stopień przereagowania związku C-857 wobec izoenzymów cytochromu P450 z wysokim poziomem koekspresji CPR, 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 200 pmol, 90min

Po inkubacji pochodnej C-857 z izoenzymem CYP2C19 powstają 4 główne metabolity: C2, C3, C4 i C7 natomiast w obecności CYP3A4 powstaje ich aż 6. Odpowiednie widma UV-VIS przedstawiłam na rys. 156.

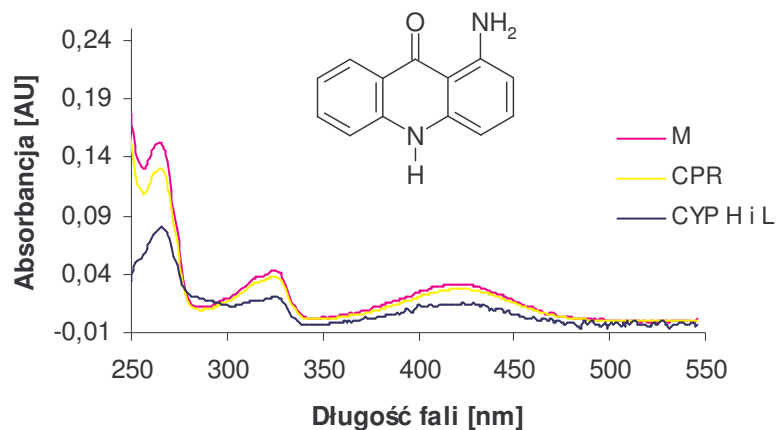


Rys. 156. Widma UV-VIS substratu i produktów przemian związku C-857 wobec CYP2C19 o wysokim poziomie koekspresji reduktazy cytochromu P450.

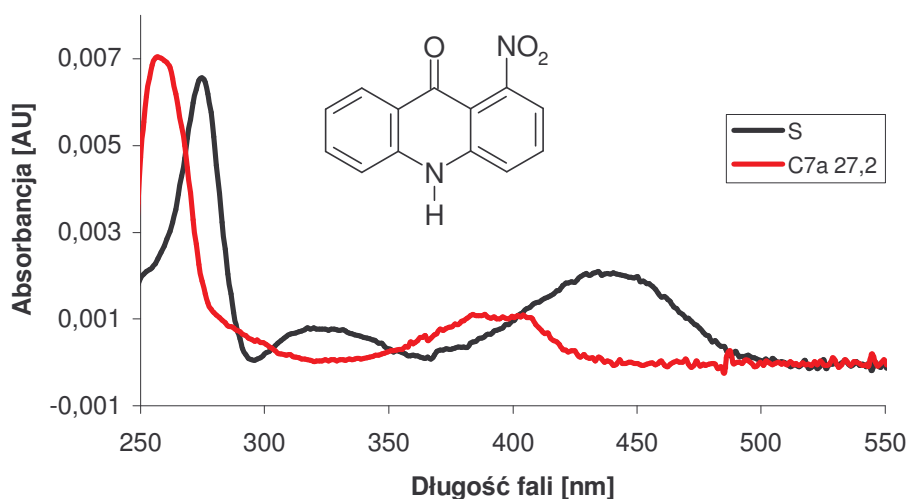
Na podstawie analizy widm UV-VIS oraz ESI-MS wykazałam, że niezależnie od stosowanego izoenzymu cytochromu P450 biotransformacja związku C-857 prowadzi do powstania trzech wspólnych produktów: C2, C3, C7, których widma UV-VIS i proponowane struktury chemiczne przedstawiłam poniżej na rys. 157. W przypadku metabolitu C2 nie zaproponowałam struktury chemicznej. Analiza ESI-MS pików tego produktu wykazała obecność jonu  $m/z = 300$ . Wartość ta jest o 16 jednostek wyższa od masy substratu, co sugeruje obecność dodatkowego atomu tlenu w cząsteczce tego metabolitu. Produkty te obserwowałam już wcześniej podczas reakcji związku C-857 z reduktazą cytochromu P450 oraz z różnymi enzymami mikrosomalnymi. Dodatkowy produkt powstający podczas przemian związku C-857 z izoenzymem CYP3A4 to przedstawiony na rys. 158 1-nitroakrydon, który powstawał już wcześniej podczas reakcji chemicznej redukcji tej pochodnej C-857 w obecności DTT.

**C2****C3**

C7



Rys. 157. Widmo UV-VIS i prawdopodobna struktura chemiczna produktów: C2, C3, C7.

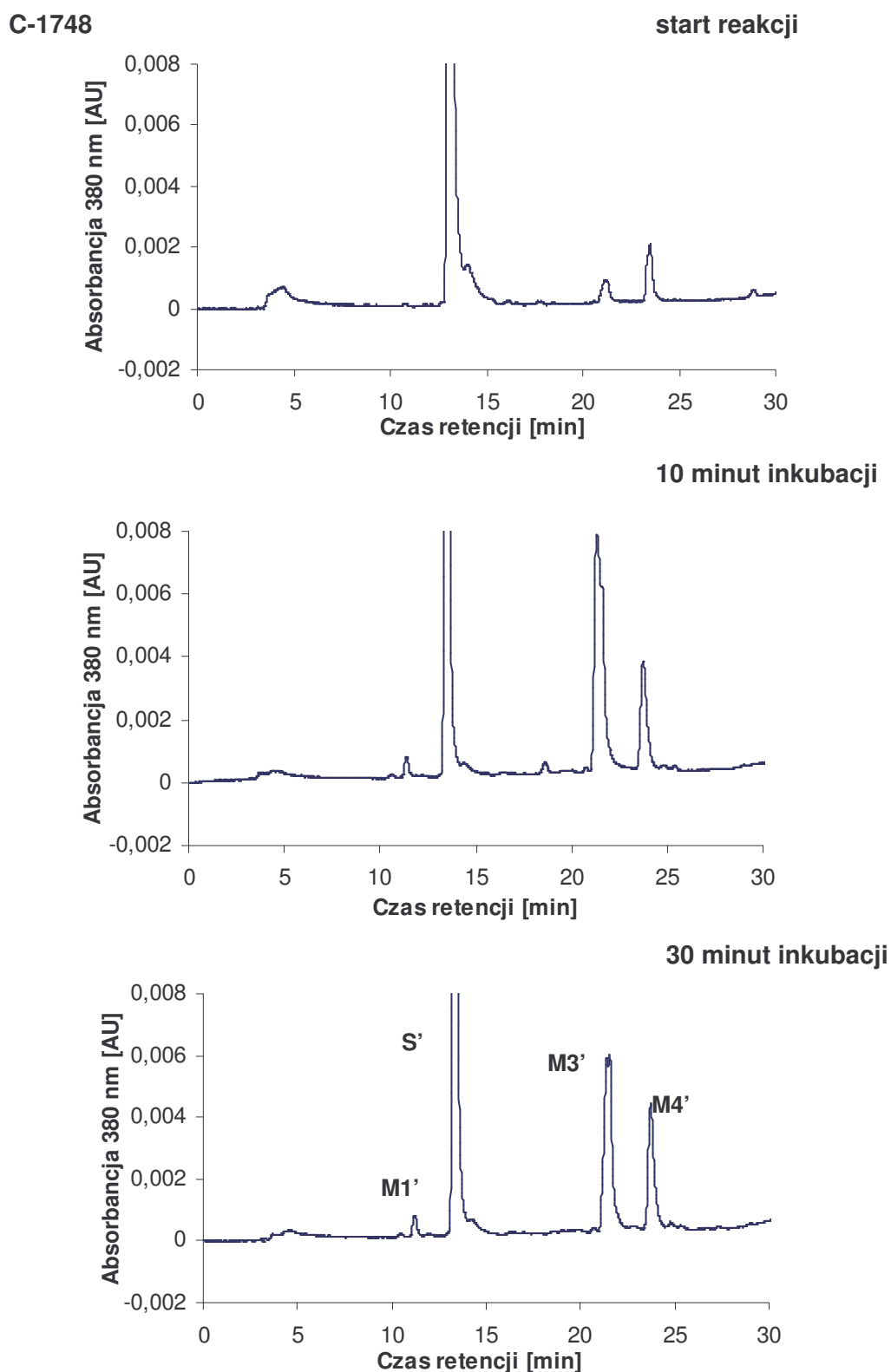


Rys. 158. Widmo UV-VIS produktu C7a, 1-nitroakrydonu.

Podsumowując wyniki badań przeprowadzonych w tym etapie pracy wykazałam, że CYP1A2 ma słabszy wpływ na przemiany związku C-857, niż izoenzym: CYP2C19 a szczególnie CYP3A4.

#### 4.4.4 Przemiany związku C-1748 (Capridine $\beta$ ) wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych

Analiza chromatograficzna przemian metabolicznych związku C-1748 zachodzących w obecności mieszaniny ludzkich enzymów mikrosomalnych przedstawiłam na poniższym rysunku.



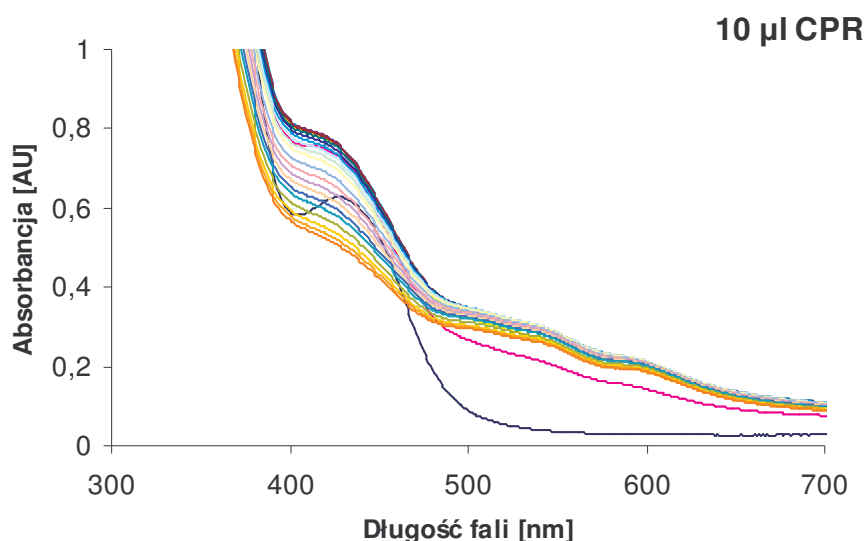
Rys. 159. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej po 0, 10 i 30 minutach inkubacji 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml frakcji ludzkich enzymów mikrosomalnych.

Wyniki wskazują, że transformacja związku C-1748 w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych zachodzi podobnie do przemian w obecności enzymów wyizolowanych z komórek wątroby szczurów (rys.73) i znacznie słabiej, niż transformacja związku C-857 w tych samych warunkach. Podczas przemian związku C-1748 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych powstają trzy główne produkty, z których najwyższe stężenie mają dwa metabolity: produkt M3' z dodatkowym pierścieniem sześciocłonowym utworzonym przez dwa atomy azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny i produkt M4', 1-aminoakrydon. Trzeci produkt M1' ma zredukowaną grupę nitrową i powstaje w bardzo niskim stężeniu.

#### 4.4.5 C-1748 wobec reduktazy cytochromu P450 (CPR)

Poszukując selektywności w metabolizmie związku C-1748 w porównaniu z pochodną C-857 podobnie, jak w przypadku związku C-857 zbadalam biotransformację pochodnej C-1748 wobec reduktazy cytochromu P450. Po wstępnych próbach z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej (rys. 160) określiłam warunki prowadzenia tej reakcji:

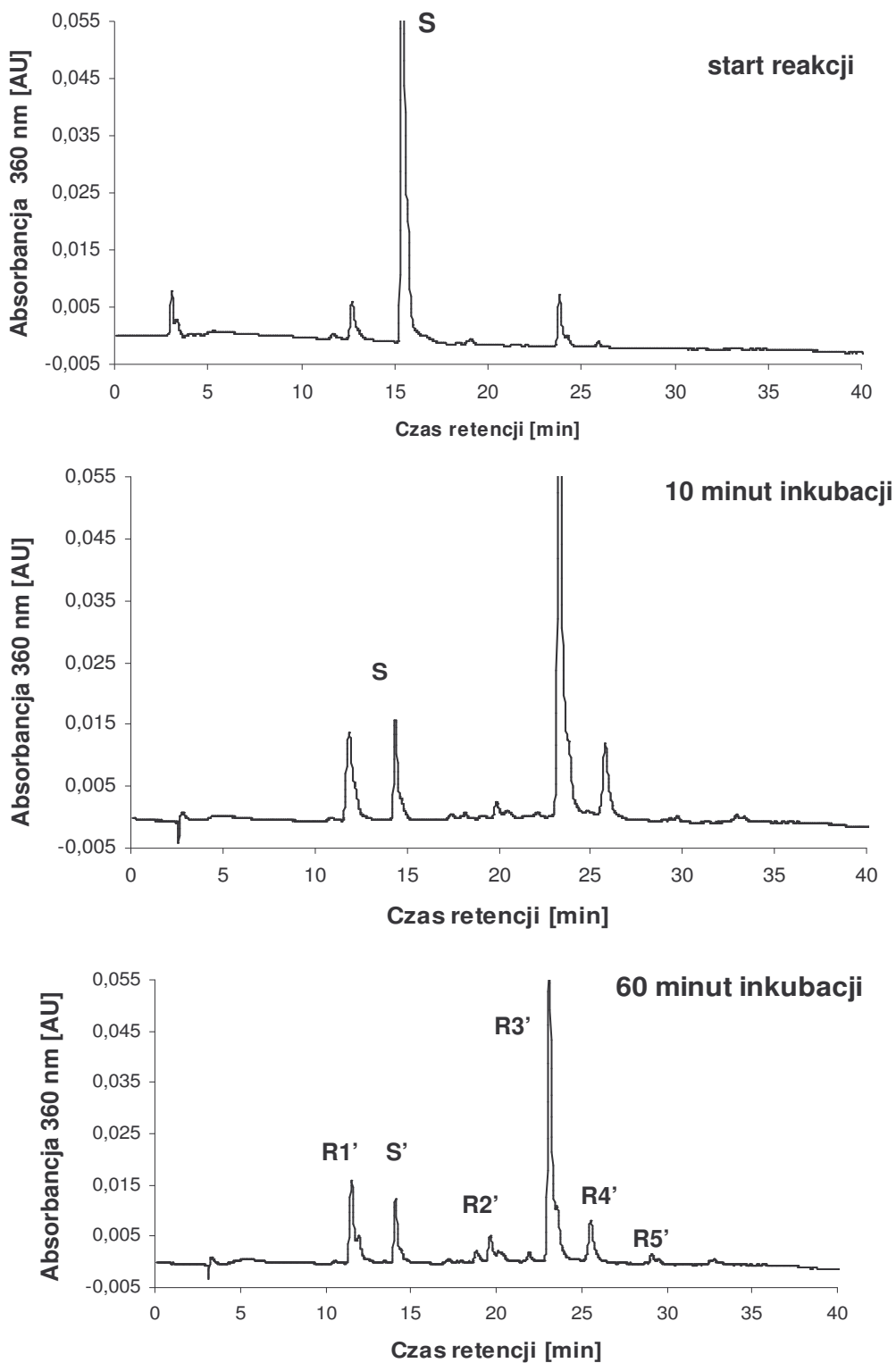
- ◆ 0,2 mM C-1748
- ◆ 1mM NADPH
- ◆ 10  $\mu$ l reduktazy cytochromu P450 o stężeniu 1 U/1  $\mu$ l
- ◆ roztwór buforowy RCPR o pH 7,4



Rys. 160. Widmo absorbcyjne mieszaniny reakcyjnej związku C-1748 z CPR; 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 10  $\mu$ l CPR.

#### 4.4.5.1 Przemiany metaboliczne związku C-1748 wobec CPR

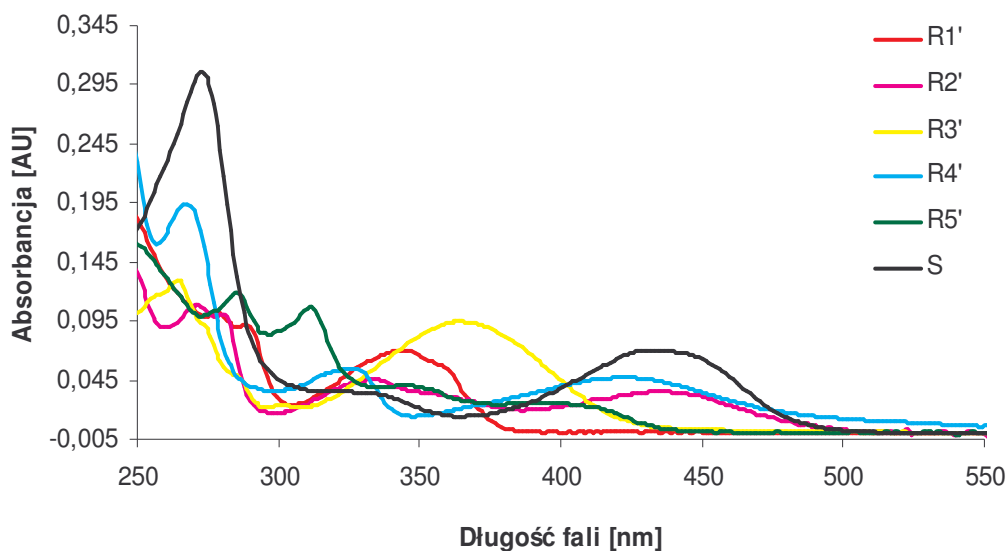
Przedstawiona poniżej na rys. 161 analiza chromatograficzna przemian metabolicznych C-1748 potwierdziła niższą wrażliwość tego związku na enzymatyczną biotransformację z CPR, w porównaniu z pochodną C-857.



Rys. 161. Chromatograficzny obraz mieszaniny reakcyjnej w zależności od czasu inkubacji; 0,2 mM C-1748, 1 mM NADPH, 2  $\mu$ l CPR.



Przemiany metaboliczne pochodnej C-1748 w obecności reduktazy prowadzą do powstania 5 metabolitów, przy czym zdecydowanie przeważa jeden z nich, produkt R3' o strukturze z dodatkowym sześciocłonowym pierścieniem.



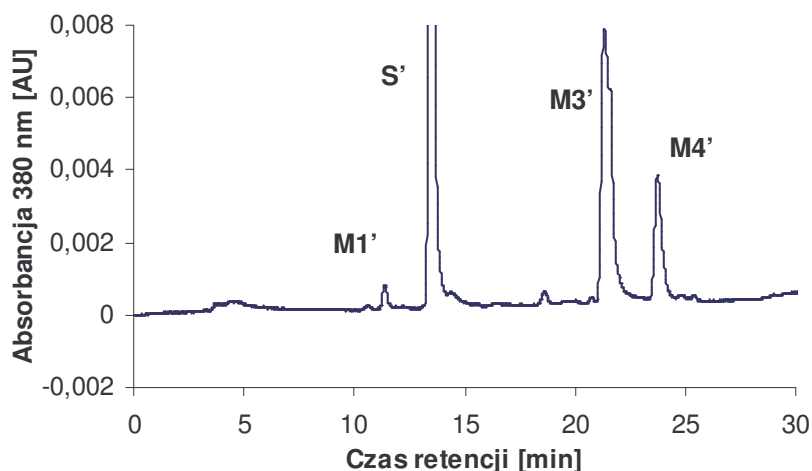
Rys. 162. Widma UV-VIS substratu i produktów przemian metabolicznych związku C-1748 w obecności CPR..

#### 4.4.5.2 Reduktaza cytochromu P450, a enzymy mikrosomalne w metabolizmie pochodnej C-1748

W kolejnym etapie pracy porównałam przemiany metaboliczne związku C-1748 wobec CPR z biotransformacją tego związku wobec frakcji ludzkich enzymów mikrosomalnych, co przedstawiłam na rys. 164.

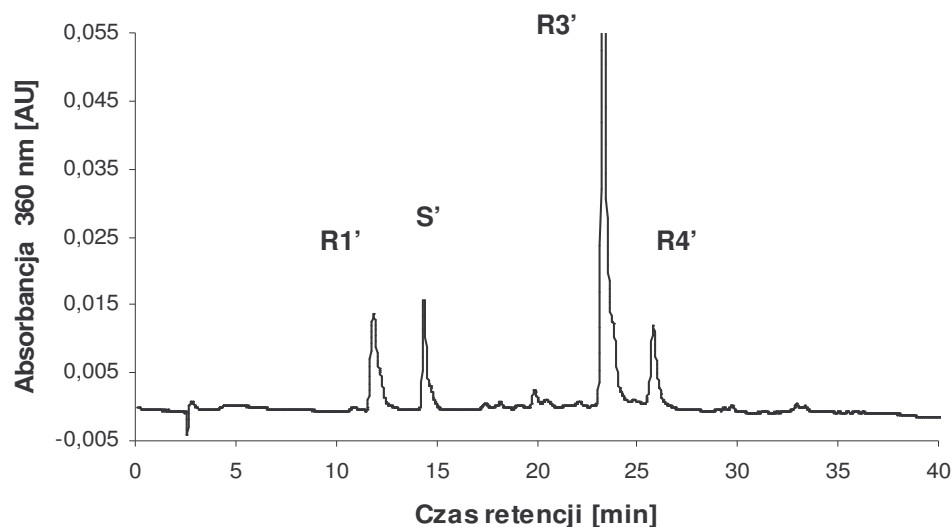
##### A) C-1748

##### ludzkie enzymy mikrosomalne



B)

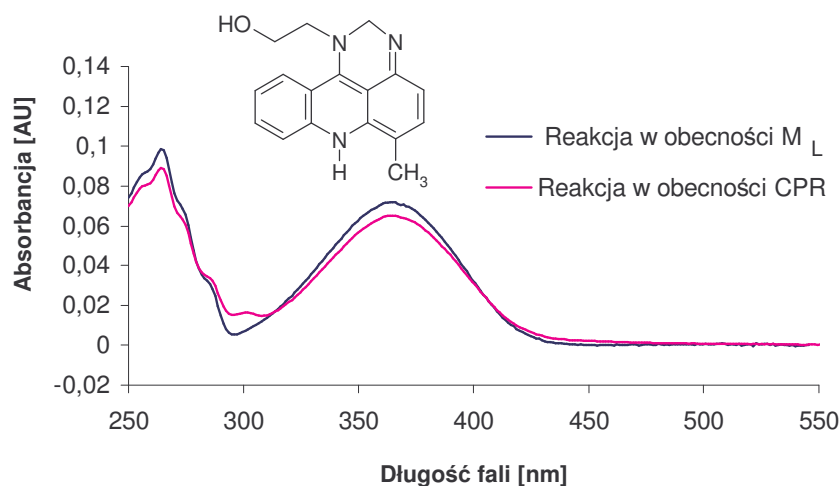
CPR



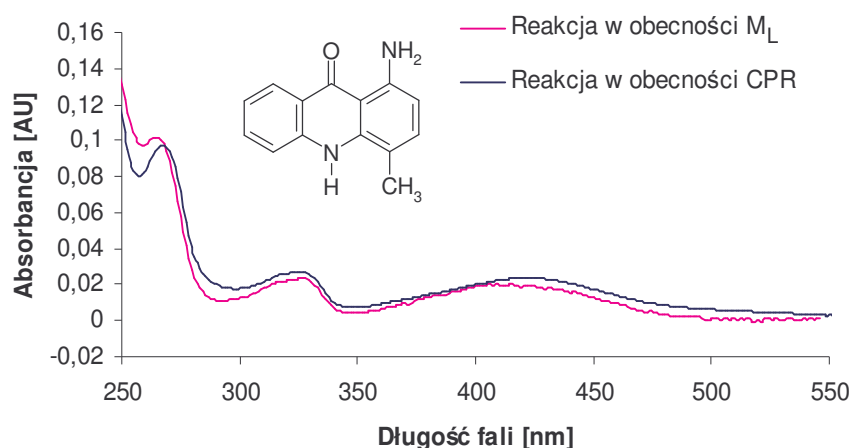
Rys. 163. Porównanie przebiegu przemian metabolicznych pochodnej C-1748 wobec: A) ludzkich enzymów mikrosomalnych, 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka, 10 minut inkubacji B) CPR 0,2 mM C-1748, 1 mM NADPH, 2  $\mu$ l CPR, 10 minut inkubacji.

Wykazałam, że związek C-1748 w porównywalnych warunkach jest bardziej reaktywny w obecności CPR, niż w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych, chociaż w obu przypadkach powstają trzy główne produkty R1', R3' i R4'. Porównując widma UV-VIS metabolitów związku C-1748 powstających wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych i reduktazy stwierdziłam, że tylko dwa z nich są wspólne (rys. 164). Są to: produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocłonowym, R3' i 1-aminoakrydon, R4'. Podczas inkubacji związku C-1748 z CPR powstaje nowy produkt R1', który nie powstaje w obecności enzymów mikrosomalnych, a jego maximum widma UV-VIS jest przesunięte w kierunku fal krótszych w stosunku do widma substratu.

A) R3'/M3'



## B) R4'/M4'



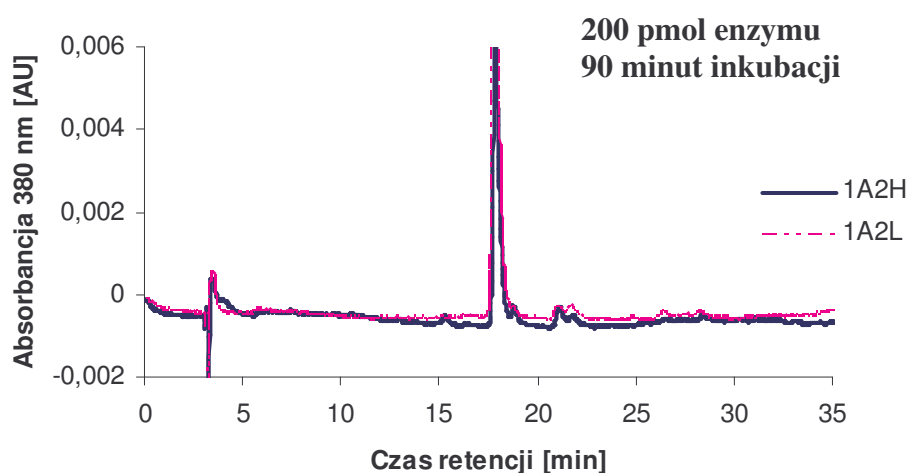
Rys. 164. Porównanie widm UV-VIS produktów aktywacji C-1748 w obecności CPR i ludzkich enzymów mikrosomalnych; A ) produkt R'3/M3', B ) produkt R4'/M4'.

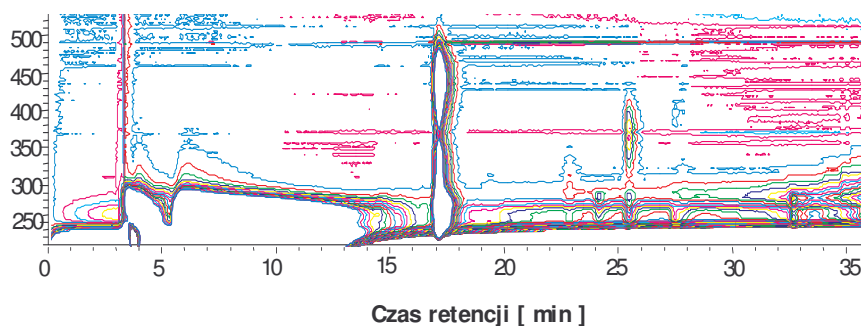
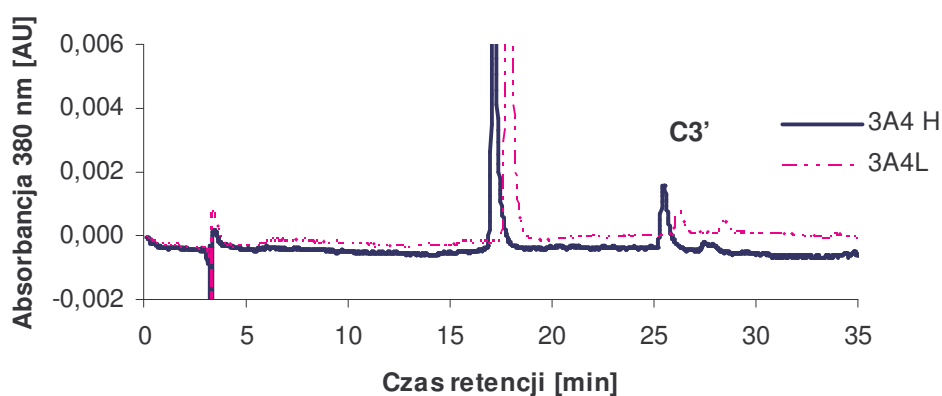
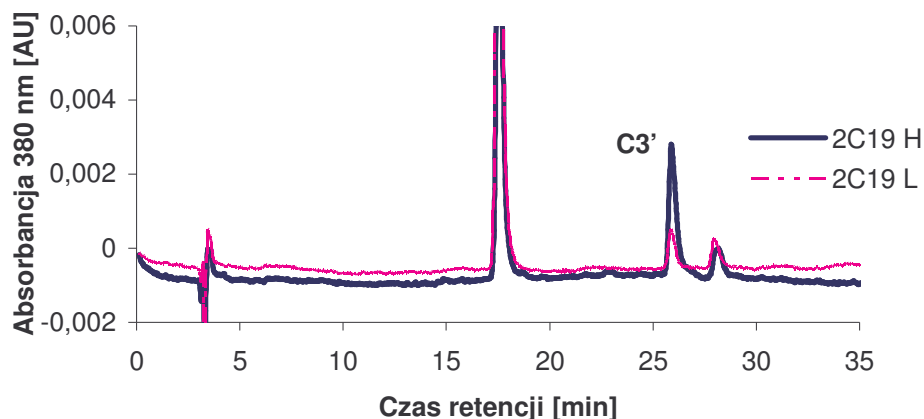
#### 4.4.6 Związek C-1748 (Capridine $\beta$ ) wobec wybranych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4

Wykazałam dotychczas, że pochodna C-1748 ulega przemianie w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych, zawierających m.in. izoenzymy cytochromu P450 i współpracującą z nimi reduktazę cytochromu P450.

Kontynuując badania metabolizmu związku C-1748 przeprowadziłam analizę transformacji tej pochodnej w obecności pojedynczych izoenzymów cytochromu P450 z wysokim i niskim poziomem koekspresji reduktazy. Były to ludzkie rekombinantowe izoenzymy cytochromu P450, CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4. Reakcje te prowadziłam przy 4-krotnie wyższym stężeniu enzymu, niż w przypadku związku C-857. Chromatogramy mieszanin reakcyjnych przedstawiłam na rysunku 165.

## C-857

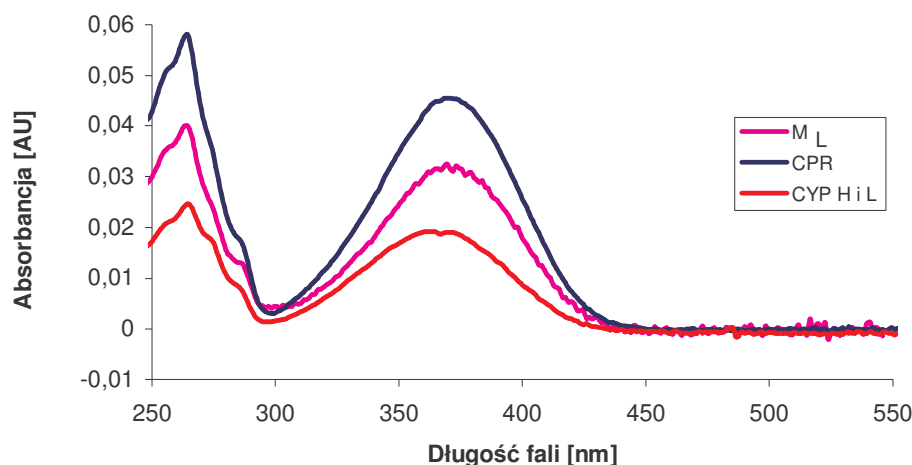




Rys. 165. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1748 po 90 minutach inkubacji wobec izoenzymów cytochromu P450 z wysokim i niskim poziomem koekspresji CPR: A ) CYP1A2; B ) CYP2C19; C) CYP3A4-wykres liniowy; D ) CYP3A4 –wykres poziomicowy; 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 200 pmoli.

Związek C-1748 wykazywał bardzo niską w porównaniu z C-857 podatność na przemiany enzymatyczne w obecności izoenzymów cytochromu P450, przy czym selektywność tych związków była bardzo zbliżona. Izoenzym CYP2C19 najsilniej metabolizował związek C-1748 natomiast CYP1A2 najslabiej. Podwyższony poziom koekspresji reduktazy istotnie podwyższał reaktywność związku C-1748 wobec tych enzymów. W badanej reakcji powstawał jeden metabolit, C3'. Jego widmo UV-VIS jest

identyczne z widmami metabolitów związku C-1748 powstającymi wobec CPR i enzymów mikrosomalnych, co przedstawiłam na rys. 166.



Rys. 166. Widmo UV-VIS wspólnego metabolitu C3' powstającego w wyniku przemian związku C-1748 w obecności: izoenzymów cytochromu P450, CPR i enzymów mikrosomalnych.

#### 4.4.7 Biotransformacja pochodnych 1-nitroakrydyny wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych z zastosowaniem tzw. Reaction Phenotyping Kit, RPK

Celem tego etapu pracy była kolejna próba uchwycenia selektywności działania izoenzymów cytochromu P450, które są odpowiedzialne za metabolizm badanych przede mną pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny. Dla realizacji tego zadania zastosowano tzw. Reaction phenotyping Kit, (RPK). Badania te były częścią pracy magisterskiej Pani Agnieszki Chrapkowskiej [141]. RPK to zbiór próbek enzymów mikrosomalnych wątroby, pobranych od różnych pacjentów, przy czym każda próbka ma oznaczoną zawartość izoenzymów P450 oraz kilku innych ważnych enzymów metabolizujących ksenobiotyki. Stosowany zestaw RPK zawierał szesnaście próbek różnych izoenzymów (oznaczonych jako H [nr]) pobranych od różnych dawców oraz próbkę będącą mieszaniną wszystkich analizowanych enzymów (MIX), która charakteryzowała „przeciętnego pacjenta”. RPK i zawierała szczegółowe informacje na temat dawców tych enzymów, co przedstawiłam poniżej w tabeli 24.

Tabela 23 Przykładowe informacje na temat dawców enzymów mikrosomalnych zawartych w RPK.

Płeć	Wiek	Rasa	Przyczyna Śmierci	Obecność wirusów			Palacz	Stosowane leki
				CMV	HIV	HTLV-1		

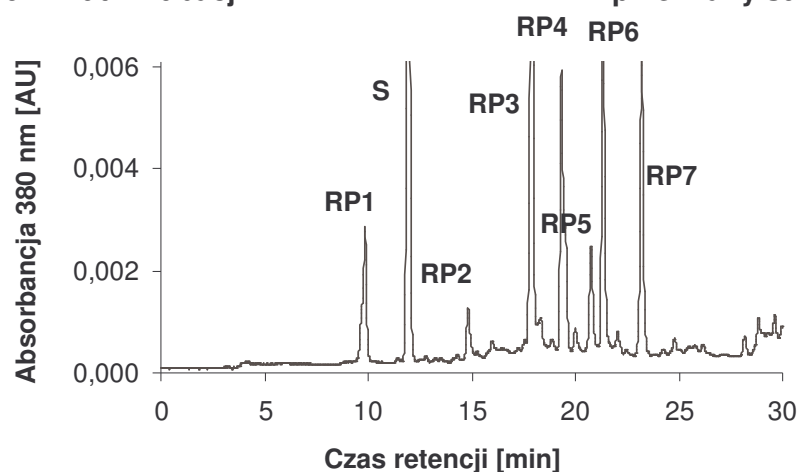
Poza tym próbki enzymów zostały starannie wyselekcjonowane tak, aby zminimalizować wzajemne korelacje występujące pomiędzy zawartością poszczególnych izoenzymów cytochromu P450, a w konsekwencji uniknąć wyników pozornych czy znacznie odbiegających od pozostałych wartości w zbiorze danych. Wymienione zjawiska mogłyby utrudniać analizę korelacyjną, którą należy przeprowadzać, aby otrzymać wynik mówiący o roli poszczególnych izoenzymów P450 i innych enzymów w metabolizmie badanego związku.

#### 4.4.7.1 Badanie przemian związku C-857 i C-1748 wobec RPK

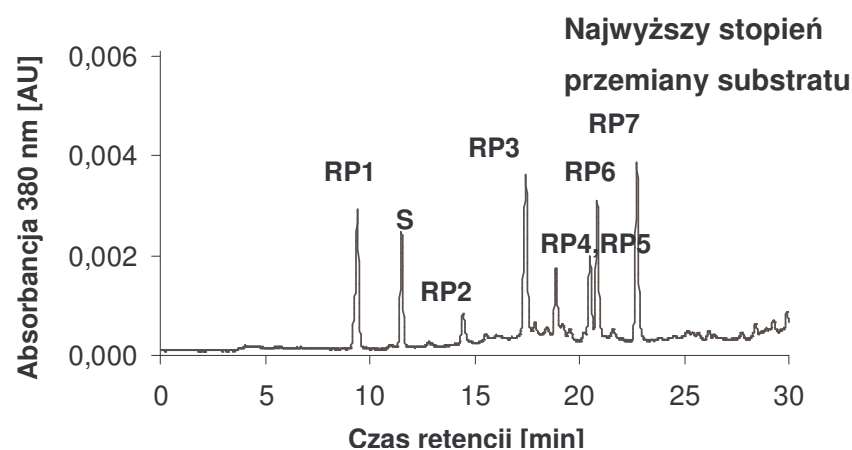
Na rysunku 167 przedstawiono dwa wybrane przykłady analizy chromatograficznej przemiany C-857 w obecności 17-tu próbek ludzkich enzymów zawartych w RPK. Przykłady dotyczą najniższego i najwyższego stopnia przereagowania związku C-857 wobec tych enzymów po 10 minutach inkubacji.

##### C-857

##### A) 10 minut inkubacji



##### B)



Rys. 167. Chromatograficzny obraz transformacji związku C-857 wobec enzymów mikrosomalnych komórek wątroby człowieka; 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2 mg/ml enzymu; 10 minut inkubacji; (A – seria H0093, B – seria H0191).

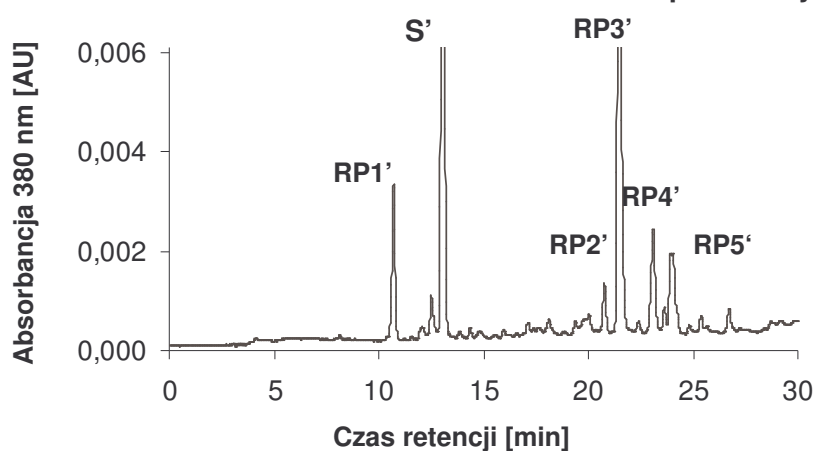
Biotransformacja związku C-857 w obecności wszystkich badanych próbek enzymów mikrosomalnych prowadzi do powstania siedmiu wspólnych produktów, różniących się stężeniem w poszczególnych reakcjach. Wszystkie te produkty obserwowano wcześniej w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych. Wykazano, że produkt RP3 powstający w najwyższym stężeniu to metabolit z dodatkowym pierścieniem sześciocząłowym.

Analogicznie do związku C-857 zbadano transformację związku C-1748, przy czym rys. 168 przedstawia analizę po dłuższym czasie inkubacji, czyli po 30 minutach

### C-1748

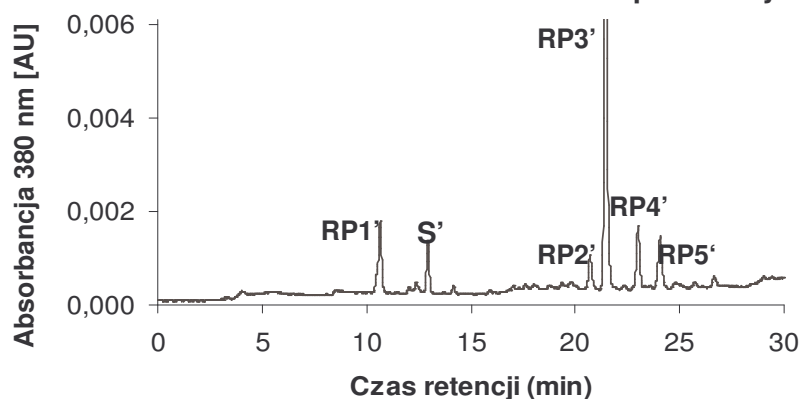
#### A) 30 minut inkubacji

Najniższy stopień przemiany substratu



#### B)

Najwyższy stopień przemiany substratu

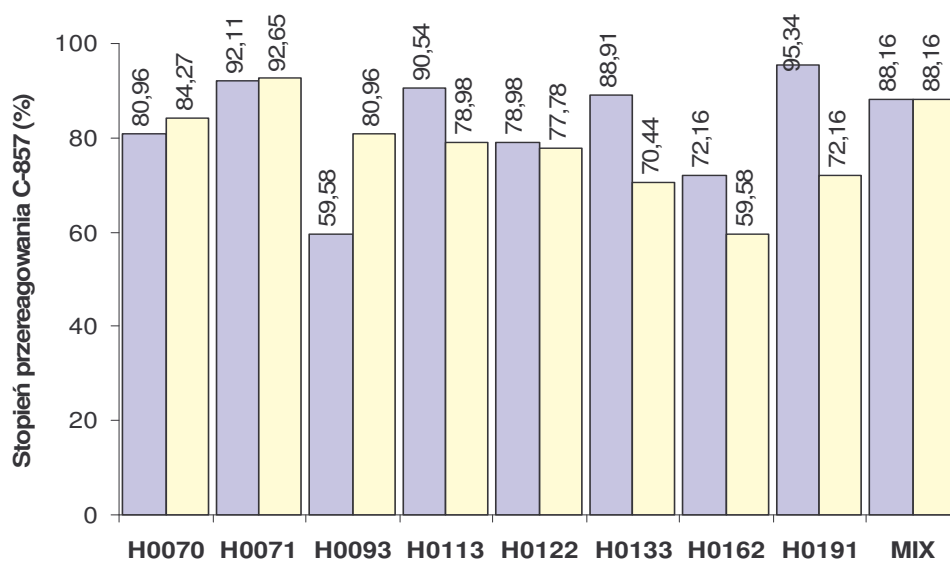
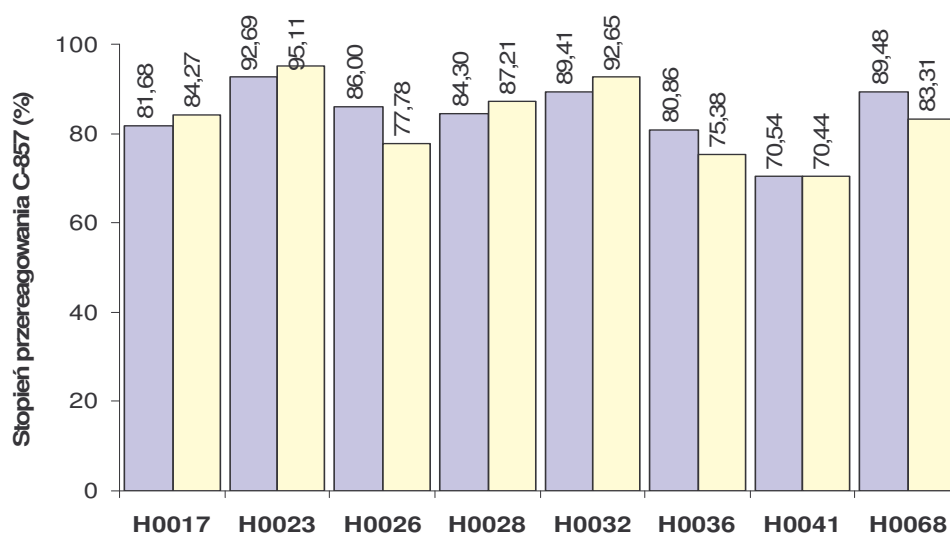


Rys. 168. Chromatograficzny obraz metabolicznej transformacji związku C-1748 wobec frakcji mikrosomów komórek wątroby człowieka 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka; 30 minut inkubacji; (A – seria H0113, B – seria H0023).

W przypadku związku C-1748 we wszystkich badanych reakcjach powstawało pięć produktów, które okazały się być identyczne z metabolitami powstającymi w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych. W najwyższym stężeniu powstawał produkt RP3' z dodatkowym pierścieniem sześciocząłowym.

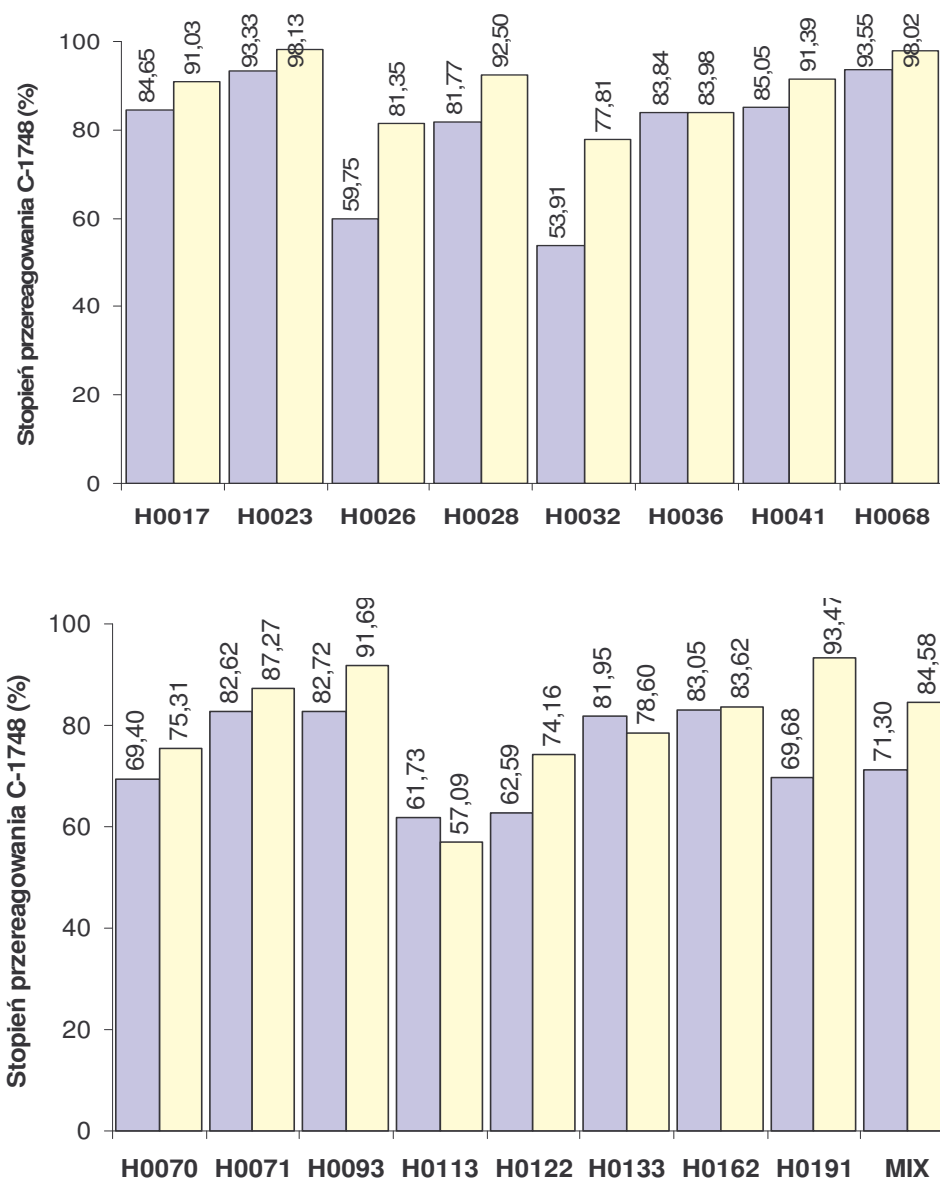
Ponadto określono stopień przereagowania związków C-857 i C-1748 w obecności 17-tu badanych próbek enzymów mikrosomalnych i otrzymane wartości przedstawiłam na rys. 169.

A)





B)



Rys. 169. Stopień przereagowania związków A) C-857 B) C-1748 pod wpływem enzymów mikrosomalnych komórek wątroby człowieka pochodzących z różnych serii RPK, I seria żółta - 1mg białka, 10 minut reakcji, II seria niebieska - 2mg białka, 30 minut reakcji wg. [141].

Na obydwu częściach rysunku 169 rzuca się w oczy fakt braku istotnych różnic pomiędzy metabolizmem poszczególnych próbek enzymów szczególnie dla związku C-857. Stopień przemiany C-857 wynosił od 60% - 95% i był nieznacznie wyższy, niż w przypadku pochodnej C-1748, dla której wynosił 53% do 93%. Znając ilościowy stopień przemiany związków C-857 i C-1748 oraz korzystając z dołączonej do RPK tabeli zawartości poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 w próbkach (załącznik 1) oszacowano za pomocą metody regresji, które izoenzymy mają największy udział w metabolizmie badanych pochodnych [141]. Przed przystąpieniem do analizy regresyjnej enzymy zawarte w RPK podzielono na dwa zestawy:

- Zestaw I: b5, izoenzymy P450, CPR, FMO.

- Zestaw II: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5, CYP4A11

Poza tym dane te częściowo odpowiednio przetransformowano. Obliczenia regresyjne wykonano za pomocą programu komputerowego REGR, który służy do wyznaczania współczynników regresji równania metodą najmniejszych kwadratów. Dzięki zastosowaniu algorytmu metody odrzucania możliwy był wybór zmiennych modelu w taki sposób, aby wszystkie zmienne występujące w ostatecznej postaci równania były statystycznie istotne. Przeprowadzono kilka serii obliczeń i poniżej przedstawiono wyniki dla jednej z nich kolejno dla związku C-857 i C-1748.

- **C-857**

Dane zestawu I

Tab.24. Współczynniki korelacji pomiędzy stopniem przemiany y%, a zawartością wybranych enzymów mikrosomalnych.

	<b>b5</b>	<b>P450</b>	<b>CPR</b>	<b>FMO</b>
<b>y %</b>	0,074	0,238	0,287	-0,406

Tab 25. Rozwiązanie równania regresji.

<b>Nazwa zmiennej</b>	<b>Współczynnik</b>	<b>Odchylenie</b>	<b>Istotność</b>
wyraz wolny	80	11,4706	13,0601
FMO	-22	14,6479	1,1676
P450	41	31,0694	0,7247

Odchylenie standardowe zmiennej zależnej: 7,6239

Wartość testu F: 6,2610

Współczynnik determinacji: 0,4906

Współczynnik korelacji: 0,7005

Wyniki analizy korelacji (tab. 24) wskazały, że spośród 4 wymienionych enzymów wpływ na zdolność przemiany związku C-857 mają reduktaza i cytochrom P450. Jednak współczynniki korelacji były bardzo niskie. Natomiast istotne równanie regresji otrzymano dla udziału izoenzymów cytochromu P450 i FMO, przy czym ujemna wartość współczynnika w tym równaniu wskazuje na hamujący wpływ FMO. Współczynnik korelacji równania regresji jest niski i powyższe wnioski należy traktować ostrożnie.

Dane zestawu II

Tab. 26. Współczynniki korelacji pomiędzy stopniem przemiany, Y %, a zawartością wybranego izoenzymu P450.

	<b>1A2</b>	<b>2A6</b>	<b>2B6</b>	<b>2C8</b>	<b>2C9</b>	<b>2C19</b>	<b>2D6</b>	<b>2 E1</b>	<b>3A4/5</b>	<b>4A11</b>
<b>y %</b>	-0,554	0,122	0,419	0,364	0,301	0,317	0,092	0,014	0,264	-0,333

Analiza korelacji względem 10 izoenzymów P450 prowadzi do wniosku, że na metabolizm C-857 najsilniejszy wpływ mają izoenzymy z podgrupy 2: CYP2B6, CYP2C8, ale w tym przypadku także współczynniki korelacji są niskie i nie udało się otrzymać istotnego równania regresji (tab.26).

▪ **C-1748**Dane zestawu I (10 minut inkubacji)

Tab.27. Współczynniki korelacji pomiędzy stopniem przemiany, Y %, a zawartością wybranych enzymów mikrosomalnych.

	<b>b5</b>	<b>P450</b>	<b>CPR</b>	<b>FMO</b>
<b>y %</b>	0,320	0,530	0,117	0,391

Tab. 28. Rozwiązanie równania regresji.

<b>Nazwa zmiennej</b>	<b>Współczynnik</b>	<b>Odchylenie</b>	<b>Istotność</b>
wyraz wolny	76	9,8161	14,5678
P450	24	22,4192	0,1917

Odchylenie standardowe zmiennej zależnej: 6,7428

Wartość testu F: 5,4587

Współczynnik determinacji: 0,2805

Współczynnik korelacji: 0,5296

Obliczone współczynniki korelacji i równanie regresji wskazuje, że w przypadku C-1748 rola cytochromów P450 w metabolizmie jest wyraźniejsza, niż to określono wcześniej dla C-857 (tab.24 i tab.27)

Dane zestawu II

Tab.29. Współczynniki korelacji pomiędzy stopniem przemiany, Y %, a zawartością wybranego izoenzymu P450.

	<b>1A2</b>	<b>2A6</b>	<b>2B6</b>	<b>2C8</b>	<b>2C9</b>	<b>2C19</b>	<b>2D6</b>	<b>2 E1</b>	<b>3A4/5</b>	<b>4A11</b>
<b>y %</b>	0,246	0,108	0,128	0,242	0,520	0,271	0,001	-0,404	0,499	0,481

Tab.30. Rozwiązanie równania regresji.

Nazwa zmiennej	Współczynnik	Odchylenie	Istotność
wyraz wolny	78	9,3909	16,2226
CYP2C9	10	3,3701	4,5595
CYP2A6	-5	4,5153	0,6089
CYP2E1	-9	4,1470	3,0824
CYP4A11	3	2,5428	1,1100

Odchylenie standardowe zmiennej zależnej: 3,2409

Wartość testu F: 18,3070

Współczynnik determinacji: 0,8694

Współczynnik korelacji: 0,9324

W powyższym przypadku współczynniki korelacji i równanie regresji wskazują głównie na udział w metabolizmie związku C-1748 następujących izoenzymów: CYP2C9, CYP3A4/5 i CYP4A11 (tab. 29).

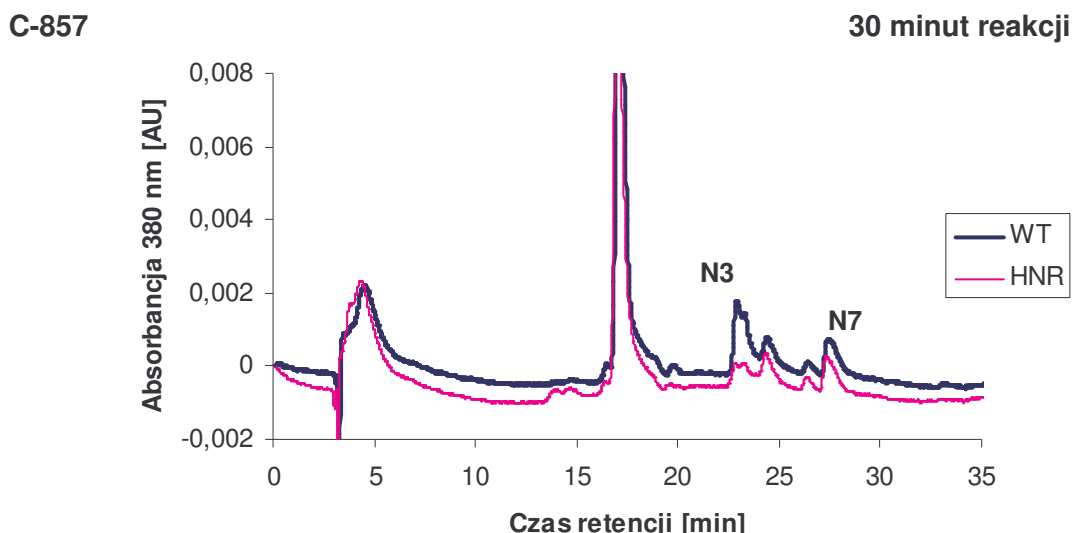
Podsumowując badania z zestawem ludzkich enzymów mikrosomalnych wykazałam, że pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny wykazują bardzo niską selektywność wobec enzymów mikrosomalnych, a szczególnie wobec izoenzymów P450 zawartych w RPK. W przemianach związków C-857 i C-1748 istotną rolę odgrywają CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 i CYP4A11. Metabolizm związku C-1748 wykazywał wyższą selektywność wobec wymienionych izoenzymów, niż pochodna C-857.

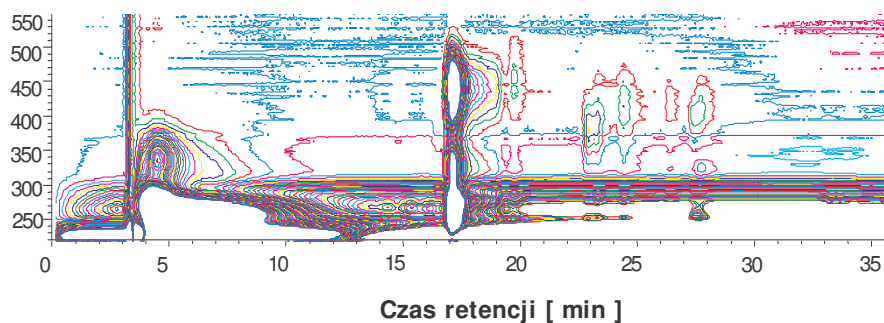
#### 4.5 Biotransformacja związków C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby myszy o obniżonym poziomie ekspresji genu NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450

Kontynuując badania nad wyjaśnieniem roli izoenzymów cytochromu P450 oraz reduktazy z nimi współpracującej w przemianach związku C-857 zbadalam przebieg reakcji biotransformacji tego związku wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy o prawidłowym poziomie ekspresji genu NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 (myszy WT) i komórek z nokautem tego genu (myszy HRN). Wyizolowane ze zwierząt wątroby otrzymałam w ramach współpracy z dr Colinem Hendersonem z Biomedical Research Centre w Dundee, Szkocja. Myszy typu HRN pozbawione genu kodującego reduktazę w komórkach wątroby uzyskano w laboratorium Prof. Wolfa metodą inżynierii genetycznej, za pomocą techniki zw. „Cre/LoxP technology”, która pozwoliła na eliminację tego enzymu tylko w komórkach wątroby [119,120]. Obecnie jest to jedyny dostępny model zwierzęcy z nokautem reduktazy cytochromu P450, który stosuje się do badania roli izoenzymów cytochromu P450 w komórkach.

##### 4.5.1 Transformacja C-857

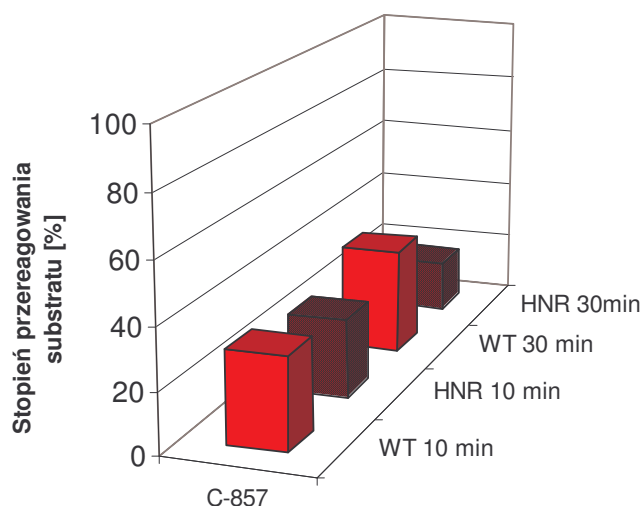
Na rysunku 170 przedstawiłam i porównałam zdolność do biotransformacji pochodnej C-857 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy dzikiego typu, (WT), czyli zawierających reduktazę cytochromu P450 oraz enzymów mikrosomalnych z nokautem genu kodującego ten enzym, (HRN).





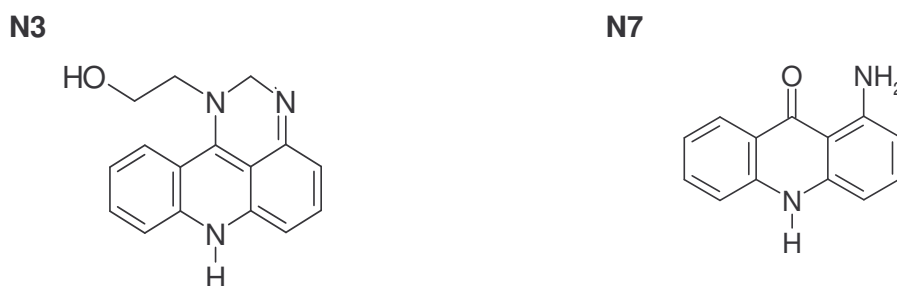
Rys. 170. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-857 w obecności frakcji mikrosomalnej komórek wątroby myszy typu dzikiego WT i z nokautem genu reduktazy, HRN: 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka.

Otrzymane wstępnie wyniki badań, wskazały, że przemiany metaboliczne związku C-857 w obecności mysich enzymów mikrosomalnych zachodzą wolniej w porównaniu z biotransformacją wobec szczurzych i ludzkich enzymów mikrosomalnych. Natomiast brak reduktazy znacznie obniżył stopień przereagowania badanego związku, co przedstawiłam na rys. 171.



Rys. 171. Stopień przereagowania związku C-857 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN.

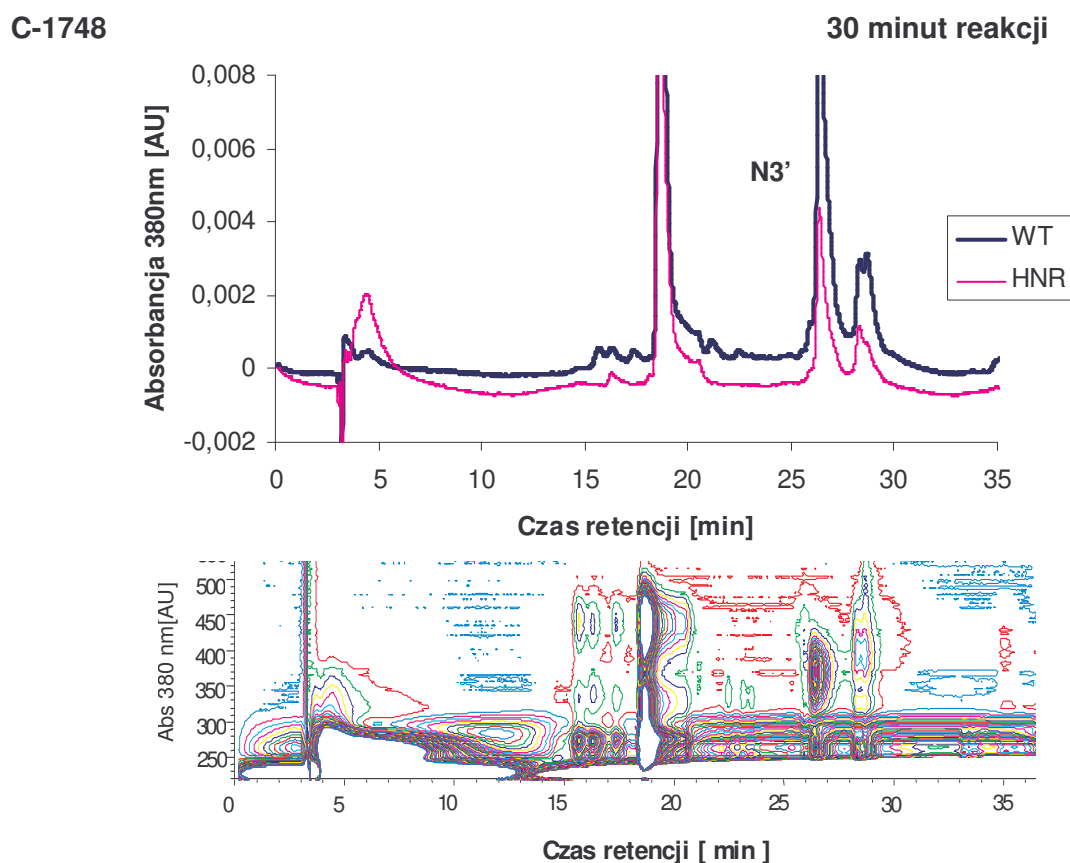
W wyniku transformacji enzymatycznej związku C-857 wobec mysich enzymów mikrosomalnych powstają dwa główne produkty, których widma UV-VIS i ESI-MS są identyczne jak widma produktów otrzymanych wcześniej podczas enzymatycznych przemian tego związku wobec mieszaniny ludzkich enzymów mikrosomalnych oraz izoenzymów cytochromu P450. Produkty te to: N3, z dodatkowym pierścieniem sześcioczłonowym utworzonym przez dwa atomy azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny oraz 1-aminoakrydon, N7, co przedstawiłam na rysunku 172.



Rys. 172. Struktury chemiczne głównych produktów przemian związku C-857 powstające w obecności mysich enzymów mikrosomalnych.

#### 4.5.2 Transformacja C-1748

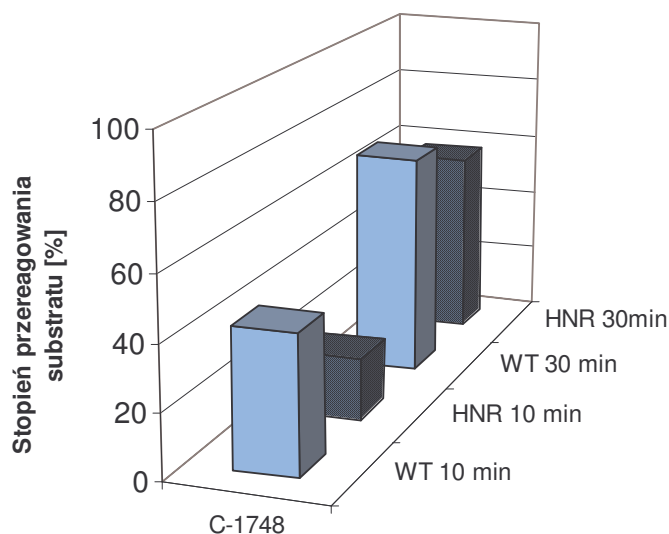
Przebieg reakcji biotransformacji związku C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z myszy typu WT i HNR przedstawiam na rys.173.



Rys. 173. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1748 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN: 0,2 mM C-1748, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka.

Podobnie jak C-857 związek C-1748 jest mniej podatny na przemiany enzymatyczne w obecności mysich enzymów mikrosomalnych. Brak reduktazy cytochromu P450 we frakcji mikrosomalnej wpłynęła na obniżenie reaktywności badanych związków, co w przypadku związku C-1748 widoczne jest szczególnie już po 10 minutach

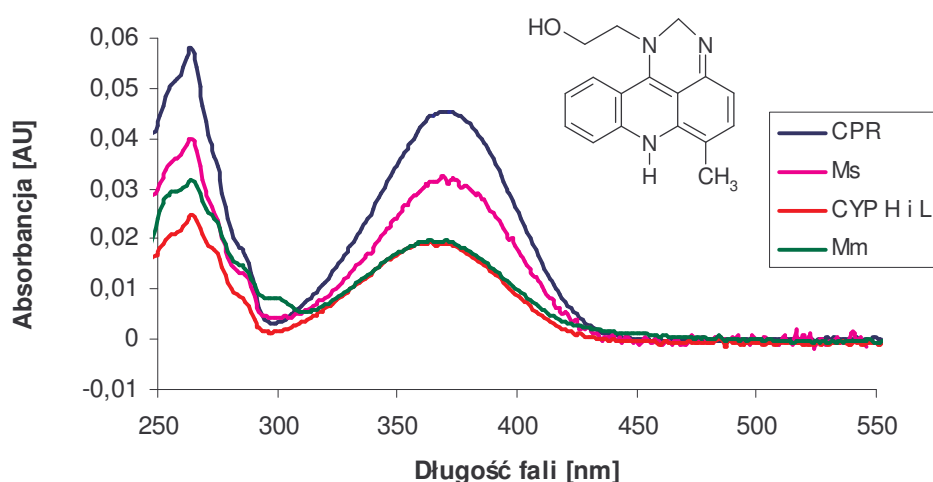
trwania reakcji, natomiast w przypadku C-857 dopiero po 30 minutach inkubacji. (rys. 174).



Rys. 174. Stopień przereagowania związku C-1748 wobec mysich enzymów mikrosomalnych typu dzikiego WT i HNR.

W reakcji biotransformacji związku C-1748 powstają dwa główne metabolity i kilka o bardzo niskim stężeniu. Intensywny pik na chromatogramie reprezentuje wspólny produkt, charakterystyczny dla przemian związku C-1748 powstający we wszystkich badanych dotychczas układach modelowych. Jest to produkt z dodatkowym pierścieniem sześcioczołowym, N3'.

### N3'

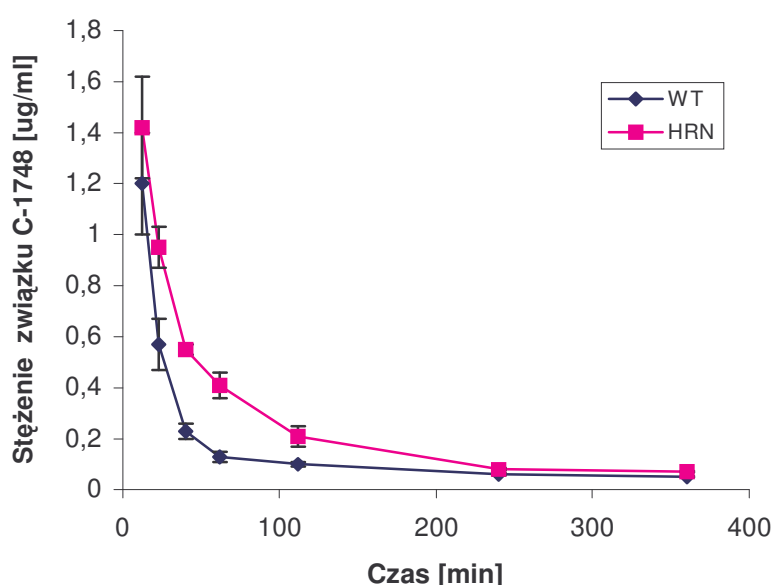


Rys. 175. Widmo UV-VIS i struktura chemiczna produktu przemian związku C-1748, N3', wspólnego dla prowadzonych przemian enzymatycznych tego związku.



#### 4.5.2.1 Eliminacja związku C-1748 z organizmu myszy o normalnym, WT i obniżonym poziomie reduktazy P450

Dzięki uprzejmości dr Colina Hendersona w laboratorium Biomedical Research Centre w Dundee w Szkocji przeprowadzono analizę eliminacji związku C-1748 z krwi myszy o prawidłowym poziomie reduktazy i u myszy z nokautem genu kodującego ten enzym w komórkach wątroby, myszy HRN. Badanym zwierzętom podano 50 mg związku C-1748 (Capridine  $\beta$ ) na kg masy ciała, po czym pobrano krew i zbadano tempo eliminacji badanego związku w czasie tzn. po 20, 40, 60 minutach a także po 2, 4 i 6 godzinach. Otrzymane wyniki eliminacji związku C-1748 przedstawiono na rys. 176.

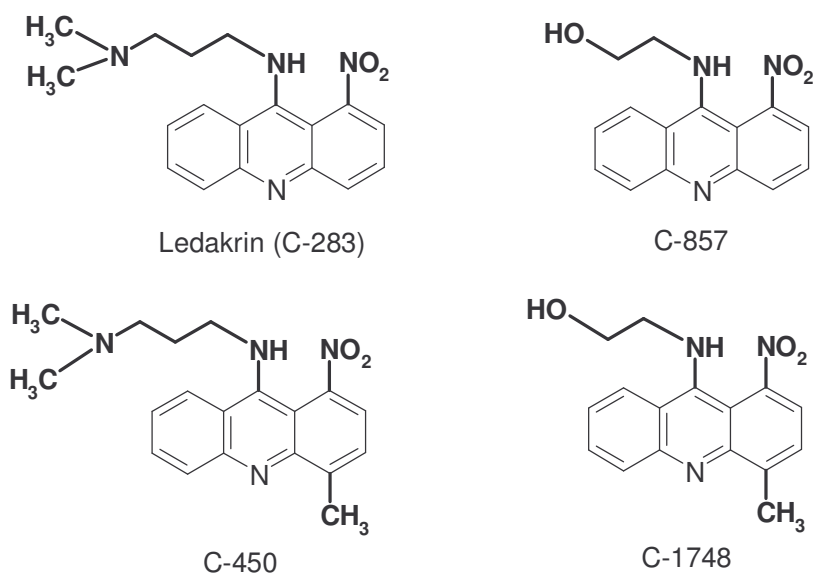


Rys. 176. Eliminacja związku C-1748 z krwi myszy WT i HRN, dawka związku 50mg/kg.

Związek C-1748 jest bardzo szybko usuwany z krwi, jego stężenie gwałtownie spada już po godzinie od podania dawki. Proces ten zachodzi szybciej u zwierząt typu dzikiego, WT, niż u osobników pozbawionych reduktazy cytochromu P450 w komórkach wątroby, HRN. Wynik ten wskazuje, że izoenzymy cytochromu P450 w wątrobie wraz reduktazą P450 są istotne nie tylko dla aktywacji tego związku, ale również dla jego metabolizmu detoksykacyjnego, pozwalającego na jego eliminację z organizmu.

#### 4.6 Wpływ struktury chemicznej 1-nitroakrydyny na przemiany metaboliczne w wybranych układach enzymatycznych

Przedmiotem niniejszego etapu pracy były cztery pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, których struktury przedstawiono poniżej (rys. 177). Wszystkie te związki zawierają grupę nitrową w pozycji 1 oraz łańcuch alkiloaminowy w pozycji 9 pierścienia akrydyny, które jak wykazano wcześniej są kluczowe dla aktywności biologicznej tych związków [133]. Dwa z nich posiadają dodatkowo grupę metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny, która ma wpływ na obniżenie toksyczności ogólnej tych pochodnych [15].



Rys. 177. Struktury chemiczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

Przedstawione w poprzednich rozdziałach badania przemian metabolicznych związku C-857 i C-1748 w obecności chemicznego czynnika redukującego, DTT, enzymów mikrosomalnych, a także NADPH - zależnej reduktazy cytochromu P450 wykazały, że należący do nowej generacji pochodnych 1-nitroakrydyny, związek C-1748 jest znacznie mniej reaktywny, niż jego analog pozbawiony grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że biotransformacja badanych związków zależy od ich struktury chemicznej.

Omawiane pochodne 1-nitroakrydyny można podzielić na trzy pary związków:

- ◆ pochodne z łańcuchem dimetyloaminopropyloaminowym
  - Ledakrin
  - C-450
- ◆ pochodne z łańcuchem hydroksyetyloaminowym
  - C-857
  - C-1748

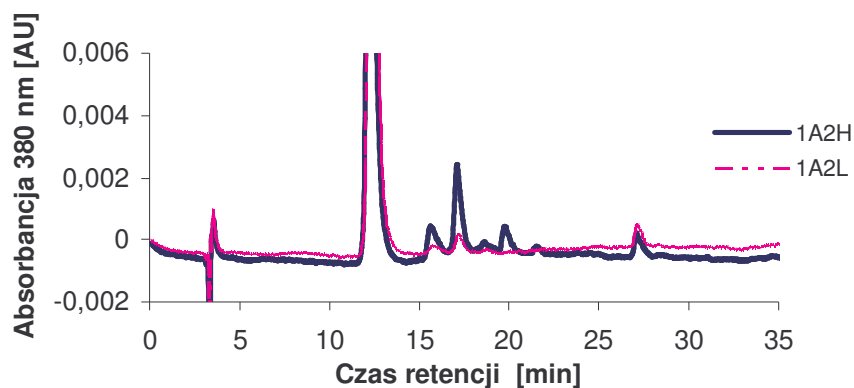
- ◆ pochodne z dodatkowym podstawnikiem metylowym w pozycji 4  
C-1748  
C-450

Celem prezentowanego etapu badań jest określenie wpływu struktury łańcucha bocznego i obecności grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny na zdolność do metabolizmu tej grupy związków. Przemiany czterech wymienionych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny zbadano w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 z różnym poziomem koekspresji reduktazy cytochromu P450 oraz w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy. W celu porównania reaktywności badanych związków powtórzono niektóre badania przeprowadzone wcześniej, aby zachować identyczne warunki badanych transformacji. W niniejszym rozdziale prezentuję tylko wybrane chromatogramy.

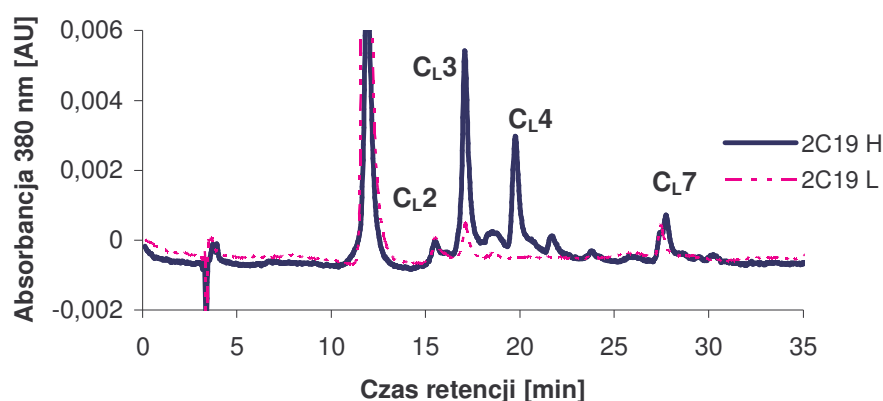
#### 4.6.1 Biotransformacja Ledakrinu w obecności izoenzymów cytochromu P450 z różnym poziomem koekspresji reduktazy cytochromu P450

Reakcję biotransformacji ledakrinu w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 prowadziłam w warunkach ustalonych wcześniej dla pochodnej C-857 i opisanych w części eksperymentalnej w punkcie 5.7.5. Przebieg reakcji analizowałam metodą HPLC, a uzyskane chromatogramy mieszanin reakcyjnych zostały przedstawione na rys.178.

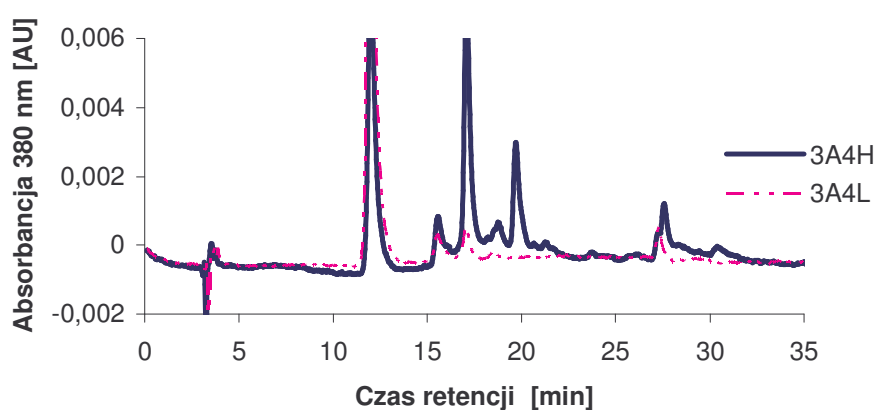
##### A) Ledakrin



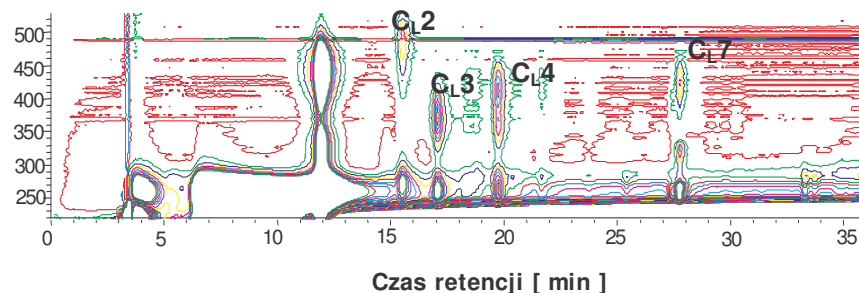
B)



C)



D)



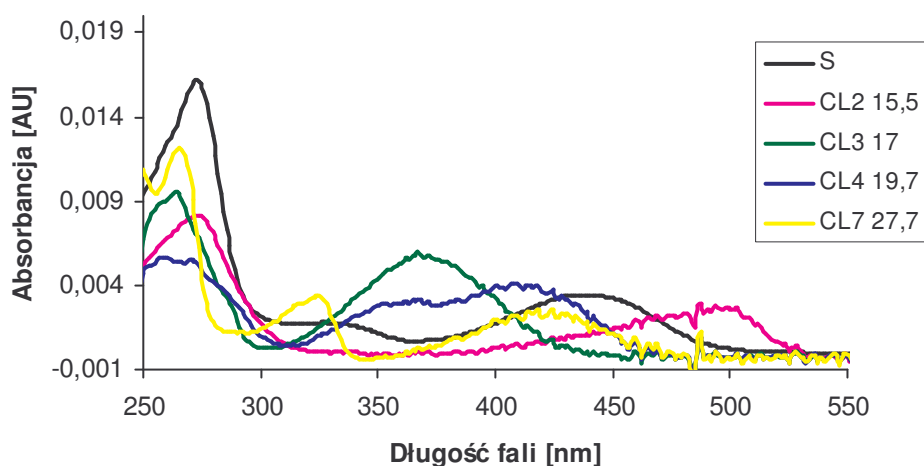
Rys. 178. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych Ledakrinu po 20 minutach inkubacji w obecności izoenzymów cytochromu P450 z wysokim, H i niskim, L poziomem koekspresji CPR; 0,2 mM ledakrin, 2 mM NADPH, 50 pmol enzymu: A ) CYP1A2; B ) CYP2C19; C) CYP3A4-wykres liniowy; D ) CYP3A4-wykres poziomkowy.

W biotransformacji Ledakrinu uczestniczą głównie dwa izoenzymy: CYP2C19 i CYP3A4. CYP1A2 najslabiej metabolizuje Ledakrin, a przebieg tego procesu w znacznie mniejszym stopniu zależy od poziomu reduktazy z nim współpracującej, niż w przypadku dwóch pozostałych izoenzymów.

Jak wskazują powyższe chromatogramy Ledakrin, podobnie jak związek C-857 jest znacznie bardziej podatny na przemiany metaboliczne w obecności izoenzymów z wysokim poziomem reduktazy cytochromu P450, niż z niskim poziomem tego enzymu.

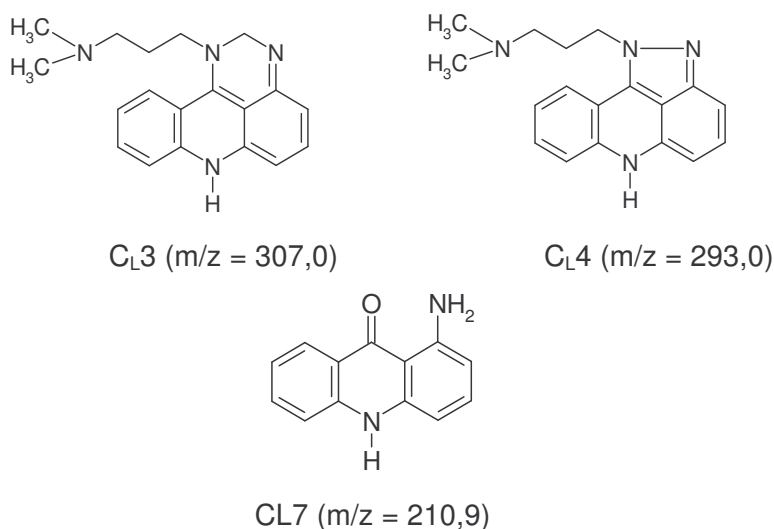
W reakcji powstają 4 główne produkty, których najniższe stężenie powstaje w obecności izoenzymu CYP1A2. Produkt C<sub>L</sub>4 nie powstaje w obecności izoenzymów z niskim poziomem koekspresji reduktazy P450.

Zarejestrowane i przedstawione na rys 180 widma UV-VIS produktów wraz z analizą widm ESI-MS mieszaniny reakcyjnej pozwoliły stwierdzić obecność trzech głównych produktów zidentyfikowanych we wcześniejszych badaniach przemian Ledakrinu [21,22].



Rys. 179. Widma UV-VIS produktów przemian Ledakrinu powstających w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 z wysokim poziomem CPR.

Należą do nich produkt C<sub>L</sub>3 o jonie masowym  $m/z = 307,0$  i strukturze zawierającej dodatkowy pierścień sześciocząłowy, produkt C<sub>L</sub>4 o jonie masowym  $m/z = 293,0$  i strukturze z pierścieniem pięciocząłowym, a także produkt C<sub>L</sub>7 o jonie  $m/z = 210,9$ , czyli 1-aminoakrydon.



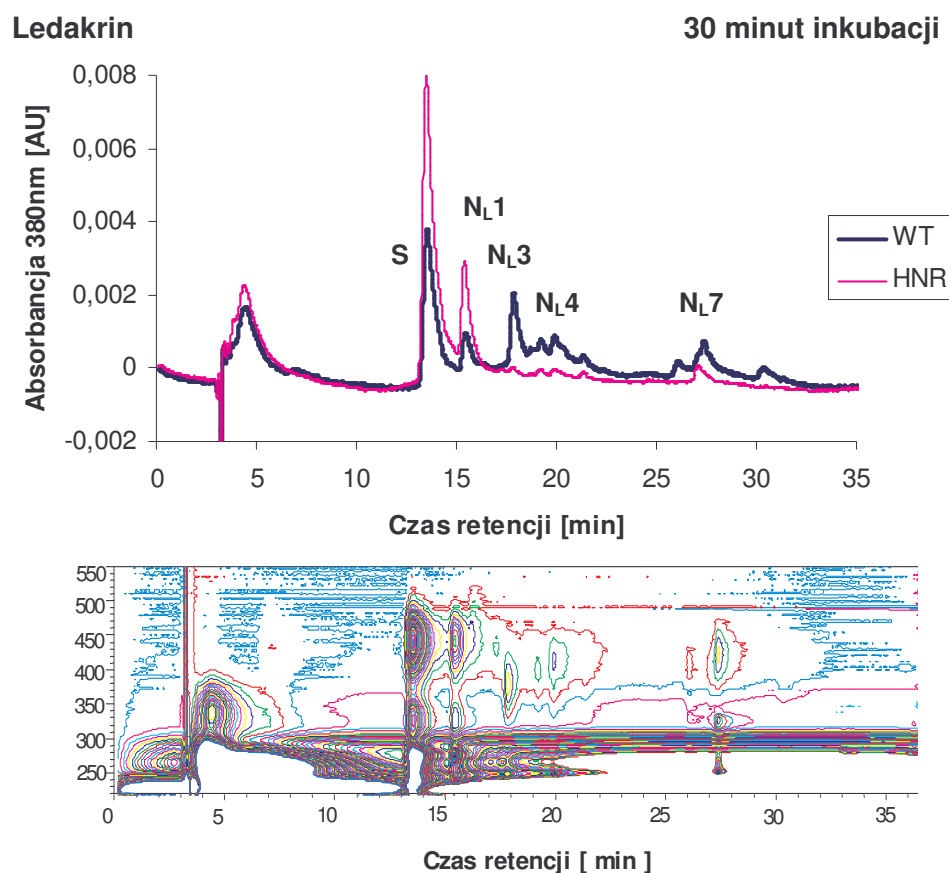
Rys. 180. Struktury chemiczne produktów przemian metabolicznych Ledakrinu: C<sub>L</sub>3, C<sub>L</sub>4 i C<sub>L</sub>7, powstających w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450.

Nowy produkt metabolizmu Ledakrinu powstający w tych reakcjach, a niepowstający w obecności szczurzych enzymów mikrosomalnych to produkt C<sub>L</sub>2. Analiza ESI-MS tego metabolitu wykazała obecność jonu  $m/z = 341,0$ . Wartość ta jest o 16 jednostek wyższa od masy substratu, co sugeruje obecność dodatkowego atomu tlenu. Jednak na podstawie tej informacji trudno jest zaproponować strukturę chemiczną dla tego produktu. Warto zaznaczyć, iż podobny metabolit powstawał także podczas przemiany związku C-857 w obecności izoenzymów cytochromu P450.

#### 4.6.2 Przemiany metaboliczne Ledakrinu w obecności mysich enzymów mikrosomalnych o normalnej, WT i obniżonej, HRN, ekspresji genu NADPH – reduktazy cytochromu P450.

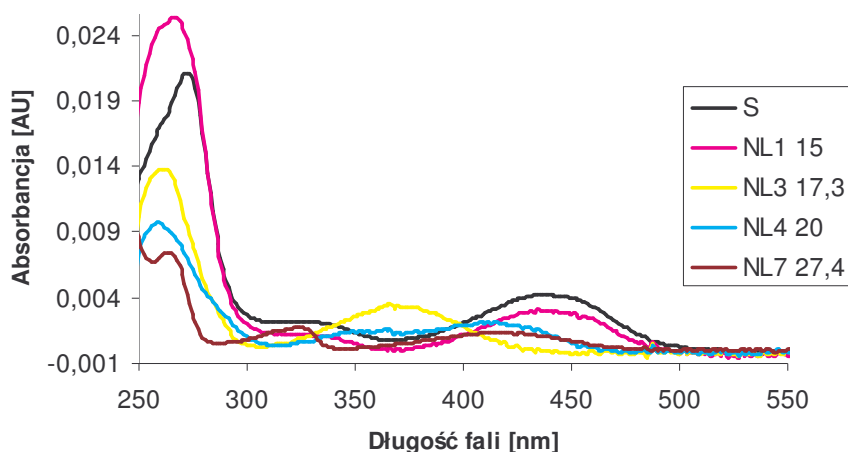
W kolejnym etapie pracy zbadalam biotransformację Ledakrinu w obecności enzymów mikrosomalnych: wyizolowanych z komórek wątroby myszy dzikiego typu (WT) oraz z nokautem genu kodującego reduktazę cytochromu P450, (HNR).

Reakcję biotransformacji prowadziłam w warunkach ustalonych wcześniej dla związku C-857 i C-1748 (część eksperymentalna, punkt 5.7.7.3), a uzyskane chromatogramy przedstawiłam na rys. 180.



Rys. 181. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych Ledakrinu w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN: 0,2 mM Ledakrin, 2 mM NADPH, 2mg/ml białka.

Wykazałam, więc że Ledakrin jest bardziej podatny na przemiany w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z myszy dzikiego typu (WT), niż w obecności enzymów wyizolowanych z komórek wątroby pozbawionych genu kodującego reduktazę cytochromu P450, (HNR). Trzy produkty powstające w tej reakcji:  $N_{L3}$ ,  $N_{L4}$  i  $N_{L7}$  mają identyczne widma UV-VIS i ESI-MS, jak produkty Ledakrinu powstające w obecności innych enzymów metabolizujących (rys. 182). Struktury chemiczne tych produktów przedstawiłam powyżej na rys. 180. W obecności mysich enzymów mikrosomalnych nie powstaje produkt  $C_{L2}$  natomiast pojawia się nowy metabolit  $N_{L1}$  o widmie UV-VIS zbliżonym do substratu.

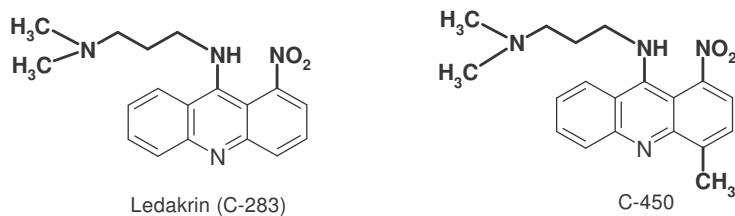


Rys. 182. Widma UV-VIS Ledakrinu i jego metabolitów powstających w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN.

Porównując przemiany Ledakrinu wobec izoenzymów cytochromu P450 i enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy warto zauważyć, że główny metabolit Ledakrinu, o strukturze z dodatkowym pierścieniem sześcioczołowym nie powstaje zarówno w obecności izoenzymów z niskim poziomem koekspresji reduktazy, jak i w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby mszy z nokautem tego białka. Można wysunąć wniosek, że utworzenie sześcioczołowego pierścienia ( $C_{L3} = N_{L3}$  rys. 180) wymaga obecności reduktazy cytochromu P450.

#### 4.6.3 Metabolizm związku C-450 w obecności ludzkich rekombinantowych izoenzymów CYP1A2, 2C19 i CYP3A4

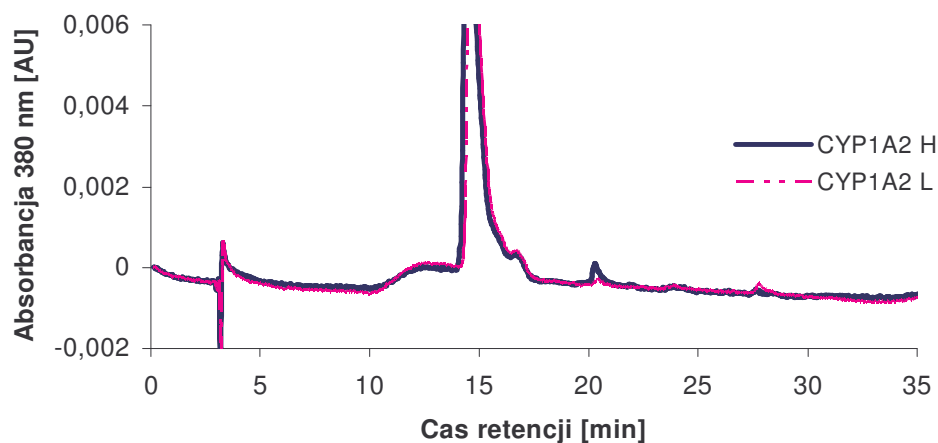
Związek C-450 jest analogiem Ledakrinu, który zawiera dodatkową grupę metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny.



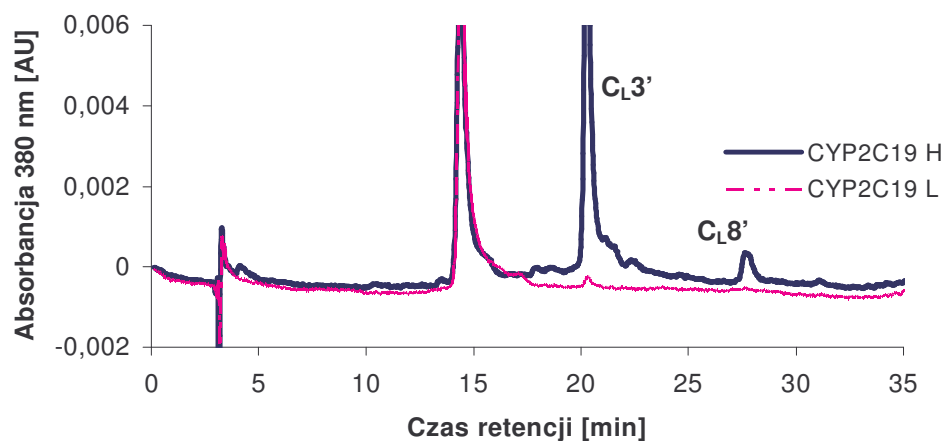
Rys. 183. Struktury chemiczne Ledakrinu i związku C-450.

Analizę chromatograficzną mieszanin reakcyjnych otrzymanych po biotransformacji pochodnej C-450 wobec wybranych rekombinowanych izoenzymów cytochromu P450 przedstawiłam na rysunku 185.

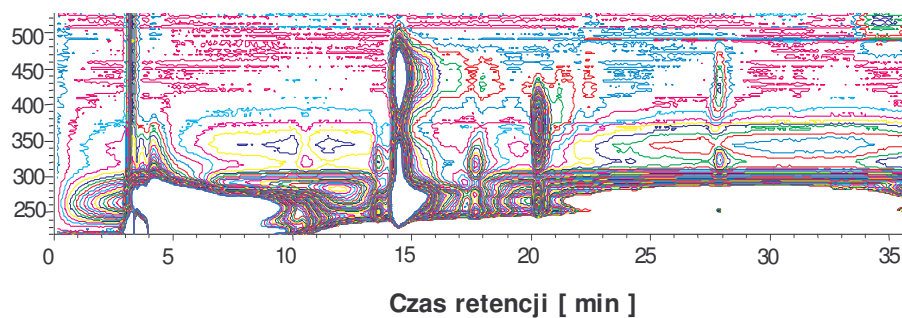
### A) C-450



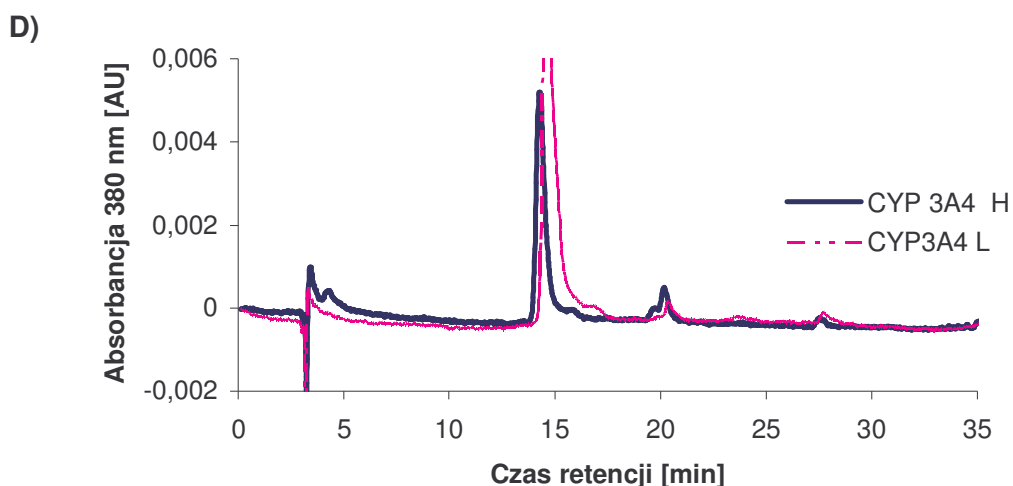
### B)



### C)



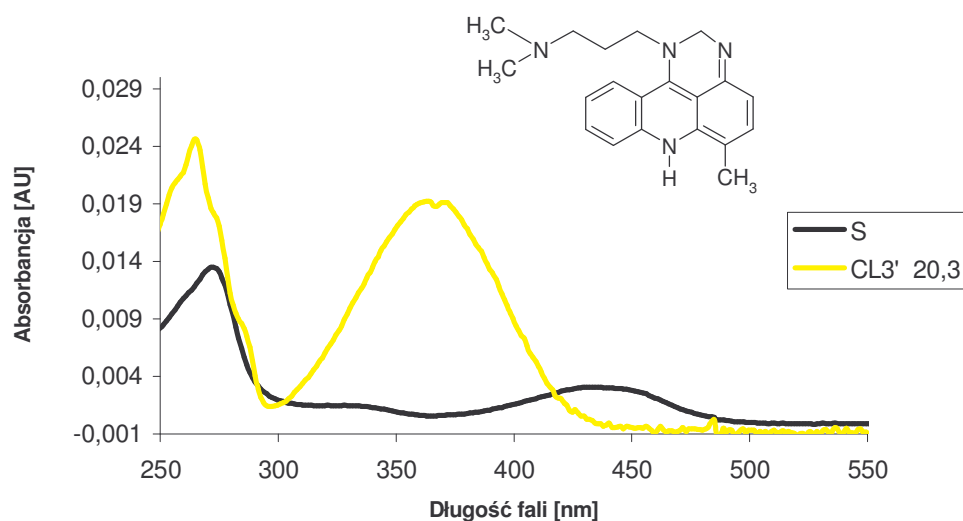




Rys. 184. Obraz chromatograficzny przemian metabolicznych związku C-450 po 20 minutach inkubacji w obecności izoenzymów cytochromu P450 z wysokim i niskim poziomem koekspresji CPR P450:0,2 mM C-450, 2 mM NADPH, 50 pmol enzymu: A ) CYP1A2; B ) CYP2C19-wykres liniowy, C) CY2C19-wykres poziomicowy; D ) CYP3A4.

Porównując przemiany związku C-450 wobec trzech wybranych izoenzymów wykazałam, że inaczej, jak w przypadku Ledakrinu tylko izoenzym CYP2C19 w istotnym stopniu metabolizuje ten związek. W odróżnieniu od Ledakrinu w reakcji związku C-450 katalizowanej przez izoenzymy powstają tylko dwa produkty:  $C_{L3'}$  i  $C_{L8}$ . Związek C-450 wydaje się być, zatem bardziej selektywny wobec wybranych izoenzymów cytochromu P450, niż jego analog pozbawiony grupy metylowej.

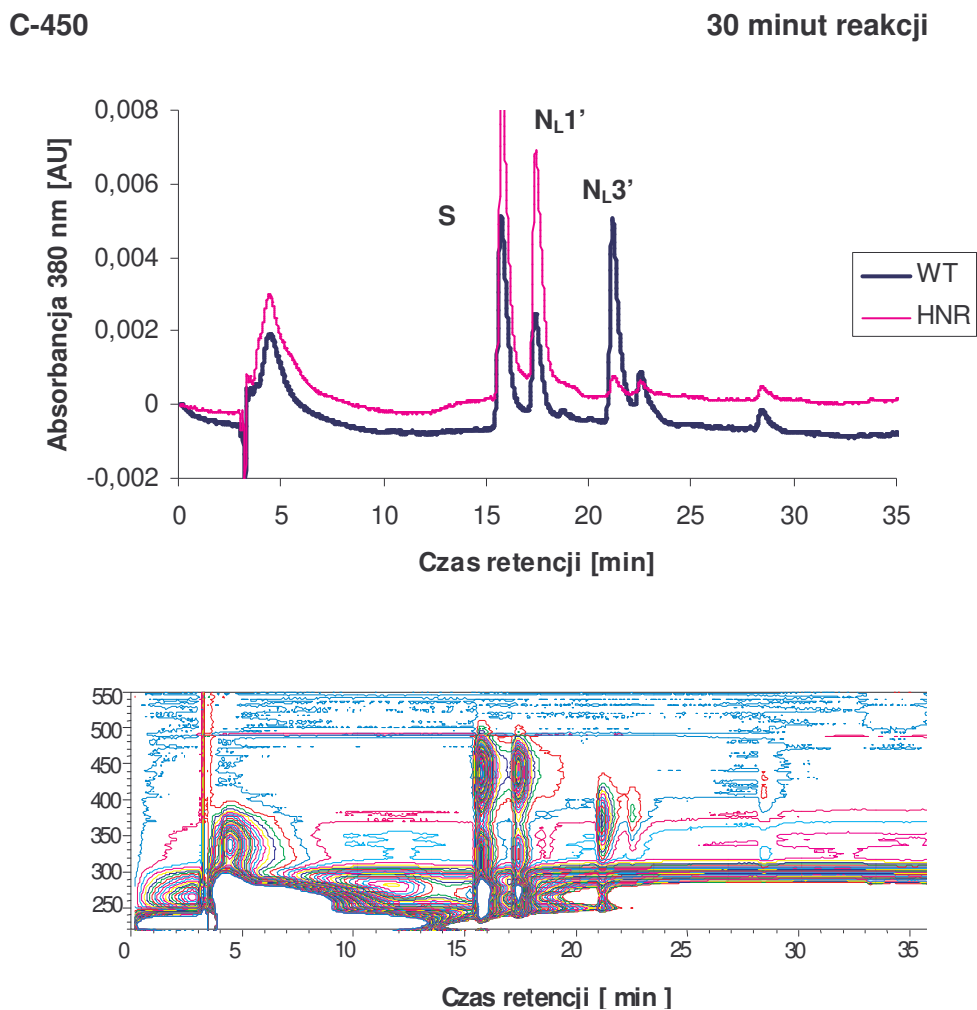
Na podstawie analizy widm UV-VIS i ESI-MS (rys. 185) dla otrzymanych pików produktów  $C_{L3'}$  i  $C_{L8}$  oraz zdobytej wcześniej wiedzy o metabolitach Ledakrinu przypuszczam, że w badanych reakcjach powstaje produkt  $C_{L3'}$  charakterystyczny dla przemian 9-amino-1-nitroakrydyn, czyli posiadający dodatkowy pierścień sześciocłonowy utworzony przez dwa atomy azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny.



Rys. 185. Widmo UV-VIS substratu i produktu przemian związku C-450 powstającego wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 wraz z proponowaną strukturą chemiczną głównego produktu.

#### 4.6.4 Przemiany metaboliczne związku C-450 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN

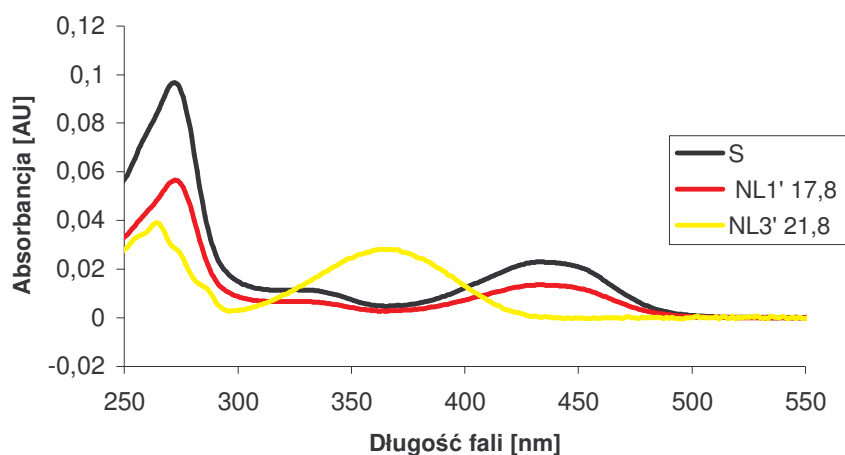
Analiza chromatograficzna mieszaniny otrzymanej po biotransformacji pochodnej C-450 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy typu dzikiego oraz z nokautem genu kodującego NADPH - zależną reduktazę cytochromu P450 przedstawiłam na rysunku 186.



Rys. 186. Chromatograficzny obraz metabolizmu związku C-450 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HRN: 0,2 mM C-857, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka, 30 minut inkubacji.

Na podstawie przedstawionych powyżej chromatogramów można stwierdzić, że brak reduktazy znacznie obniża stopień przereagowania substratu i stężenie jednego z powstających metabolitów,  $N_{L3}$  natomiast stężenie  $N_{L1}$  rośnie przy braku reduktazy. Na podstawie porównania widm ESI-MS oraz widm UV-VIS (rys. 187) można przypuszczać, że jeden z metabolitów to produkt z dodatkowym atomem tlenu,  $N_{L1'}$ , drugi natomiast o czasie retencji ok. 21,7 min. to znany wcześniej produkt z dodatkowym pierścieniem sześcioczołowym,  $N_{L3'}$ . Zwraca uwagę fakt, że metabolit  $N_{L1'}$  posiadający prawdopodobnie w cząsteczce dodatkowy atom tlenu powstaje w wysokim stężeniu

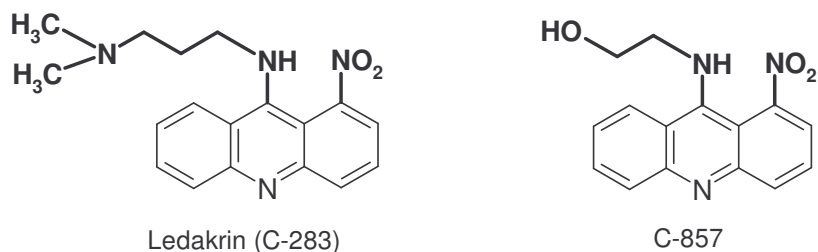
wobec enzymów pozbawionych reduktazy P450. Natomiast podobnie jak poprzednio brak reduktazy we frakcji mikrosomalnej utrudnia powstawanie produktu z dodatkowym sześciocłonowym pierścieniem, NL<sub>3</sub>. Tak, więc podobnie, jak w przypadku pary związków C-857 i C-1748 metabolizm pochodnej C-450 jest bardziej selektywny wobec izoenzymów P450 i reduktazy cytochromu P450, niż jego analogu bez grupy metylowej.



Rys. 187. Widmo UV-VIS substratu i dwóch głównych produktów przemian związku C-450 wobec mieszaniny mysich enzymów mikrosomalnych WT i HRN.

#### 4.6.5 Podsumowanie. Rola struktury łańcucha bocznego

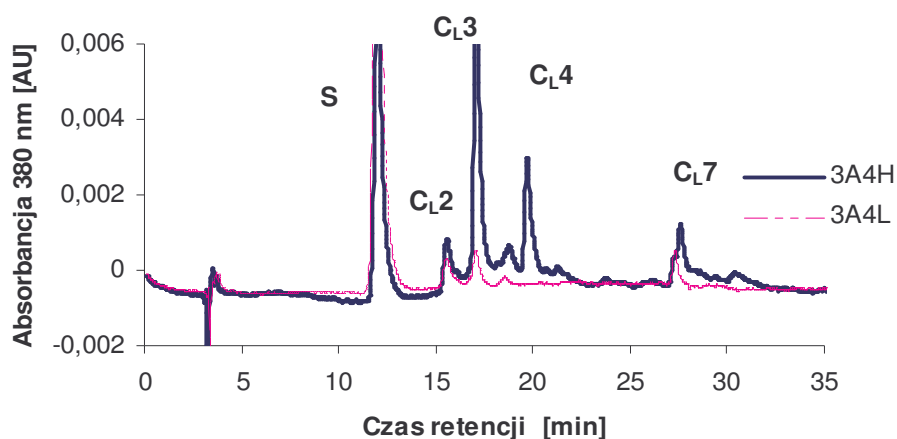
Dla bezpośredniego określenia wpływu struktury łańcucha bocznego na biotransformację pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności badanych enzymów porównano przemiany tych związków parami w identycznych warunkach reakcji. Pierwsza para to: Ledakrin i związek C-857 o strukturach przedstawionych na rys. 188.



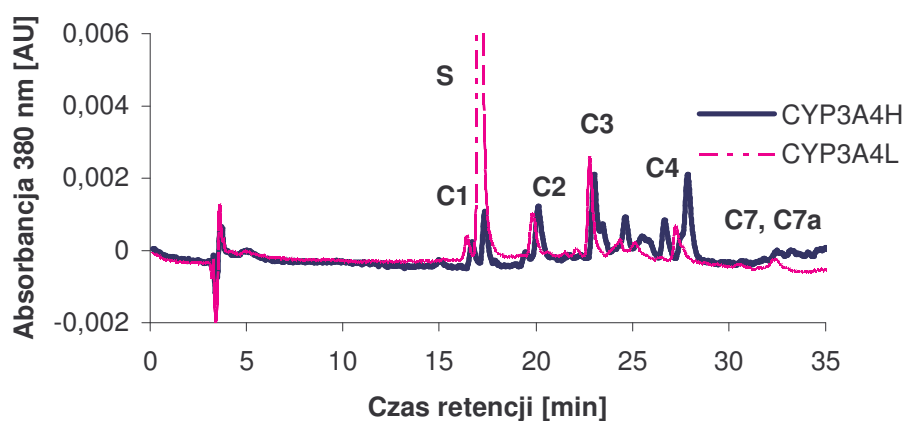
Rys. 188. Struktury pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

Na rys. 189 porównałam wybrane chromatogramy mieszanin reakcyjnych Ledakrinu i związku C-857 w obecności izoenzymów cytochromu P450 natomiast na rys. 189 w obecności mysich enzymów mikrosomalnych WT i HRN.

## A) Ledakrin



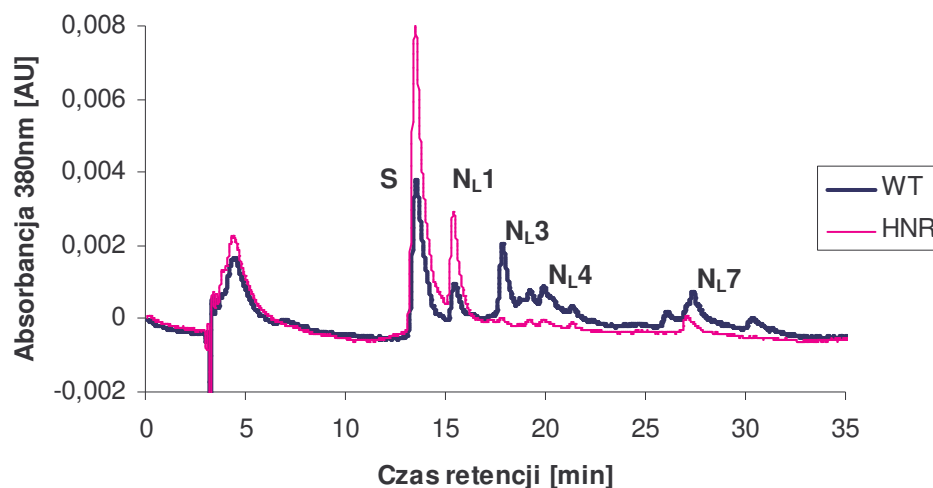
## B) C-857



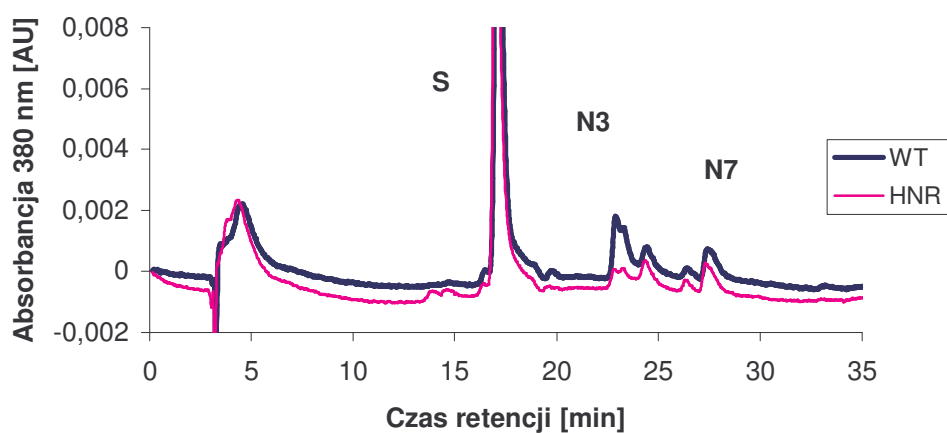
Rys. 189. Chromatogramy mieszanin reakcyjnych A) Ledakrinu i B) związku C-857 wobec CYP3A4, 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 50 pmoli enzymu, 20 minut reakcji.

Porównując powyższe chromatogramy można wysunąć wniosek, iż związek C-857 jest bardziej podatny na biotransformację, niż Ledakrin, szczególnie w obecności enzymów z wysokim poziomem koekspresji reduktazy P450. W obecności mysich enzymów mikrosomalnych relacje te są odwrócone. Ledakrin jest bardziej reaktywny, niż związek z łańcuchem hydroksyloetyloaminowym, co przedstawia poniższy rysunek 190.

## A) Ledakrin

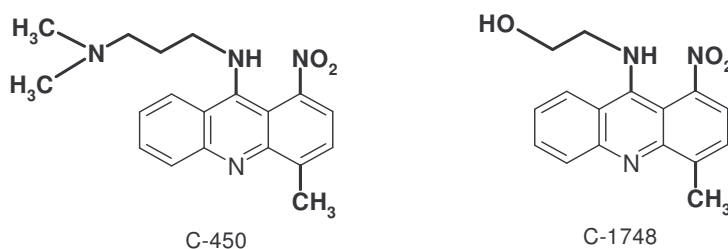


## B) C-857



Rys. 190. Porównanie przemian metabolicznych A) Ledakrinu B) związku C-857 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy WT i HNR: 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 2 mg/ml białka.

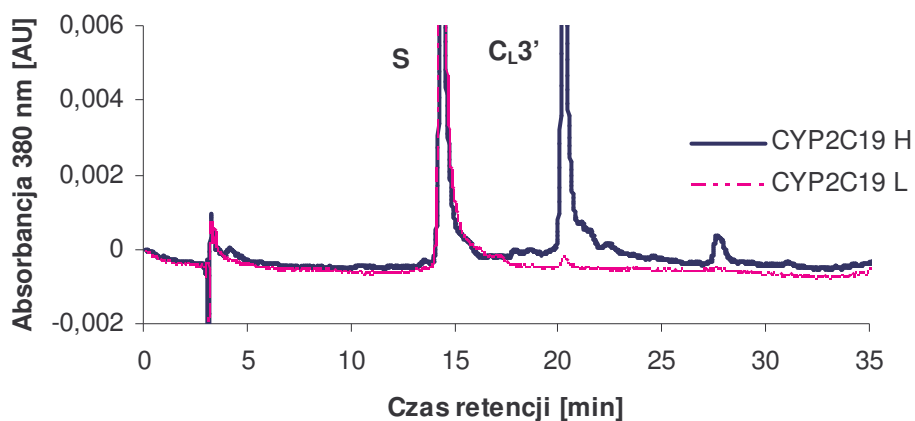
Druga para związków o różnym łańcuchu bocznym to C-450 i C-1748 i C-1748 zawierająca dodatkową grupę metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny (rys. 191)



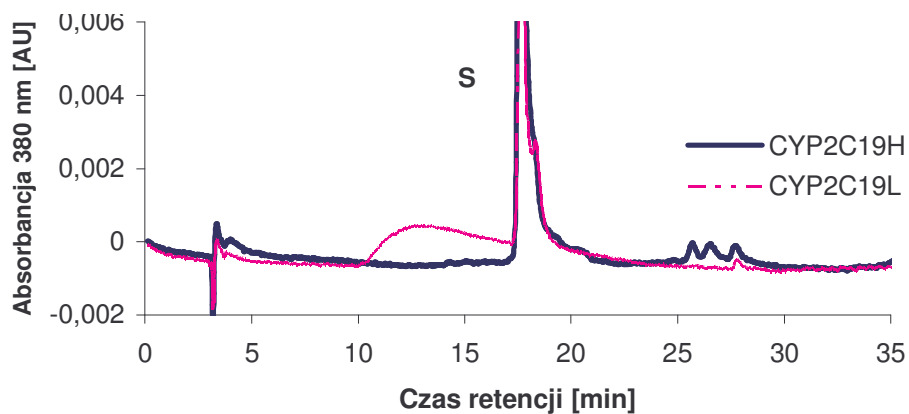
Rys. 191. Struktury porównywanych pochodnych 4-metylo-9-amino-1-nitroakrydyny.

Wybrane chromatogramy mieszanin reakcyjnych tych związków w obecności izoenzymów cytochromu P450 oraz mysich enzymów mikrosomalnych przedstawiłam na rysunkach 192 i 193.

## A) C-450

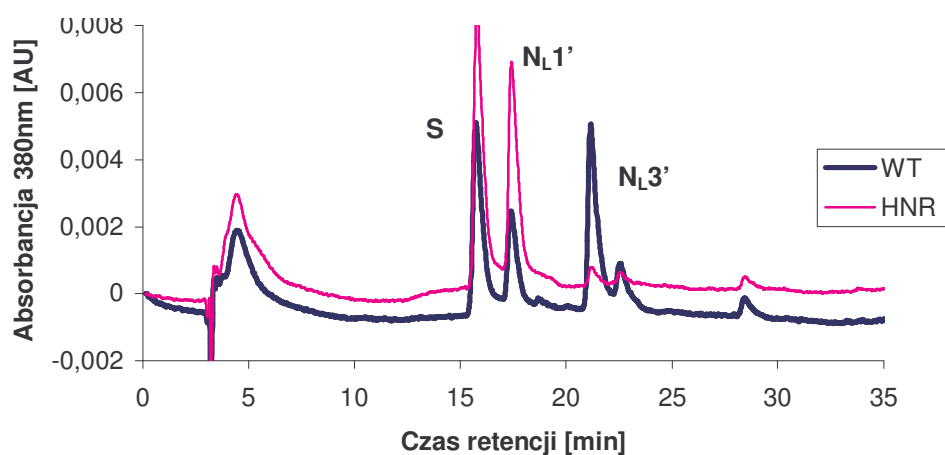


## B) C-1748

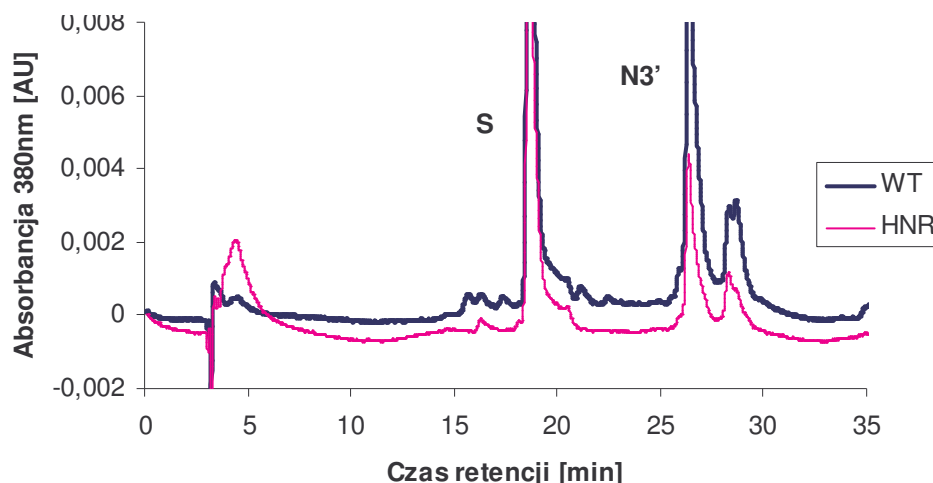


Rys. 192. Porównanie przemian metabolicznych A) C-450 i B) związku C-1748 wobec CYP2C19, 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 50 pmoli enzymu, 20 minut reakcji.

## A) C-450



## B) C-1748



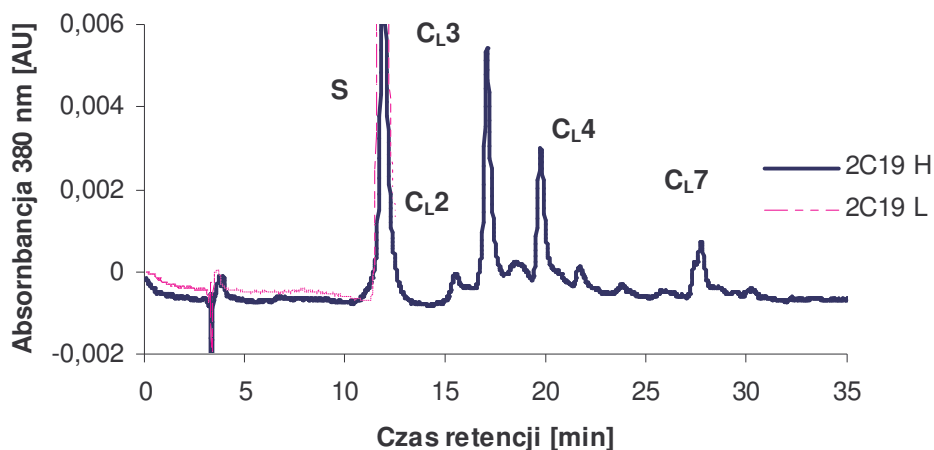
Rys. 193. Porównanie przemian metabolicznych związków A) C-450 B) C-1748 w obecności enzymów mikrosomalnych komórek wątroby myszy WT i HNR: 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 2mg/ml białka, 30 minut inkubacji.

Spośród pochodnych nowej generacji związek z łańcuchem dimetyloaminoetyloaminowym jest bardziej reaktywny, niż C-1748. W przypadku przemian w obecności izoenzymów łańcuch hydroksyetylowy obecny w strukturze C-1748 powoduje, że w reakcji brak metabolitu o strukturze pierścienia sześciocząłowego, C<sub>L</sub>3'. Natomiast podczas przemian związku katalizowanych przez enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby myszy nie powstaje produkt N<sub>L</sub>1. Czyli poza obniżeniem reaktywności związku C-1748 wpływ łańcucha bocznego na metabolizm badanych związków jest specyficzny i zależy od zastosowanych enzymów metabolizujących.

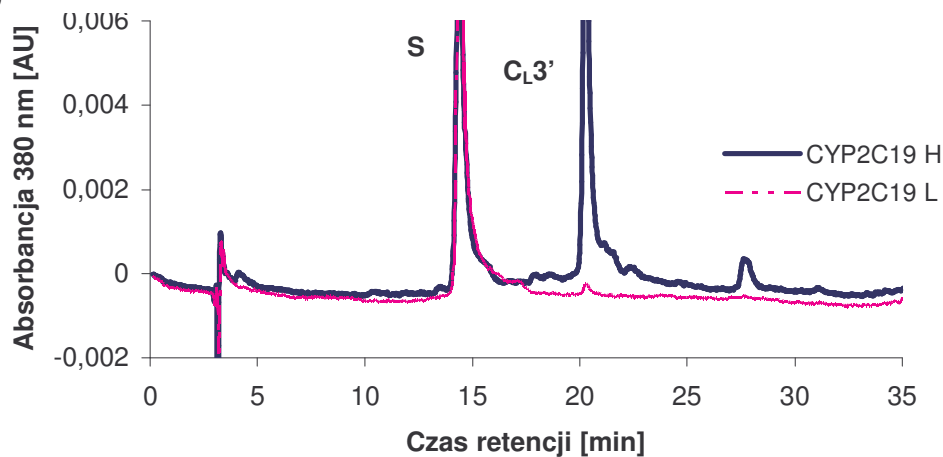
#### 4.6.6 Podsumowanie. Rola grupy metylowej

Porównałam najpierw biotransformację związków z łańcuchem dimetylopropyloaminowym tj Ledakrinu i związku C-450 w obecności izoenzymów cytochromu P450, co ilustruje rys. 194, a następnie dwa związki posiadające łańcuch hydroksyloetylowy.

## A) Ledakrin



## B) C-450

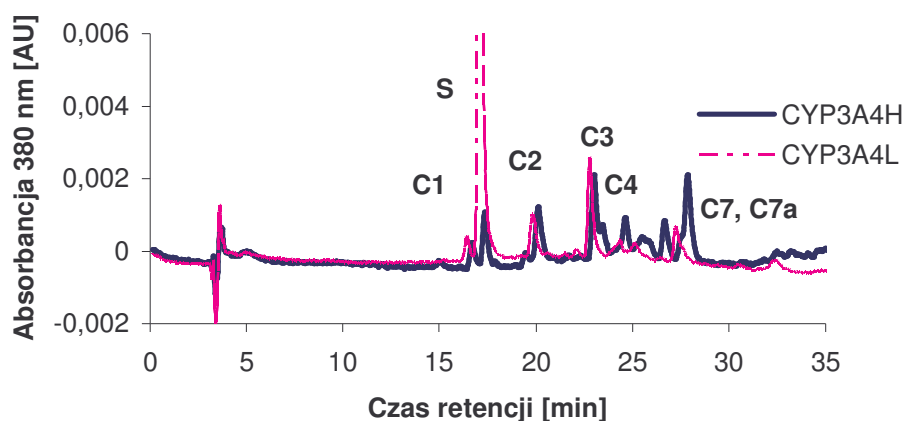


Rys. 194. Chromatogramy mieszanin reakcyjnych A) Ledakrinu i B) związku C-450 wobec CYP2C19, 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 50 pmoli enzymu, 20 minut reakcji.

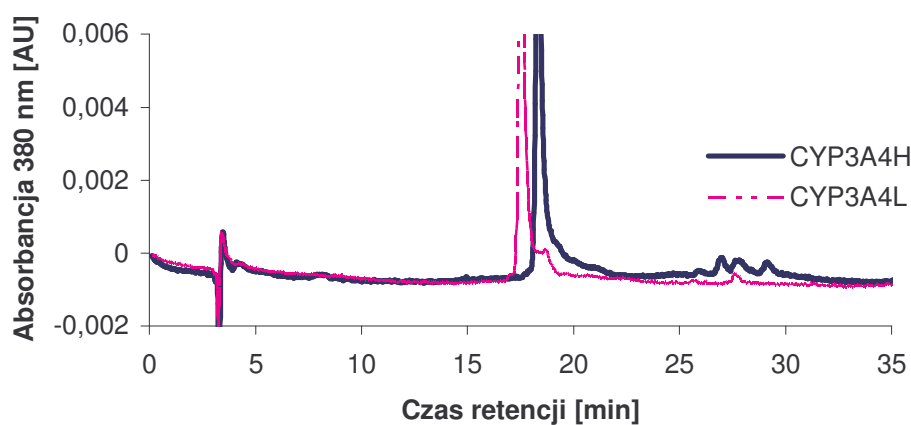
W pierwszej parze związków obecność w ich strukturze chemicznej grupy metylowej obniża ilość głównych produktów z 4 do 2. Ponadto w obu przypadkach obecność reduktazy ma bardzo istotny wpływ na powstawanie metabolitów. Znacznie silniej obecność grupy metylowej obniża zdolność do metabolizmu drugiej pary związków C-857 i C-1748, które posiadają hydroksyloetyloaminowy łańcuch boczny.



## A) C-857



## B) C-1748

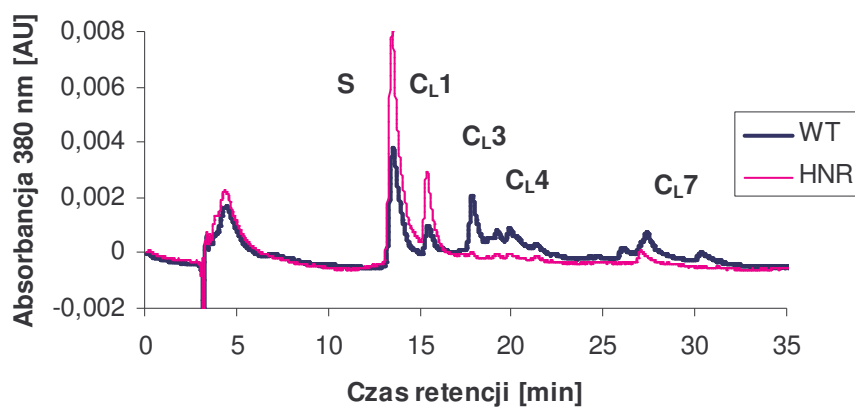


Rys. 195. Chromatogramy mieszanin reakcyjnych A) związku C-857 i B) związku C1748 wobec CYP3A4, 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 50 pmoli enzymu, 20 minut reakcji.

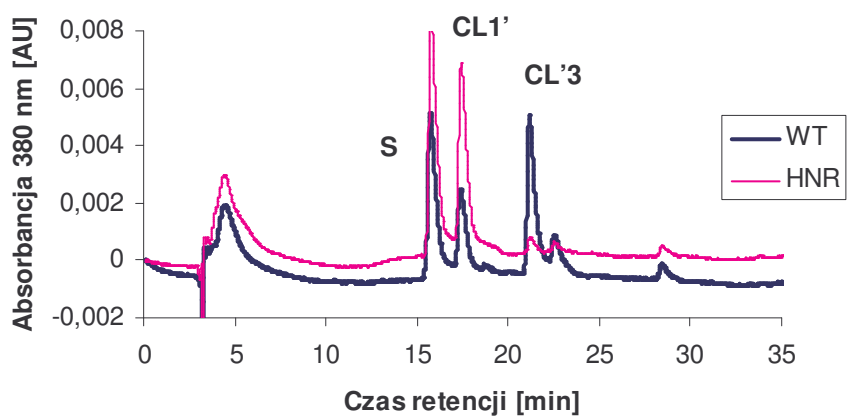
Można, więc stwierdzić, iż rola podstawnika metylowego w reaktywności badanych pochodnych zależy również od struktury łańcucha bocznego, choć generalnie jest to element struktury chemicznej hamujący reaktywność.

Porównanie zdolności do metabolizmu badanych związków wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy przedstawiłam na rys. 197.

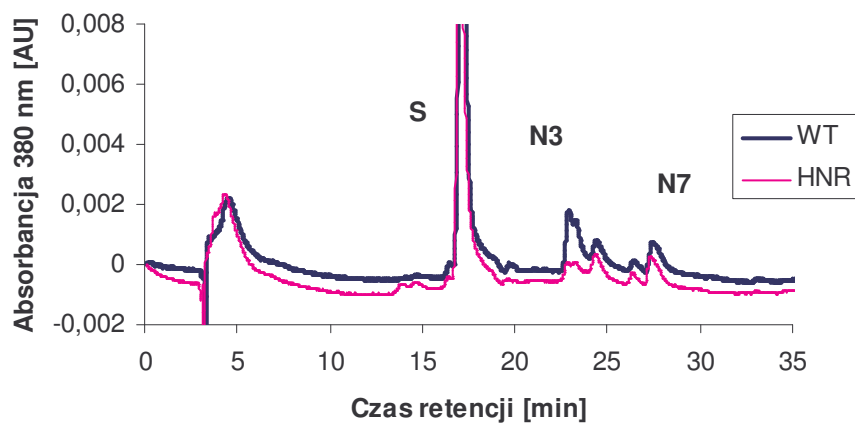
## A) Ledakrin



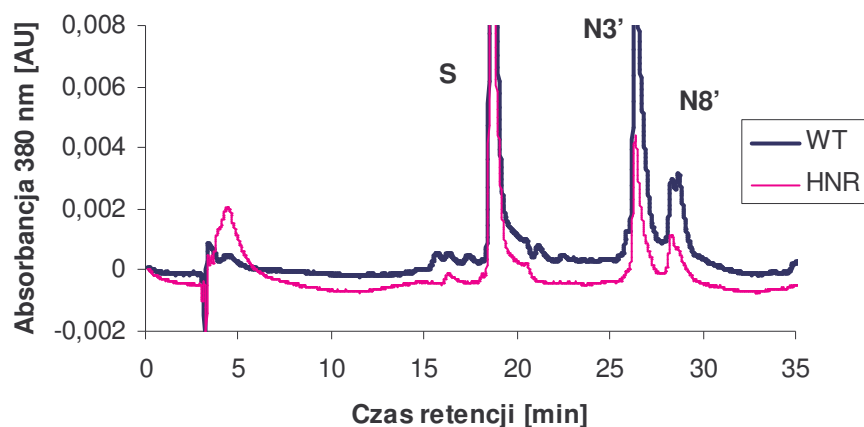
## B) C-450



## A) C-857



## B) C-1748



Rys. 196. Chromatogramy mieszanin reakcyjnych A) Ledakrinu i B) związku C-450 C) związku C-857 i D) związku C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych komórek wątroby myszy WT i HRN, 0,2 mM związek, 2 mM NADPH, 2 mg/ml enzymu, 30 minut reakcji.

Wykazałam, że podobnie jak w obecności izoenzymów cytochromu P450 Ledakrin jest bardziej reaktywny, niż związek C-450 w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy. Natomiast w przypadku drugiej pary związków relacje te są odwrócone.

Na tej podstawie trudno jest, zatem wysunąć jasny wniosek na temat wpływu grupy metylowej na reaktywność badanych pochodnych w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy, co przypuszczalnie jest specyficznym efektem działania dla tego układu enzymatycznego.

Reasumując, w przypadku związków z dodatkowym podstawnikiem metylowym w pozycji 4 pierścienia akrydyny powstaje znacznie mniejsza ilość metabolitów, ale o wyższym stężeniu, czyli związki te, chociaż mniej podatne na przemiany enzymatyczne, wykazują wyższą selektywność metabolizując do wybranych metabolitów.

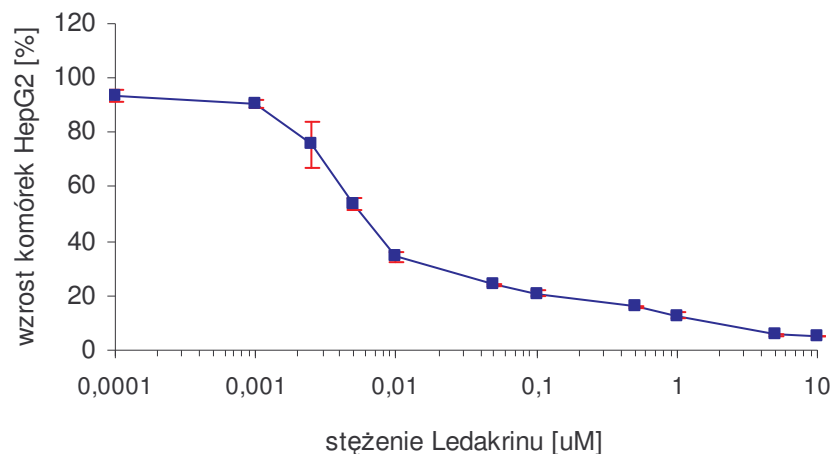
#### 4.7 Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2

Przeprowadzone dotychczas badania enzymatycznej transformacji pochodnych 1-nitroakrydyny z zastosowaniem różnych układów modelowych, stosowanych powszechnie w tego typu badaniach tj. frakcji enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów i ludzi, wybranych ludzkich izoenzymów cytochromu P450 otrzymanych na drodze rekombinacji u *E coli* oraz współpracującej z nimi reduktazy cytochromu P450 pozwoliły wykazać, że związek C-1748 jest mniej podatny na przemiany enzymatyczne, niż jego analog, pozbawiony grupy metylowej, (C-857) pochodna C-857, a metabolizm C-1748 prowadzi do powstania selektywnie od 1 do 3 produktów.

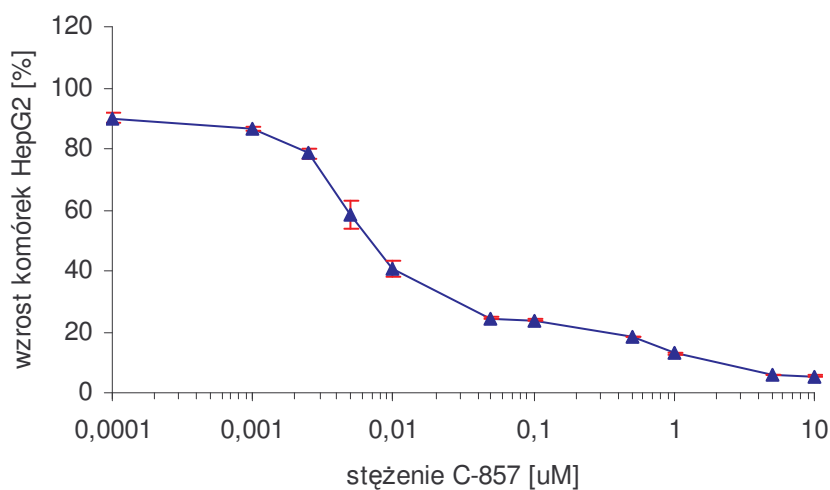
W ostatnim etapie pracy zbadałam biotransformację pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w jednym z miejsc ich oczekiwanego działania w terapii, w komórkach nowotworowych. Do badań wybrałam komórki ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, które ze względu na obecność enzymów I fazy ( CYP1A, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4 ) i II fazy metabolizmu ( UGT, NAT, GST ) są często stosowane w badaniach przemian metabolicznych wielu leków i ksenobiotyków [127,128,129]. Warto dodać, że komórki Hep G2 są przykładem komórek trudnego do terapii nowotworu wątroby.

##### 4.7.1 Badania wstępne – cytotoksyczność i opracowanie metody otrzymywania i izolacji metabolitów

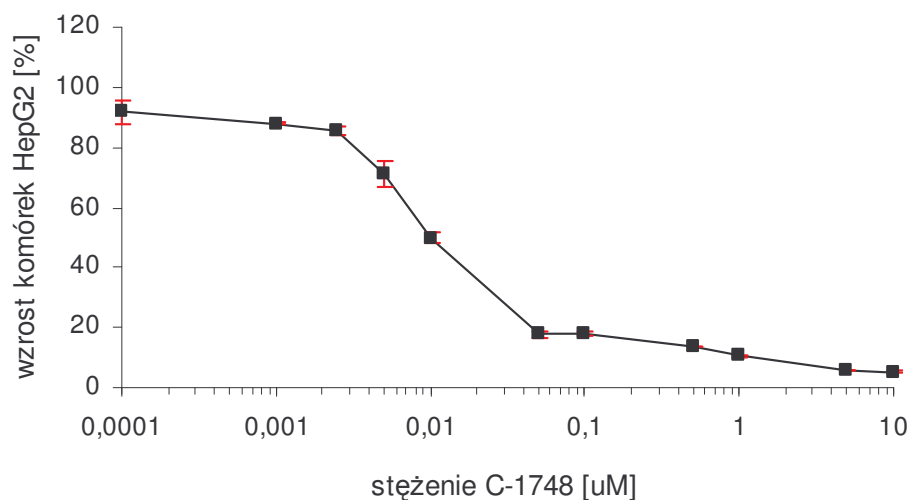
Badania biotransformacji pochodnych Ledakrinu oraz związków C-857 i C-1748 w komórkach poprzedziłam określeniem ich aktywności cytotoksycznej wobec wybranych komórek HepG2. Aktywność tą wyznaczyłam prowadząc 72 godzinną inkubację komórek HepG2 ze związkiem stosując metodę opartą na zdolności oksydoredukcyjnej mitochondriów, z wykorzystaniem barwnika MTT. Na podstawie uzyskanych wyników sporządziłam wykresy zależności zahamowania wzrostu komórek HepG2 ( % kontroli ) od logarytmu stężenia, co przedstawiłam na rys. 198-200. Następnie wyznaczyłam wartości  $EC_{50}$  dla badanych związków, czyli takie stężenia związku, przy których proliferacja komórek HepG2 została zahamowana w 50%.



Rys. 197. Krzywa zahamowania wzrostu komórek HepG2 w wyniku 72 godzinnej inkubacji z Ledakrinem. Przedstawione wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.



Rys. 198. Krzywa zahamowania wzrostu komórek HepG2 w wyniku 72 godzinnej inkubacji ze związkiem C-857. Przedstawione wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.



Rys. 199. Krzywa zahamowania wzrostu komórek HepG2 w wyniku 72 godzinnej inkubacji ze związkiem C-1748. Przedstawione wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

W tabeli zebrałam średnie wartości  $EC_{50}$  wraz z odchyleniami standardowym obliczonymi na podstawie krzywych zahamowania wzrostu komórek HepG2.

Tabela 32. Parametry aktywności cytotoksycznej pochodnych 1-nitroakrydyny wobec komórek HepG2.

	<b>Ledakrin</b>	<b>C-857</b>	<b>C-1748</b>
$EC_{50}$ [ $\mu$ M]	0,0055 $\pm$ 0,0004	0,005 $\pm$ 0,002	0,011 $\pm$ 0,0003

Porównując uzyskaną przeze mnie wartość  $EC_{50}$  dla badanych związków wykazałam, że w komórkach HepG2 pochodna C-857 ma podobną aktywność jak Ledakrin i jest 2 razy bardziej aktywna niż związek C-1748. Badania przemian metabolicznych pochodnych 1-nitroakrydyny zachodzące w komórkach nowotworowych wymagały, z jednej strony określenia warunków prowadzenia reakcji, czyli doboru: ilości komórek HepG2, stężenia związków i czasu ich inkubacji z komórkami, z drugiej zaś strony opracowania odpowiedniej metody izolacji powstających w komórkach metabolitów, dzięki czemu możliwa była ich dalsza analiza za pomocą HPLC.

W pierwszym etapie zbadalam metabolizm Ledakrinu kierując się jego poznaną wcześniej wysoką reaktywnością w stosunku do enzymów mikrosomalnych. Związek ten w odpowiednim stężeniu 0,1; 1; 5  $\mu$ M, które było wielokrotnie wyższe od wartości  $EC_{50}$  inkubowałam z 2 mln komórek HepG2 przez okres od 12, 24 i 48 godzin, a następnie izolowałam metabolity za pomocą dwóch metod ekstrakcji, co opisałam dokładniej w punkcie 5.7.8.3.:

1. ekstrakcja za pomocą 60% zimnego metanolu [142,143]
2. ekstrakcja za pomocą mieszaniny: dichlorometan-metanol  $CH_2Cl_2$ :  $CH_3OH$ , w proporcjach 2:1 [144]

Analiza chromatograficzna 17 ekstraktów komórkowych przygotowanych wg. podanych powyżej metod nie wykazała obecności, ani Ledakrinu, ani produktów jego przemian. Jedynie w jednym przypadku, po 48 godzinach inkubacji komórek HepG2 z 5  $\mu$ M roztworem Ledakrinu zaobserwowałam zmianę barwy peletu komórek z bezbarwnej na żółto-szarą, a podczas analizy HPLC jeden mało intensywny pik na chromatogramie.

Wobec powyższego zmodyfikowałam warunki inkubacji ze związkiem i ekstrakcji metabolitów z komórek. Zmieniłam stężenie związku na 20 i 40 - krotnie wyższe oraz skróciłam czas inkubacji komórek ze związkiem począwszy od 3, 4 do 6 a następnie 12 h. Do izolacji metabolitów z komórek zastosowałam ekstrakcję 60% zimnym metanolem. Po kilku próbach wstępnych przyjąłm przedstawione poniżej optymalne warunki

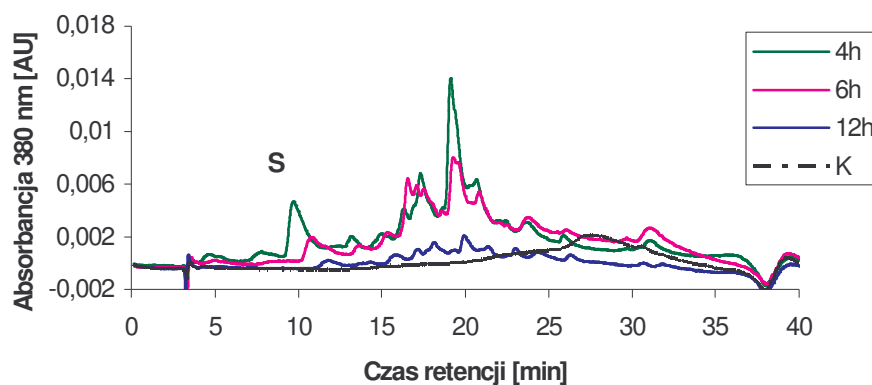
przewodzenia procesu biotransformacji pochodnych 1-nitroakrydyny w komórkach HepG2 opracowane dla obserwacji metabolitów.

- ◆  $2 \times 10^6$  komórek hodowane na płytce Petriego 5 ml
- ◆ stężenie związku 200  $\mu\text{M}$
- ◆ czas inkubacji - 3 i 4 godziny dla Ledakrinu i związku C-857  
6 i 12 godzin dla związku C-1748

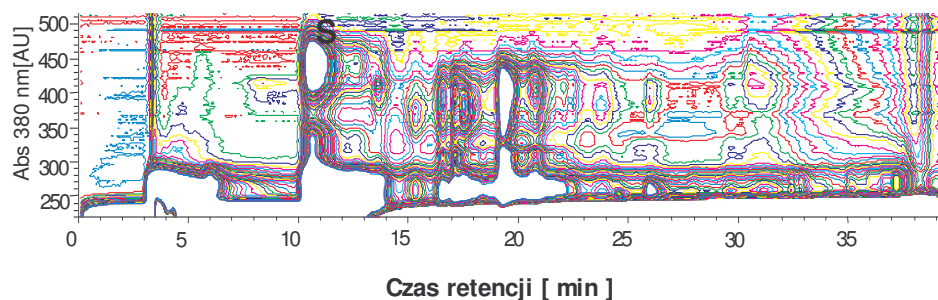
#### 4.7.2 Przemiany metaboliczne Ledakrinu

Na rys. 200 przedstawiłam wybrane chromatogramy ekstraktów metanolowych uzyskanych z komórek HepG2 traktowanych Ledakrinem, w zależności od czasu ich inkubacji ze związkiem.

A)



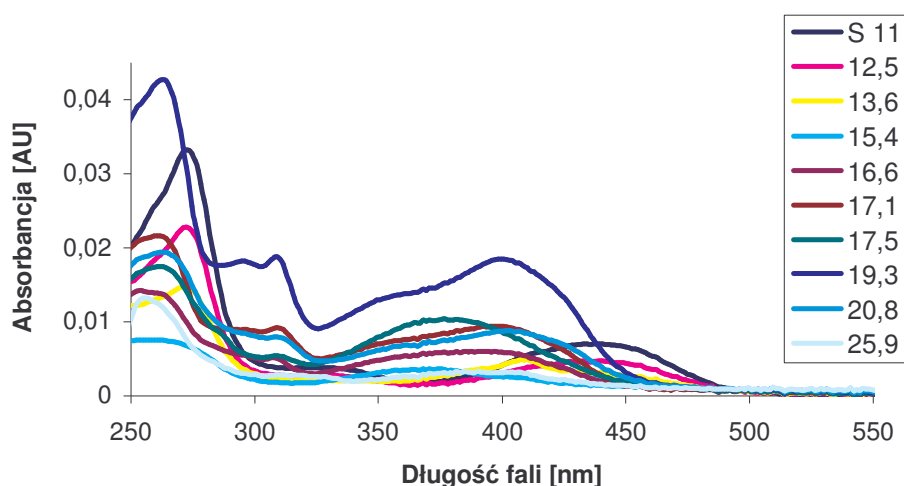
B)



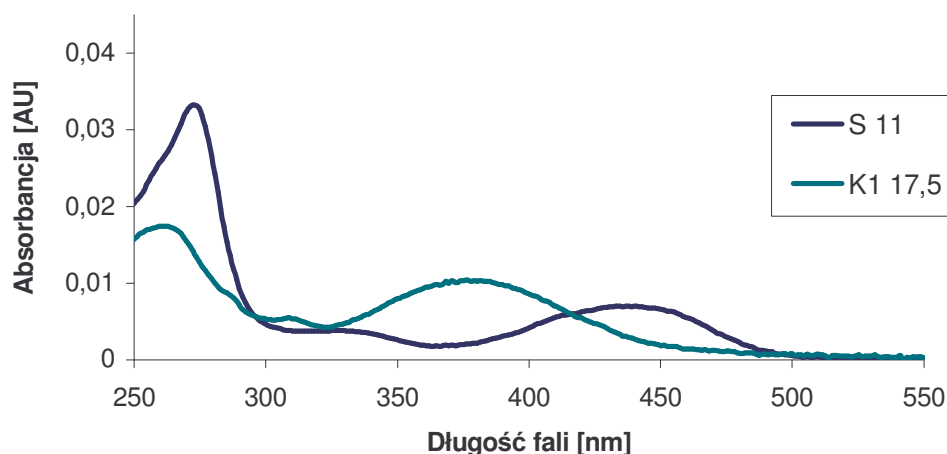
Rys. 200. Chromatogram metabolitów Ledakrinu wyizolowanych z komórek HepG2 w zależności od czasu inkubacji ze związkiem; A) wykres liniowy, B) 4h inkubacji-wykres poziomicowy; 0,2 mM Ledakrin,  $2 \times 10^6$  HepG2, \* K – kontrola, komórki nie traktowane związkiem.

Ledakrin bardzo szybko ulegał przemianom metabolicznym w komórkach HepG2. Już po 4 godzinach traktowania komórek związkiem zaobserwowałam w metanolowym ekstrakcie wysoki stopień przereagowania substratu i wiele produktów o niskim stężeniu. Stopień przemiany związku rośnie wraz z wydłużaniem czasu jego inkubacji w komórkach, a po 12 godzinach wynosi prawie 100%. Jednocześnie po tym czasie

inkubacji zaobserwowałam jedynie śladowe ilości metabolitów, których stężenie istotnie spadło w porównaniu z krótszym czasem inkubacji. Biotransformacja Ledakrinu w komórkach HepG2 prowadzi do powstania wielu produktów, które w większości charakteryzują się niską trwałością. Niezależnie od czasu inkubacji powstają te same produkty różniące się stężeniem. Widma UV-VIS przedstawione na rys. 201 i wartości czasów retencji wskazują, że co najmniej jeden z metabolitów, którego  $t_R = 17,5$  min jest identyczny z produktem metabolizmu Ledakrinu powstającymi podczas badanych wcześniej przemian enzymatycznych *in vitro*.



Rys. 201. Widma UV-VIS metabolitów Ledakrinu wyizolowanych z komórek HepG2.



Rys. 202. Widma UV-VIS Ledakrinu i jego metabolitu wyizolowanego z komórek HepG2 zidentyfikowanego we wcześniejszych badaniach enzymatycznych.

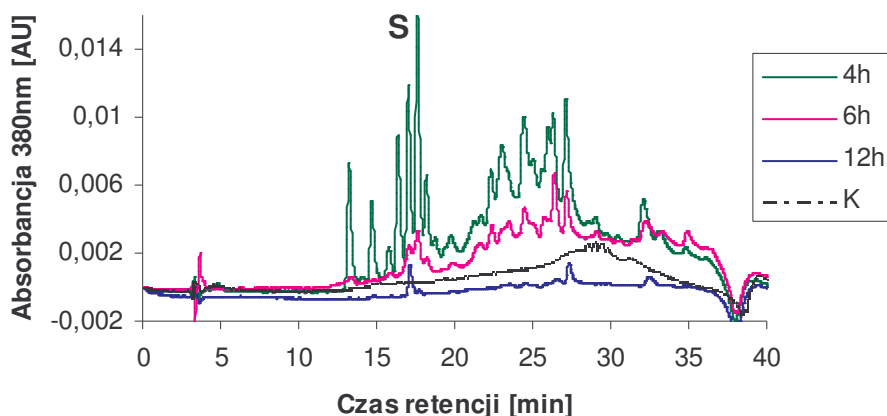
Jego Widmo UV-VIS prezentowane na rys. 202 oraz wstępne analizy ESI-MS (dane nieprezentowane) wskazują, iż jest to znany metabolit pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, który w strukturze posiada dodatkowy pierścień pięciocłonowy.



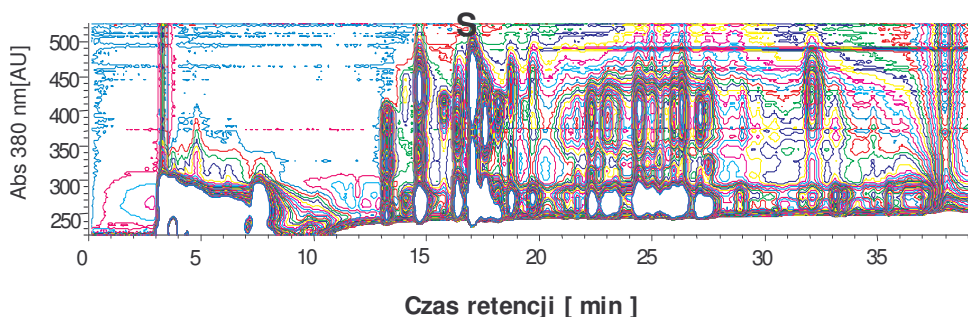
### 4.7.3 Metabolizm związku C-857 ( Capridine $\alpha$ )

Biotransformację związku C-857 prowadziłam w identycznych warunkach, jak w przypadku Ledakrinu i uzyskane chromatogramy otrzymanych ekstraktów komórkowych przedstawiłam na rys.203.

#### A) C-857

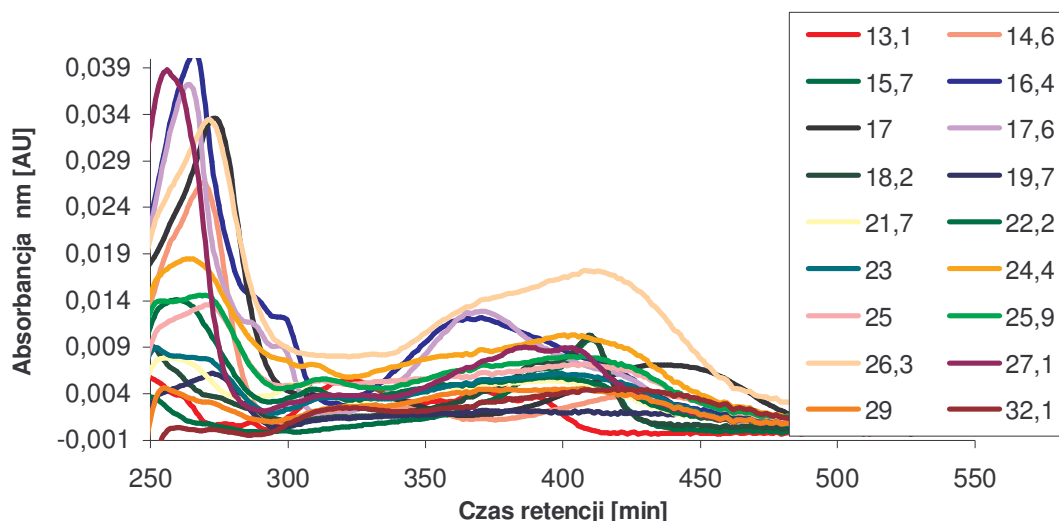


#### B)

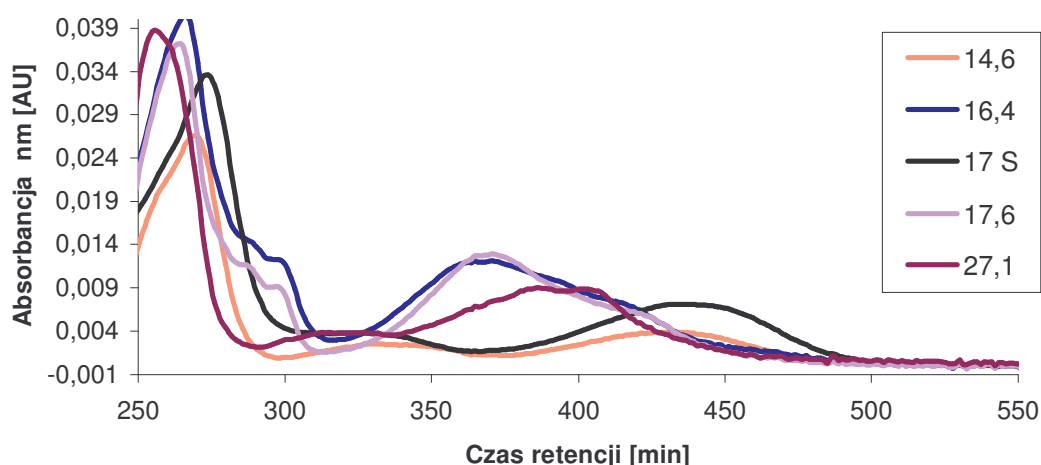


Rys. 203. Chromatogram metabolitów związku C-857 wyizolowanych z komórek HepG2 w zależności od czasu inkubacji ze związkiem; A) wykres liniowy, B) 4h inkubacji-wykres poziomicowy; 0,2 mM C-857,  $2 \times 10^6$  HepG2, \* K – kontrola, komórki nie traktowane związkiem.

W badanych warunkach stopień przereagowania związku C-857 jest nieco niższy, niż w przypadku Ledakrinu, ale w reakcjach tych powstaje zdecydowanie większa ilość metabolitów w wyższych stężeniach, niż produkty powstające podczas biotransformacji Ledakrinu [21,22]. Wykonane i przedstawione na rys. 204 widma UV-VIS oraz czasy retencji poszczególnych pików obecnych na chromatogramie wskazują, że wśród wielu produktów występują także metabolity charakterystyczne dla enzymatycznych przemian związku C-857, opisane we wcześniejszych rozdziałach niniejszej rozprawy. Niemniej metabolizm w komórkach HepG2 prowadzi do powstania dużej ilości produktów dotychczas niezidentyfikowanych.



Rys. 204. Widma UV-VIS metabolitów związku C-857 wyizolowanych z komórek HepG2 traktowanych tym związkiem.



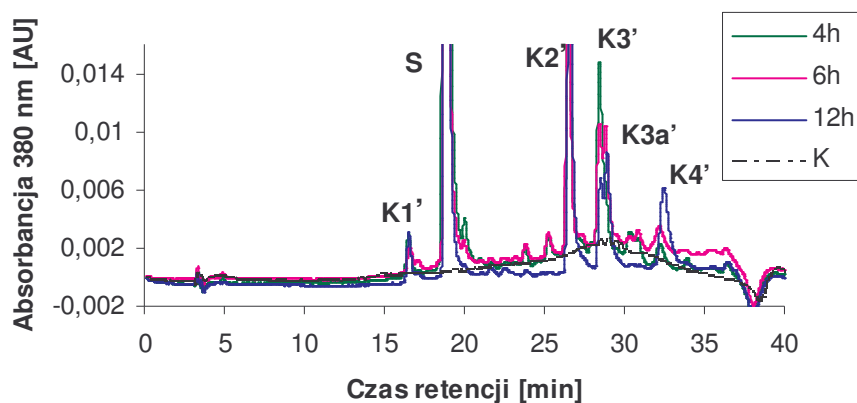
Rys. 205. Widma UV-VIS związku C-857 i kilku metabolitów wyizolowanych z komórek HepG2 i zidentyfikowanych we wcześniejszych badaniach.

Wstępna analiza widm ESI-MS (dane nieprezentowane) poszczególnych pików chromatograficznych oraz widm UV-VIS (rys. 204-205) wykazała obecność trzech znanych produktów. Są to: produkt ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej, którego widmo UV-VIS jest bardzo zbliżone do substratu, produkt z dodatkowym pierścieniem pięciocłonowym oraz akrydony: 1-nitro i 1-aminoakrydon. Ostatnie z wymienionych metabolitów występują jednocześnie w jednym pikcie chromatograficznym.

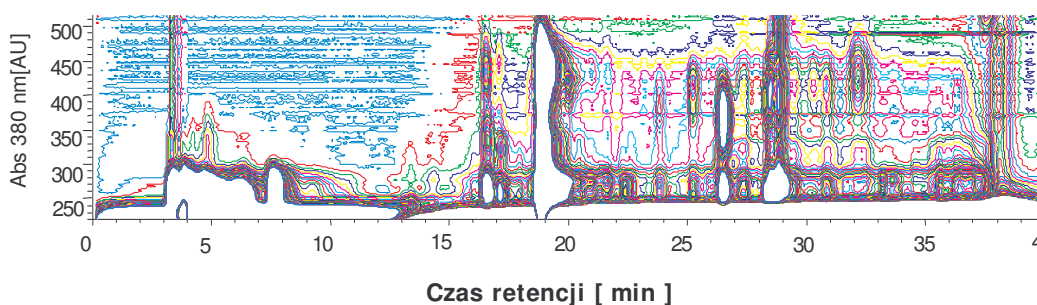
#### 4.7.4 Przemiany związku C-1748 ( Capridine $\beta$ )

Poniżej na rys. 206 przedstawiłam chromatograficzny obraz metabolitów metyloвого analogu pochodnej C-857, związku C-1748 powstających w komórkach HepG2 w zależności od czasu inkubacji komórek ze związkiem.

##### A) C-1748



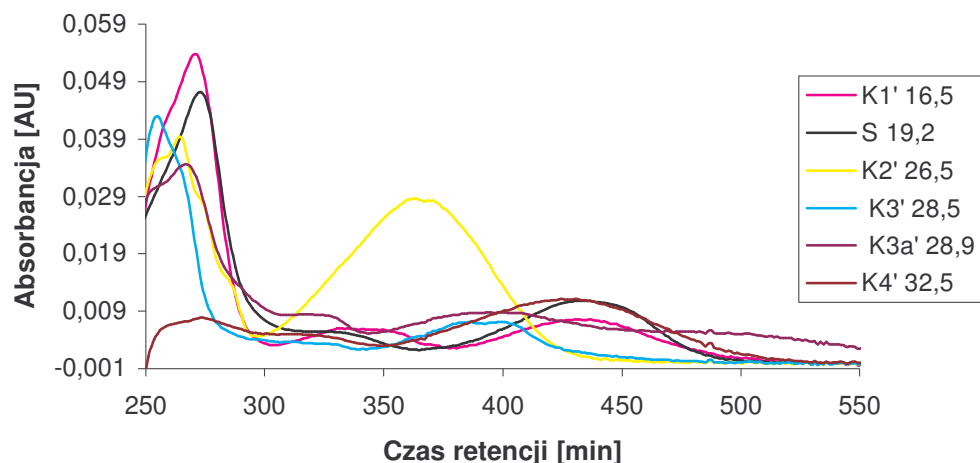
##### B)



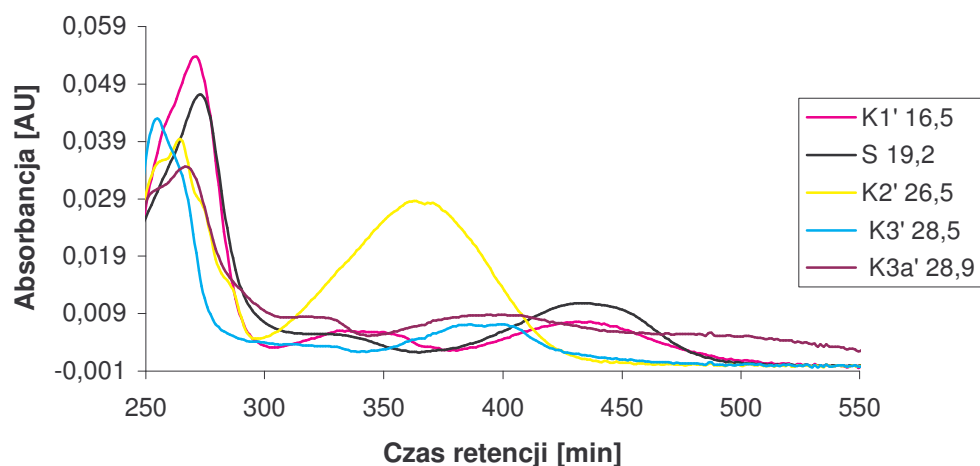
Rys. 206. Chromatogram metabolitów związku C-1748 wyizolowanych z komórek HepG2 w zależności od czasu inkubacji ze związkiem; A) wykres liniowy, B) 6h inkubacji-wykres poziomicowy; 0,2 mM C-1748,  $2 \times 10^6$  HepG2, \* K – kontrola, komórki nie traktowane związkiem.

Związek C-1748 jest znacznie mniej reaktywny, niż dwie wcześniej zbadane pochodne 1-nitroakrydyny. Nawet po 12 godzinach inkubacji związku w komórkach stopień jego przereagowania jest niski i prowadzi do powstania pięciu głównych metabolitów: K1', K2', K3', K3a' i K4'. Zwraca uwagę metabolit K3', którego stężenie maleje wraz z czasem trwania inkubacji, a wzrasta stężenie sąsiedniego pików K3a'. Natomiast stężenie produktów K2' i K4' wzrastało w tym samym czasie, co sugeruje, iż metabolity te powstawały wolniej i nie ulegały tak szybko rozkładowi.

Poniżej na rys. 208 przedstawiłam widma UV-VIS poszczególnych pików produktów związku C-1748 obserwowanych na chromatogramie, które można przyporządkować znanym wcześniej produktom tego związku.



Rys. 207. Widma UV-VIS metabolitów związku C-1748 wyizolowanych z komórek HepG2 traktowanych związkiem.



Rys. 208. Widma UV-VIS związku C-1748 i jego trzech metabolitów wyizolowanych z komórek HepG2, a zidentyfikowanych we wcześniejszych badaniach.

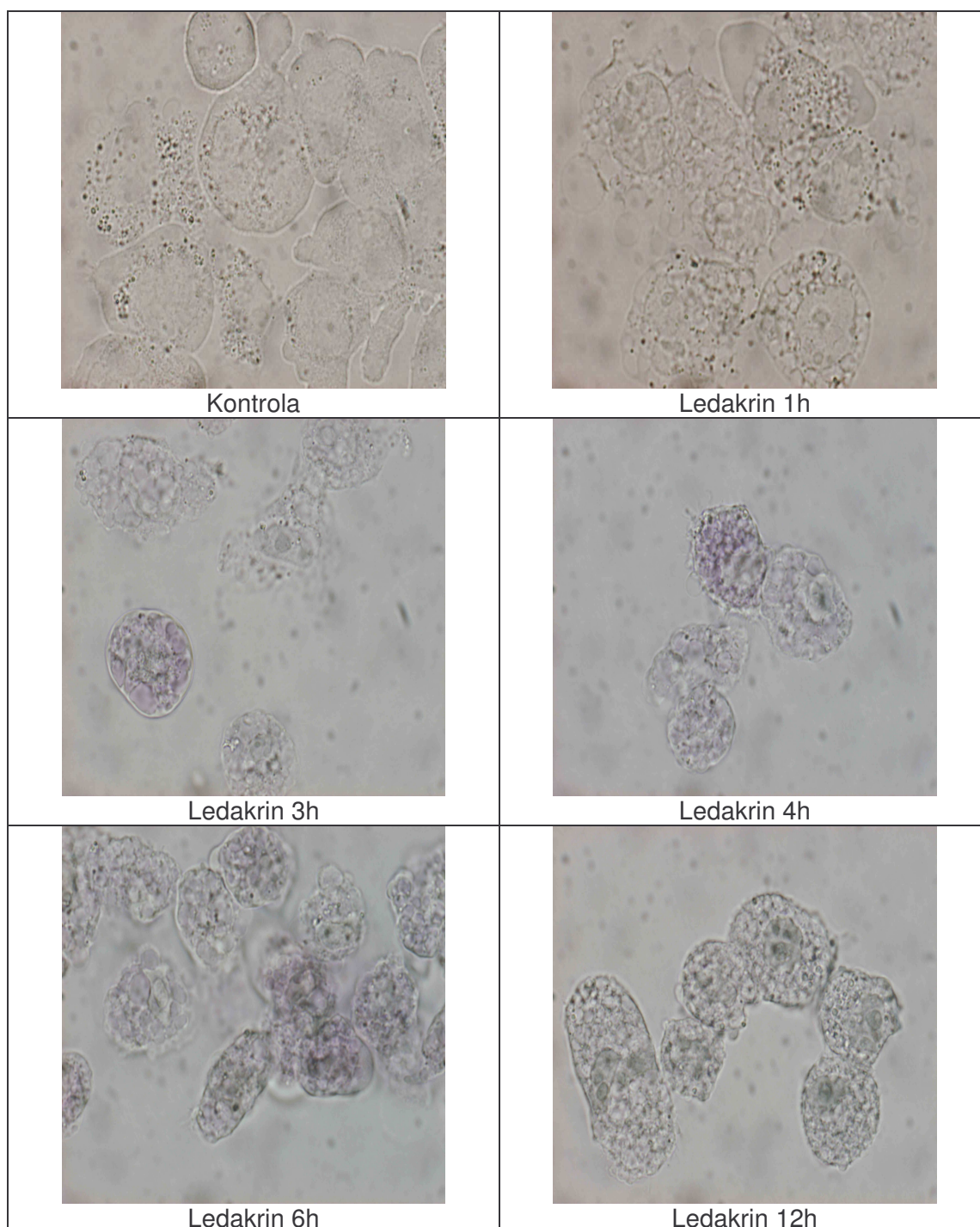
W komórkach HepG2 traktowanych związkiem C-1748 podobnie, jak w przypadku pochodnej C-857 prawdopodobnie powstaje produkt za zredukowaną grupą nitrową do aminowej K1', produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocłonowym, K2' oraz akrydony K3' i K3a' odpowiednio 1-nitro i 1-aminoakrydon.

#### **4.7.5 Obserwacje metabolitów pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny powstających w komórkach HepG2, przy wykorzystaniu techniki mikroskopii**

Przedstawione powyżej badania wykazały, że pochodne 1-nitroakrydyny wnikają do komórek ludzkiego nowotworu wątroby i tam ulegają biotransformacji tworząc szereg reaktywnych metabolitów, które mogą oddziaływać zarówno z białkami, jak i z DNA.

Podczas badania biotransformacji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach HepG2 zauważyłam, że ekstrakty z komórek zawierające metabolity badanych związków, jak i pelet komórek po inkubacji charakteryzowały się zróżnicowanym zabarwieniem: począwszy od szaro-fioletowej w przypadku Ledakrinu i związku C-857, a skończywszy na różowo-fioletowej dla związku C-1748. Ponadto zauważyłam, iż intensywność barwy zmieniała się wraz z czasem inkubacji komórek ze związkami. Wyniki te skłoniły mnie to do obserwacji komórek traktowanych związkiem pod mikroskopem. Przygotowałam, więc preparaty mikroskopowe komórek HepG2 po inkubacji z badanymi związkami. Otrzymane obrazy mikroskopowe w świetle widzialnym przedstawiłam na poniższych rysunkach (rys. 209-211).



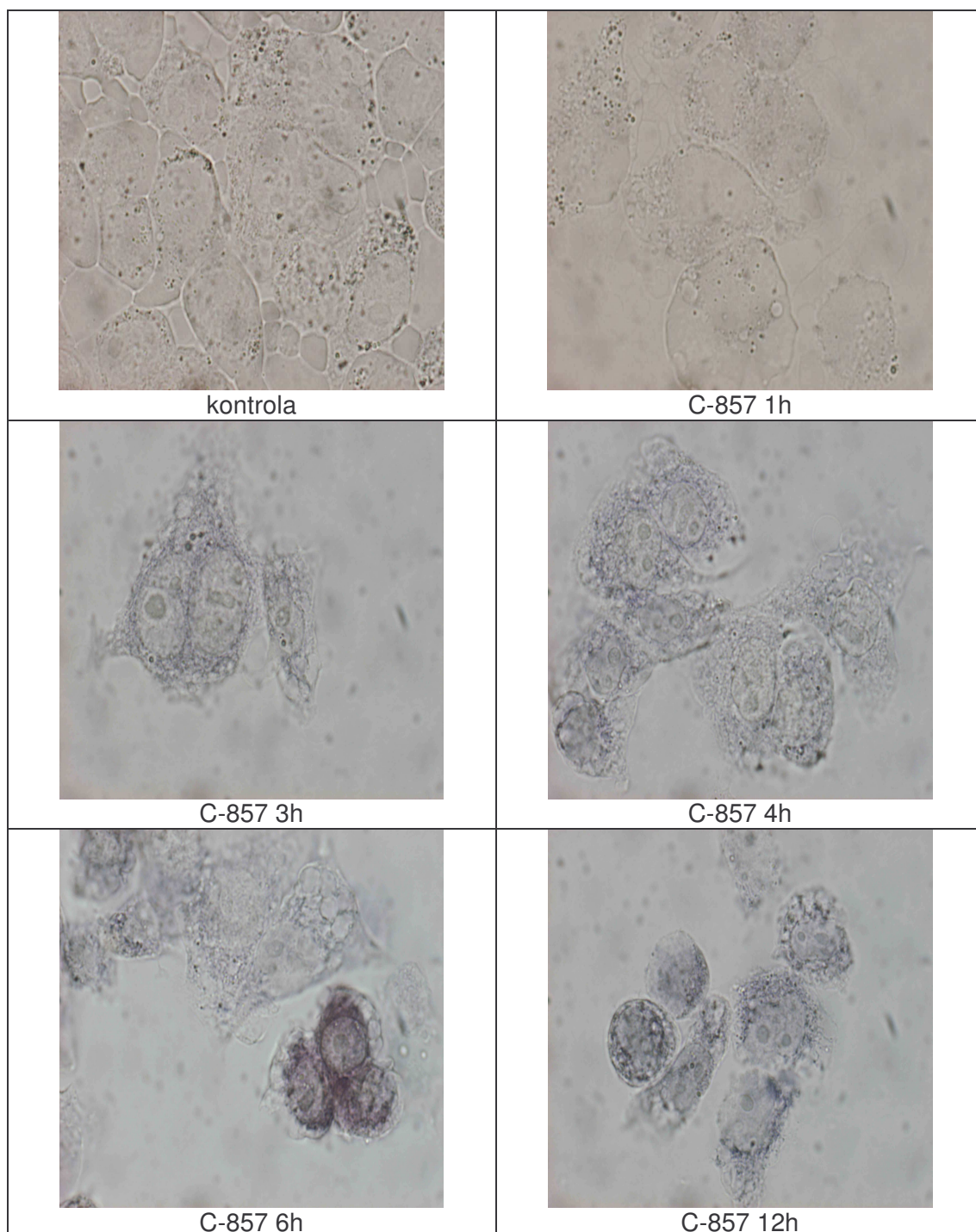


Rys. 209. Obraz mikroskopowy komórek HepG2 traktowanych Ledakrinem i komórek kontrolnych w zależności od czasu; 200  $\mu\text{M}$  Ledakrin,  $2 \times 10^6$  komórek, mikroskop świetlny (60X).

Na otrzymanych obrazach zabarwione fragmenty cytoplazmy obserwowano już po 2 i 4 godzinach inkubacji. Po 12 godzinach zabarwienie to było znacznie słabsze. Prawdopodobnie intensywność zabarwienia cytozolu jest związana ze stężeniem metabolitów powstających w trakcie inkubacji komórek ze związkiem. Przedstawiony na rys.209 obraz mikroskopowy komórek jest zgodny z analizą chromatograficzną ekstraktów komórkowych, gdzie po 12h na chromatogramach nie obserwowałam już metabolitów. Można przypuszczać, że po dłuższym czasie inkubacji metabolity Ledakrinu uległy

rozkładowi bądź związały się ze strukturami komórkowymi, co uniemożliwiło ich ekstrakcję.

W kolejnym etapie pracy porównałam obrazy mikroskopowe komórek HepG2 traktowanych związkiem C-857.



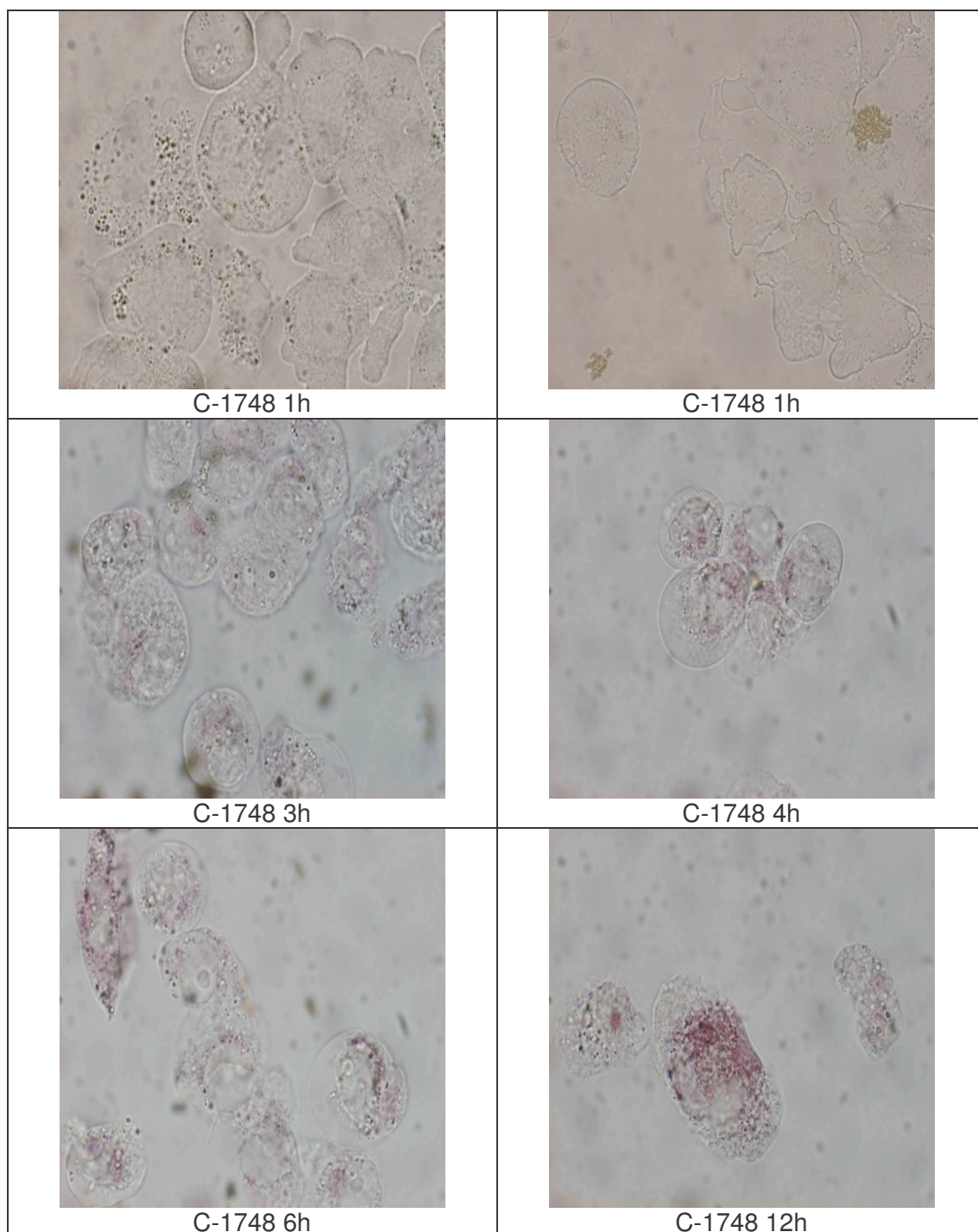
Rys. 210. Obraz mikroskopowy komórek HepG2 traktowanych związku C-857 i komórek kontrolnych w zależności od czasu; 200  $\mu$ M C-857,  $2 \times 10^6$  komórek, mikroskop świetlny (60X).

Można zaobserwować na powyższym rysunku, że podobnie, jak w przypadku Ledakrinu metabolity związku C-857 są obecne już po 2 godzinach inkubacji komórek ze związkiem i ilość ich wzrasta wraz z czasem inkubacji. Po 12 godzinach inkubacji zabarwienie cytoplazmy również jest słabsze. Sugeruje to obniżenie stężenia



metabolitów, co jest zgodne z opisaną wcześniej analizą HPLC tych ekstraktów komórkowych (rys.203). Na przykładzie przedstawionych powyżej zdjęć preparatów mikroskopowych komórek (3h, 4h, 6h) wyraźnie widać, iż metabolity związku C-857 występują na zewnątrz jądra komórkowego. Ponadto wydaje się, że w przypadku związku C-857 metabolity zlokalizowane są głównie wokół błony komórkowej, a nie równomiernie w całej komórce, jak to było w przypadku komórek traktowanych Ledakrinem.

W ostatnim etapie badań mikroskopowych obserwacji poddałam komórki nowotworowe inkubowane ze związkiem C-1748, co przedstawiłam poniżej (rys.211).



Rys. 211. Obraz mikroskopowy komórek HepG2 traktowanych związkiem C-1748 i komórek kontrolnych w zależności od czasu, 200  $\mu$ M C-1748, 2mln komórek mikroskop świetlny (60X).



Na przedstawionych powyżej zdjęciach mikroskopowych komórek widoczne są metabolity związku C-1748 po 3 godzinach inkubacji, jednak ich stężenie w komórkach, rozumiane jako intensywność barwy cytozolu, po tym czasie jest niższe, niż w przypadku pozostałych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny. Stężenie metabolitów rośnie wraz z wydłużeniem czasu inkubacji by po 12 godzinach osiągnąć wartość maksymalną, co jest również skorelowane z wcześniejszymi wynikami analizy HPLC ekstraktów komórkowych traktowanych związkiem C-1748. Wyniki wskazują, że wysokie stężenie metabolitów związku C-1748 w komórce obserwuje się po dłuższym czasie inkubacji, niż w przypadku dwóch wcześniej badanych związków.

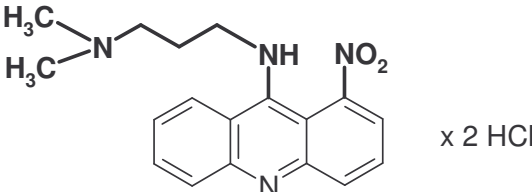
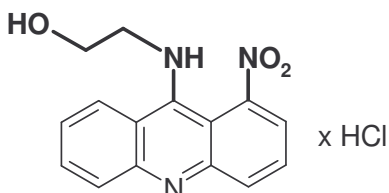
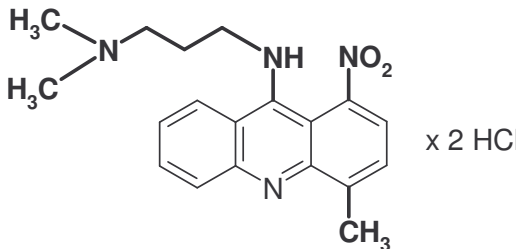
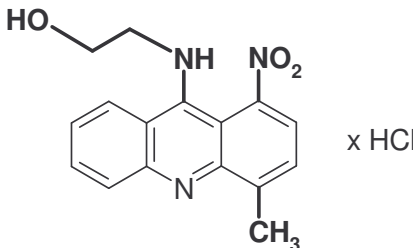
Podsumowując badania ostatniego etapu pracy, wykazałam, że badane związki łatwo wnikają do komórek HepG2, gdzie są w różnym stopniu metabolizowane. Stężenie powstających w cytoplazmie metabolitów różni się w zależności od czasu inkubacji i rodzaju związku. Analiza HPLC ekstraktów komórkowych wskazuje, że najbardziej reaktywny jest Ledakrin, następnie związek C-857 i najsłabiej związek C-1748. Najwięcej różnorodnych metabolitów powstaje jednak w komórkach traktowanych związkiem C-857, co widoczne jest nie tylko w analizie HPLC ekstraktów komórkowych. Związek C-1748 jest najmniej podatny na przemiany metaboliczne w komórkach HepG2, ale jego metabolity osiągają najwyższe stężenie i są najbardziej trwałe spośród wszystkich metabolitów badanych pochodnych 1-nitroakrydyny powstających w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2.

## 5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 5.1 Badane związki

Badane związki to pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, które zostały zsyntetyzowane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii w dwóch zespołach naukowych Profesora Andrzeja Ledóchowskiego (Ledakrin, związek C-450 związek C-857) i później Profesora Jerzego Konopy (C-1748).

Tabela 33. Badane związki

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ledakrin</li> </ul>	Dichlorowodorek 9-(3'-dimetyloaminopropyloamino-1-nitroakrydyny 
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ C-857 (Capridine α)</li> </ul>	Monochlorowodorek 9-(2'-hydroksyetyloamino)-1-nitroakrydyny 
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ C-450</li> </ul>	Dichlorowodorek 9-(3'-dimetyloaminopropyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyny 
C-1748C (Capridine β)	Monochlorowodorek 9-(2'-hydroksyetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyny 

## 5.2 Odczynniki chemiczne i kofaktory

Tabela 34. Odczynniki chemiczne i kofaktory.

▪ alkohol etylowy i metylowy CH <sub>3</sub> OH i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	ChemPur, Piekary Śląskie, Polska
▪ alkohol metylowy, czystość HPLC CH <sub>3</sub> OH	LAB-SCAN Analytical Sciences, Dublin, Irlandia
▪ antybiotyki: Streptomycyna Penicylina G	Serva, Heidelberg, Niemcy
▪ bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5- dofenylotetrazolowy, MTT	Sigma Chemical Co., USA
▪ chlorek magnezu MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	Sigma Chemical Co., USA
▪ chlorek potasu KCl	Sigma Chemical Co., USA
▪ dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma Chemicals Co, USA
▪ β-fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (β-NADPH)	Sigma Chemicals Co, USA
▪ fosforan 1-zasadowy potasu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Polskie Odczynniki Chemiczne S.A., Polska
▪ fosforan 2-zasadowy potasu K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Polskie Odczynniki Chemiczne S.A., Polska
▪ fosforan 2-zasadowy sodu Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	FLUKA Biochemika, Niemcy
▪ kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)-sól trójsodowa, Na <sub>3</sub>	Sigma Chemical Co., USA
▪ kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)-sól dwusodowa, Na <sub>2</sub>	Sigma Chemical Co., USA
▪ kwas mrówkowy, czystość HPLC HCOOH	LAB-SCAN Analytical Sciences, Dublin, Irlandia
▪ mrówczan amonu, czystość HPLC HCOONH <sub>4</sub>	AnalaR BDH Laboratory Supplies, Anglia
▪ odczynnik Bradford	Bio-Rad Niemcy
▪ sacharoza	Polfa, Kraków, Polska
▪ Tris-HCl	Sigma Chemical Co., USA
▪ wodorowęglan sodu NaHCO <sub>3</sub>	Sigma Chemical Co., USA
▪ woda redestylowana (R 18 MΩ)	NANOPUR, Ultrapure Water System, LABO-PLUS, Warszawa

## 5.3 Enzymy

- **Frakcja enzymów mikrosomalnych** wyizolowanych z wątroby szczurów o stężeniu 20 mg/ml, TEBU-BIO, Francja:  
Rat Liver Microsomes, R 1000.
- **Frakcja szczurzych enzymów mikrosomalnych** wyizolowanych z komórek wątroby po indukcji różnymi czynnikami: 20 mg/ml, TEBU-BIO, Francja.
  1. Rat Liver Microsomes, 3-methylcholanthrene – treated; R 1084.
  2. Rat Liver Microsomes, Phenobarbital – treated; R 1078.
  3. Rat Liver Microsomes, Clofibrilic acid – treated; R 1063.
  4. Rat Liver Microsomes, Dexamethasone – treated; R 1093.

- **Fracje ludzkich enzymów mikrosomalnych**, 20 mg/ml, TEBU-BIO, Francja.  
Human liver microsomes – H1060.
- **Rekombinantowa ludzka NADPH – zależna reduktaza cytochromu P450, CPR, EC1.6.2.4.** – otrzymana dzięki uprzejmości prof. R. C. Wolfa w ramach współpracy z Biomedical Research Centre, Dundee, Szkocja.
- **Inne enzymy rekombinantowe – TEBU-BIO-Francja**

Tabela 35. Rekombinantowe izoenzymy cytochromu P450.

Nr	Rodzaj izoenzymu	stężenie białka
1	Human <b>CYP1A2R</b> Bactosomes, CYP012	2100 pmol/ml
2	Human <b>CYP2C19R</b> Bactosomes, CYP008	980 pmol/ml
3	Human <b>CYP3A4R</b> Bactosomes, CYP002	1440 pmol/ml
4	Human <b>CYP1A2LR</b> Bactosomes, CYP012	1640 pmol/ml
5	Human <b>CYP2C19LR</b> Bactosomes, CYP025	1420 pmol/ml
6	Human <b>CYP3A4LR</b> Bactosomes, CYP010	1120 pmol/ml

- **Reaction phenotyping Kit, wersja 6, patent No. 5,478,723:**

Tabela.43. Próbkki enzymów zawarte w Reaction Phenotyping Kit.

1	H0017	5	H0032	9	H0070	13	H0122	17	Mixed Gender, H0610
2	H0023	6	H0036	10	H0071	14	H0133		
3	H0026	7	H0041	11	H0093	15	H0162		
4	H0028	8	H0068	12	H0113	16	H0191		

- **Fracje enzymów mikrosomalnych wyizolowane z komórek wątroby myszy**

Mysie wątroby otrzymano w ramach współpracy z Biomedical Research Centra z zespołem dr Colina Hendersona w Dundee, Szkocja.

Procedura izolacji frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy oraz metoda oznaczenia stężenia wyizolowanego białka została opisana w punkcie 5.7.7.2.

Stężenie wyizolowanych frakcji białek mikrosomalnych podano w tabeli 44:

Tabela. 36. Stężenia enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy typu WT i HRN.

Typ frakcji mikrosomalne wyizolowanej z komórek wątroby myszy	Stężenie białka
1. typ dziki, WT (wild-type)	11 mg/ml
2. <i>NADPH-reductase null</i> , HRN	20 mg/ml

- **Enzym stosowany w hodowli komórek ludzkiego nowotworu wątroby: Hep G2**  
Trypsyna – TRIPSIN-EDTA SOLUTION (10x) – Sigma Chemicals Co, USA

## 5.4 Komórki ludzkiej linii nowotworu wątroby hepatoma, HepG2

- **Linia komórkowa**

Komórki otrzymano za zgodą dr A.I. Cederbauma z Department of Pharmacology and Biological Chemistry, Mount Sinai Medical Center, New York, USA, za pośrednictwem dr hab. A. Hołowni z Akademii Medycznej w Białymstoku.

▪ **Odczynniki do hodowli komórek HepG2**

1. Pożywka MEM (Minimum Essential Medium) firmy Gibco (Szkocja, Anglia) z dodatkiem:
  - 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (Gibco, Szkocja, Anglia) inaktywowanej termicznie w 56°C przez 30 minut,
  - antybiotyków:
    - Streptomycyny (100 mg / l pożywki)
    - Penicyliny G (100 000 j / l pożywki)
2. PBS, pH = 7,2  
685 mM NaCl, 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM KCl,

## 5.5 Roztwory buforowe

Tabela 37. Roztwory buforowe stosowane w badaniach.

Skład roztworu	Skrót
roztwór do analizy HPLC - mrówczan amonu (pH 3,4)- 3,15 g HCOONH <sub>4</sub> rozpuszczono w 1000 ml wody, wartość pH otrzymana poprzez dodanie HCOOH	RHPLC
roztwór Tris-HCl do chemicznej redukcji 9-amino-1-nitroakrydyn w obecności DTT, (pH 7,4) 1,93 g Tris-zasady rozpuszczono w 100 ml wody, pH otrzymane poprzez dodanie HCl	Tris-HCL
roztwór fosforanu sodowego stosowany do inkubacji z frakcją enzymów mikrosomalnych (pH 7,4) 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O [1,78 g / 100 ml H <sub>2</sub> O] 2 mM EDTA (Na <sub>3</sub> ) [0,0716g / 100 ml roztworu] zmieszano z roztworem chlorku magnezu w stosunku 1:1 (v/v) 6 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O [0,122 g / 100 ml H <sub>2</sub> O]	RM
roztwór fosforanu potasowego stosowany do inkubacji z NADPH - zależną reduktazą cytochromu P450, CPR (pH 7,4) 100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> i 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> zmieszano w stosunku 1:1 (v/v)	RCPR
roztwór do inkubacji z rekombinantowymi izoenzymami cytochromu P450 (pH 7,4) 0,303 g Tris-HCl, 0,00448 g EDTA (Na <sub>3</sub> ) i 4,279 g sacharozy rozpuszczono w 50 ml wody	RCYP
roztwory do izolacji frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy typu WT i HRN <b>Roztwór A</b> 0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1,3 g / 100ml], 0,1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [1,74 g / 100ml] Roztwór K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> miareczkowany roztworem KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> do otrzymania pH 7,4 <b>Roztwór B :</b> roztwór A rozcieńczony do objętości 1 l i dodane następujące odczynniki: 0,1 mM EDTA X 2 H <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> ) [0,037 g / 1l] 1,15% KCl [0,0115 g / 1 l] <b>Roztwór C</b> 0,25 M roztwór sacharozy rozpuszczony w <b>roztworze B</b>	

## 5.6 Aparatura

Tabela 38. Stosowana aparatura.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aparat do chromatografii na mini kolumnach - VS SPE</li> </ul>	Supelco, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chromatograf HPLC 996</li> <li>-Inżektor, Rheodyne 7725i;</li> <li>-Detektor wielodiodowy 996;</li> <li>-System kontrolny 600E</li> </ul>	Waters Co., USA:
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chromatograf HPLC "Breeze"</li> <li>-Binary HPLC Pump, 1525;</li> <li>-Inżektor, Rheodyne 7725i;</li> <li>-Dual <math>\chi</math> Absorbance Detector, 2487</li> </ul>	Waters Co., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chromatograf HPLC sprzężony ze spektrometrem mas LC/MSD 1100</li> </ul>	Agilent Technologies, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chromatograf Prominence LC-20, sprzężony z tandemowym spektrometrem mas 4000 Q TRAP</li> <li>- źródło jonów – electrospray (TurboIonSpray)</li> <li>- analizator - potrójny kwadrupol/liniowa pułapka jonowa</li> </ul>	Shimadzu Co., Japonia Applied Biosystem, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chromatograf sprzężony z analizatorem masy cząsteczkowej związków HR Mariner</li> </ul>	Perceptive Biosystems, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cytowirówka „Cytofuge 2”</li> </ul>	Iris International Inc., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogenizator</li> </ul>	Weaton, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kolumny i prekolumny chromatograficzne typu faz odwróconych, Suplex pKb-100</li> <li>-analizyczna, 25 X 0,46 cm</li> <li>-preparatywna, 25 X 1cm</li> <li>-prekolumna 2 cm</li> </ul>	Supelco, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kolumna szklana wypełniona złożem do faz odwróconych typu Lichrorep TMRP-18 ( 40-63 mikr ) Nr A1704</li> </ul>	Sigma Chemical Co., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inkubator do hodowli komórek z CO<sub>2</sub> NUAIRE</li> </ul>	Nuaire Inc., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liofilizator, Labconco Freeze Dry System Lyph Lock 45</li> </ul>	Labconco Co. USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Licznik komórek, Coulter, Beckman Z1</li> </ul>	Beckman Coulter, Inc., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Łaźnia wodna – FisherBrand, typ FBH 600,</li> </ul>	Lauda, Niemcy
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Łaźnia ultradźwiękowa-Bandelin Sonorex, RK52, Hf-35 k Hz, P 80-120 W</li> </ul>	Bandelin Eletronic, Niemcy
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60</li> </ul>	Olympus America Inc., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Minikolumny SUPELCLEAN LC-18, 6 ml,</li> </ul>	Supelco, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ pH-metr ORION, model 710A,</li> </ul>	Orion, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Spektrofotometr Cary Bio 300</li> </ul>	Cary Bio, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Spektrofotometr</li> </ul>	Thermo Spectronic, USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Spektrometr rezonansu jądrowego NMR Varian Unity Plus 500 MHz</li> </ul>	Varian Inc., USA
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Termoblok TB 941U</li> </ul>	W J Electronic, Polska

▪ Waga analityczna WA 35, typ PRL TA14	Kern&Sohn GmbH, Niemcy
▪ Wirówka MiniSpin	Eppendorf, Niemcy
▪ Wirówka CENTRIFUGE 5810	Eppendorf, Niemcy
▪ Wirówka XL-70 Ultracentrifuge, - rotor NVTi65, Beckman	Beckman Inc., USA
▪ Wyciąg laminarny Labgard Class II laminar flow Biological Safety Cabinet Model Nu-425-300E/400E/600E Nu 425-300G-400G/600G	Nuaire Inc., USA

## 5.7 Procedury

### 5.7.1 Metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów o różnej ekspresji izoenzymów cytochromu P450

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór wyjściowy związków: C-857 i C-1748, 100 mM [0,32 mg C-857, 0,33 mg C-1748 rozpuszczone w 10 µl DMSO] i rozcieńczony w wodzie redestylowanej 1:50, końcowe stężenie związków 2 mM
- Roztwór Ledakrinu o stężeniu 10 mM [0,4 mg / 100 µl H<sub>2</sub>O]
- Frakcja enzymów mikrosomalnych o stężeniu 20 mg/ml
- Frakcje enzymów mikrosomalnych o podwyższonej ekspresji rodzin cytochromu P450: CYP1A, CYP2B, CYP3A, CYP4A
- NADPH o stężeniu 20 mM [16,66 mg NADPH / 1 ml roztworu buforowego, RM]
- Roztwór buforowy, RM
- Roztwór buforowy, RHPLC

#### Mieszanina reakcyjna

Reakcje w obecności enzymów mikrosomalnych prowadzono w następującym roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

Inkubacja ze związkiem C-857 i C-1748

- 7 µl roztworu związku o stężeniu 2 mM w roztworze fosforanowym RM (0,2 mM)
- 7 µl NADPH o stężeniu 20 mM, (2 mM)
- 7 µl enzymów mikrosomalnych o stężeniu 20 mg/ml, (2 mg/ml)
- 49 µl roztworu MR

Inkubacja z Ledakrinem

- 7 µl roztworu związku o stężeniu 10 mM w buforze fosforanowym, MR (1 mM)
- 28 µl NADPH o stężeniu 10 mM, (4 mM)
- 7 µl enzymów mikrosomalnych o stężeniu 20 mg/ml lub  
14 µl enzymów mikrosomalnych o stężeniu 10 mg/ml (2 mg/ml)
- 28 µl lub odpowiednio 14 µl roztworu buforowego MR



**Przebieg doświadczenia**

Rozmrożone w temperaturze pokojowej enzymy mikrosomalne wprowadzono do roztworu o pH 7,4 i po lekkim wytrząsaniu (Vorteks) preinkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Następnie dodawano odpowiednią ilość związku i NADPH. Po upływie określonego czasu inkubacji w temperaturze 37°C przebieg reakcji zahamowano dodając do mieszaniny 70 µl schłodzonego metanolu. Po 10 minutach chłodzenia w łaźni z lodem roztwór wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. obr./min. Supernatant наносono w ilości 50 µl na kolumnę Suplex pKb-100. Analizę chromatograficzną prowadzono w układzie gradientowym przedstawionym poniżej. Mieszaninę analizowano natychmiast po wymieszaniu reagentów oraz w różnych odstępach czasu.

**Analiza HPLC****▪ Aparat**

1. Chromatograf HPLC 996
2. Chromatograf HPLC „Breeze”
3. Kolumna analityczna i prekolumna

**▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkami podano w tabeli 47. Ledakrin i związek C-857 - układ gradientowy nr 1 oraz związek C-1748 - układ gradientowy nr 2).

*Tabela 39. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności enzymów mikrosomalnych.*

UKŁAD GRADIENTOWY NR 1				UKŁAD GRADIENTOWY NR 2			
Czas (min)	Skład fazy ruchomej w %			Czas (min)	Skład fazy ruchomej w %		
	Metanol	Mrówczan amonu pH~3	Gradient zmian		Metano l	Mrówcza n amonu pH~3	Gradient zmian
0	15	85	-	0	20	80	-
25	95	5	6	25	95	5	6
35	15	85	6	35	20	80	6
50	15	85	10	50	20	80	10

**Detekcja pików w analizie HPLC**

Widma UV-VIS poszczególnych pików produktów rejestrowano za pomocą chromatografu 996 z wielodiodowym detektorem UV-VIS, co pozwoliło na wstępną charakterystykę powstających w reakcjach metabolitów.

Analizę HPLC-ESI-MS przeprowadzono w Laboratorium Chromatografii Cieczowej Katedry Chemii Analitycznej PG pod kierunkiem dr A. Kot-Wasik. Widma MS zarejestrowano na chromatografii HPLC sprzężonym ze spektrometrem mas LC/MSD 1100 (Agilent), co pozwoliło na wykonanie widm MS podczas analizy HPLC dla każdego pików chromatograficznego otrzymanego bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej.



## 5.7.2 Redukcja chemiczna związków C-857 i C-1748 w obecności ditiotretolu, DTT

### 5.7.2.1 Analiza chromatograficzna w skali analitycznej

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO], rozcieńczony w wodzie 1:10, końcowe stężenie związków 10 mM
- DTT o stężeniu 20 mM [3,086 mg / 1ml roztworu Tris-HCl
- Roztwór buforowy Tris-HCl
- Roztwór buforowy, RHPLC
- Metanol czystość HPLC

#### Mieszanka reakcyjna

Reakcje w obecności DTT prowadzono w następującym roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

- 10 µl roztworu związku o stężeniu 10 mM w wodzie (0,1 mM)
- 100 µl roztworu DTT w roztworze Tris-HCl (2 mM)
- 890 µl roztworu buforowego Tris-HCl

#### Przebieg doświadczenia

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C w urządzeniu „termoblok” i po upływie określonego czasu inkubacji 50 µl mieszaniny reakcyjnej наносzono na kolumnę analityczną i rejestrowano chromatogram.

#### Analiza HPLC

- **Aparatura**
  1. Chromatograf HPLC 996
  2. Kolumna analityczna i prekolumna
  3. Termoblok
- **Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkami: C-857 i C-1748 przedstawiono w tabeli (układ gradientowy nr 3).

Tabela 40. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności DTT.

UKŁAD GRADIENTOWY NR 3			
Czas (min)	Skład fazy ruchomej w %		
	Metanol	Mrówczan amonu pH~3	Krzywa zmian
0	20	80	-
30	95	5	6
45	20	80	6
50	20	80	10

### 5.7.2.2 Analiza chromatograficzna półpreparatywna i izolacja głównych produktów redukcji związków C-857 i C-1748

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie 1:10, końcowe stężenie związków 10 mM
- DTT o stężeniu 200 mM [3,086 mg / 100 µl roztworu Tris-HCl]
- Roztwór buforowy Tris-HCl
- Roztwór buforowy RHPLC
- Metanol czystość HPLC

#### Mieszanka reakcyjna

Reakcje w obecności DTT prowadzono w następującym roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

- 100 µl roztworu związku o stężeniu 10 mM w wodzie (1 mM)
- 100 µl roztworu DTT w roztworze Tris-HCl (20 mM)
- 800 µl roztworu Tris-HCl

#### Przebieg doświadczenia

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C w urządzeniu „termoblok” i po upływie określonego czasu inkubacji nanoszono 500 µl mieszaniny reakcyjnej na kolumnę preparatywną. Analizę prowadzono w układzie gradientowym nr 4, zbierając jednocześnie poszczególne frakcje pików chromatograficznych z kolumny HPLC. Zebrane frakcje HPLC odparowano, zmniejszając objętość próbki 2-krotnie, a następnie poddano analizie ESI-MS, MS/MS i HR-MS.

#### Analiza HPLC

- **Aparatura**
  1. Chromatograf HPLC 996
  2. Kolumna preparatywna i prekolumna
  3. Termoblok
- **Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkami: C-857 i C-1748 – układ gradientowy nr 4.

*Tabela 41. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności DTT w skali półpreparatywnej.*

<b>UKŁAD GRADIENTOWY NR 4</b>			
<b>Czas (min)</b>	<b>Skład fazy ruchomej w %</b>		
	<b>Metanol</b>	<b>Mrówczan amonu pH~3</b>	<b>Krzywa zmian</b>
	30	70	-
10	80	20	6
35	95	5	6
45	95	5	6
55	30	70	6
60	30	70	10

### 5.7.2.2.1 Analiza wyizolowanych frakcji HPLC metodami spektrometrii mas

#### Analiza ESI-MS

Przed analizą ESI-MS próbki rozcieńczono 2-krotnie roztworem CH<sub>3</sub>OH, a następnie nastrzyknięto 100 µl próbki bezpośrednio do komory jonizacyjnej. Podczas analizy ESI-MS otrzymujemy jony masowe dodatnie lub ujemne w zależności od struktur analizowanych związków. Są to jony masowe [M+1], [M+2], często [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

Analizy ESI-MS przeprowadzono w Laboratorium Chromatografii Cieczowej Katedry Chemii analitycznej PG pod kierunkiem Pani dr inż. Agaty Kot-Wasik (Chromatograf HPLC sprzężony ze spektrometrem mas LC/MSD 1100).

#### Analiza MS/MS (spektrometria tandemowa)

Podobnie jak w przypadku analizy ESI-MS do analizy MS/MS zastosowano próbki rozcieńczone 5-krotnie metanolem i otrzymano widma fragmentacyjne badanych produktów. Badania te przeprowadzono w ramach współpracy z zespołem Prof. Witolda Danikiewicza w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie.

#### Analiza wysokorozdzielczej spektrometrii mas, HR-MS (High Resolution Mass Spectrometry)

Wzór sumaryczny analizowanej substancji obliczano na podstawie wyniku pomiaru masy cząsteczkowej powstających jonów z dokładnością do 5 miejsc znaczących. Uzyskany wynik porównano z masą ustaloną na podstawie tablic Beynon i Williams dostępnych w oprogramowaniu chromatografu typu sprzężonego z analizatorem masy cząsteczkowej, HR Mariner. Wartość różnicy między wartością zmierzoną i obliczoną mieszcząca się w dopuszczalnym zakresie błędu oznaczenia ( $\pm 10$  ppm) pozwoliła przyjąć uzyskany wynik analizy za poprawny. Badania te przeprowadzono w ramach współpracy z zespołem Prof. Witolda Danikiewicza w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie.

### 5.7.2.2.2 Izolacja produktu i analiza NMR

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 o stężeniu 100 mM [0,32 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie 1:10, końcowe stężenie związków 10 mM
- DTT o stężeniu 200 mM [3,086 mg / 100 µl roztworu Tris-HCl]
- Roztwór Tris-HCl (0,16 M)
- Roztwór buforowy, RHPLC
- Metanol, czystość HPLC

#### Mieszanka reakcyjna

Reakcje w obecności DTT prowadzono w roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

- 1 ml roztworu związku o stężeniu 10 mM w roztworze Tris-HCl (1 mM)
- 1 ml roztworu DTT o stężeniu 200 mM w roztworze Tris-HCl (20 mM)
- 8 ml roztworu Tris-HCl

#### Przebieg doświadczenia

W celu podziału produktów reakcji zastosowałam chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych. Fazę stacjonarną stanowił żel typu C-18, na który nanosiłam następujące roztwory w podanej kolejności:

1. 10 ml roztworu CH<sub>3</sub>OH
2. 10 ml roztworu zawierającego (CH<sub>3</sub>OH 15% i HCOONH<sub>4</sub> 85%)

3. 10 ml roztworu mieszaniny reakcyjnej
4. 2x10 ml wody redestylowanej
5. 5 ml roztworu zawierającego CH<sub>3</sub>OH 70% i HCOONH<sub>4</sub> 30%
6. 5 ml roztworu zawierającego CH<sub>3</sub>OH 75% i HCOONH<sub>4</sub> 25%

Rozdzielone produkty redukcji związku C-857 zbierano z kolumny i analizowano ich czystość metodą HPLC nanosząc 50 µl roztworu na kolumnę analityczną, stosując układ gradientowy nr 3. Następnie wybrano frakcje, które poddano analizie NMR. W tym celu odparowano je do sucha, zamrożono i poddano liofilizacji, a następnie rozpuszczono w DMSO. Analizę NMR, w tym także widmo H<sup>1</sup> NMR i eksperymenty NOESY wykonano pod kierunkiem Pana dr inż. Pawła Sowińskiego przy użyciu spektrometru rezonansu jądowego NMR, Varian Unity Plus 500 MHz w Międzyuczelnianym Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądowego AMG, PG, UG. Prowadząc interpretację widm korzystałam z konsultacji z Panem dr inż. Pawłem Sowińskim.

#### ▪ Aparatura

1. Chromatograf HPLC 996
2. Kolumna analityczna i prekolumna
3. Kolumna szklana wypełniona złożem do faz odwróconych typu Lichroprep TMRP-18.
4. Liofilizator, Labconco Freeze dry system, Lyph lock 45
5. Termoblok
6. Spektrometr rezonansu jądowego NMR Varian Unity Plus 500 MHz

### 5.7.2.3 Barwny produkt przemian związku C-857

#### 5.7.2.3.1 Analiza chromatograficzna

##### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 o stężeniu 100 mM [0,32 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie 1:10, końcowe stężenie związków 10 mM
- DTT o stężeniu 200 mM [3,086 mg / 100 µl roztworu Tris-HCl]
- Roztwór buforowy Tris-HCl
- Roztwór buforowy RHPLC
- Metanol, czystość HPLC
- DMSO
- Chlorek metylenu
- Chloroform

Mieszanina reakcyjna została przygotowana identycznie jak w punkcie 5.7.2.1.

##### Przebieg doświadczenia

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C w urządzeniu „termoblok” przez 20 minut a następnie wirowano przez 20 minut, przy 12 tys. obr./min. Uzyskany osad wysuszono w strumieniu powietrza, a następnie rozpuszczono w 100 µl roztworu zawierającego metanol:chloroform (2:1). Otrzymany roztwór w objętości 50 µl nastrzyknięto na kolumnę analityczną i analizowano w układzie gradientowym nr. 3. Wyżej opisaną procedurę powtórzono dwukrotnie stosując dwa inne rozpuszczalniki: a) roztwór DMSO b) roztwór metanolu i chlorku metylenu w proporcjach: 2:1.

##### Analiza HPLC

#### ▪ Aparatura

1. Chromatograf HPLC 996
2. Kolumna analityczna i prekolumna

3. Łaźnia wodna
  4. Aparat do chromatografii na mini kolumnach –VS SPE
  5. Minikolumny
- **Zmiany składu fazy ruchomej**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkiem C-857 – układ gradientowy nr 3.

#### **Identyfikacja produktu o barwie szaro-fioletowej**

Wykonano analizę widm UV-VIS i MS trzech porcji osadu rozpuszczonych w 200  $\mu$ l następujących roztworów: a) DMSO, b) MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1, c) CHCl<sub>3</sub>: MeOH 1:2 i rozcieńczonych metanolem do objętości 500  $\mu$ l. Analizę MS przeprowadzono w Laboratorium Chromatografii Cieczowej Katedry Chemii analitycznej PG pod kierunkiem Pani dr inż. Agaty Kot-Wasik (Chromatograf HPLC sprzężony ze spektrometrem mas LC/MSD 1100)

#### **5.7.2.3.2 Analiza spektrofotometryczna**

##### **Roztwory wyjściowe**

- Roztwór związku C-857 o stężeniu 100 mM [0,32 mg związku / 10  $\mu$ l DMSO] rozcieńczony w wodzie 1:10, końcowe stężenie związków 10 mM
- DTT o stężeniu 200 mM [3,086 mg / 100  $\mu$ l roztworu Tris-HCl]
- Roztwór buforowy Tris-HCl
- Roztwór buforowy RHPLC
- Metanol, czystość HPLC
- Chlorek metylenu

Mieszanina reakcyjna została przygotowana identycznie jak w punkcie 5.7.2.1.

##### **Przebieg doświadczenia**

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C w urządzeniu „termoblok” przez 20 minut, a następnie wirowano przez 20 minut, przy 12 tys. obr./min. Otrzymany osad wysuszono w strumieniu powietrza i rozpuszczono w 200  $\mu$ l roztworu zawierającego dichlorometan i metanol (2:1). Uzyskany roztwór rozcieńczono metanolem do objętości 1 ml i analizowano widmo UV-VIS tego produktu na spektrofotometrze.

##### **▪ Aparatura**

1. Spektrofotometr Cary Bio 300
2. Aparat do chromatografii na minikolumnach –VS SPE
3. Minikolumny

#### **5.7.3 Przemiany pochodnych 1-nitroakrydyny wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych**

##### **Roztwory wyjściowe**

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10  $\mu$ l DMSO], rozcieńczony w wodzie, końcowe stężenie związków 2 mM
- Frakcje ludzkich enzymów mikrosomalnych, H1060 o stężeniu 20 mg/ml
- NADPH o stężeniu 20 mM [16,67 mg NADPH / 1ml H<sub>2</sub>O]
- Roztwór buforowy, MR
- Roztwór buforowy, RHPLC
- Metanol, czystość HPLC

**Mieszanina reakcyjna**

Reakcje w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych prowadzono w następującym roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

- 5 µl roztworu związku o stężeniu 2 mM w wodzie (0,2 mM)
- 5 µl NADPH o stężeniu 20 mM, (2 mM)
- 5 µl enzymów mikrosomalnych o stężeniu 20 mg/ml, (2 mg/ml)
- 35 µl roztworu fosforowego, MR

**Przebieg doświadczenia:**

Rozmrożone w temperaturze pokojowej enzymy mikrosomalne wprowadzono do roztworu o pH 7,4 i po lekkim wytrząsaniu (Vorteks) preinkubowano w temperaturze 37°C w łaźni wodnej przez 5 minut. Następnie dodawano odpowiednią ilość związku i NADPH. Po upływie określonego czasu inkubacji w temperaturze 37°C przebieg reakcji zahamowano dodając do mieszaniny 50 µl schłodzonego metanolu. Po 10 minutach chłodzenia w łaźni z lodem roztwór wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. obr./min. 50 µl supernatantu наносzono na kolumnę analityczną i analizowano w układzie gradientowym nr 5. Mieszaninę HPLC analizowano po wymieszaniu reagentów oraz w różnych odstępach czasu.

**Analiza HPLC****▪ Aparatura**

1. Chromatograf HPLC 996
2. Chromatograf HPLC „Breeze”
3. Kolumna analityczna i prekolumna
4. Łaźnia wodna

**▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkiem C-857 i C-1748 (układ gradientowy nr 5)

*Tabela 42. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych.*

<b>UKŁAD GRADIENTOWY NR 5</b>			
<b>Czas (min)</b>	<b>Skład fazy ruchomej w %</b>		
	<b>Metanol</b>	<b>Mrówczan amonu pH~3</b>	<b>Krzywa gradientu</b>
0	15	85	-
25	80	20	6
28	100	0	6
30	15	85	6
45	15	85	11

**Detekcja pików w analizie HPLC**

Podobnie jak w przypadku biotransformacji pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności szczurzych frakcji mikrosomalnych w obecności ludzkich enzymów do identyfikacji produktów przemian wykorzystano analizę widm UV-VIS oraz ESI-MS, co zostało opisane w punkcie 5.7.1.

## 5.7.4 Przemiany metaboliczne wobec CPR

### 5.7.4.1 Analiza spektrofotometryczna

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie, końcowe stężenie związków 10 mM
- CPR 1U/1 µl
- NADPH o stężeniu 10 mM [8,33 mg NADPH / 1ml roztworu buforowego, RCPR]
- Roztwór buforowy, RCPR

#### Mieszanina reakcyjna

Reakcje w obecności CPR prowadzono w następującym roztworze (stężenia końcowe podano w nawiasach):

Dla C-857:

- 24 µl roztworu C-857 o stężeniu 10 mM (0,2 mM)
- 5 µl CPR o stężeniu 1U/1 µl
- 120 µl roztworu NADPH o stężeniu 10 mM (1 mM)
- Odpowiednia ilość roztworu buforowego RCPR uzupełniająca końcową objętość do 1200 µl

Dla C-1748:

- 24 µl roztworu C-1748 o stężeniu 10 mM (0,2 mM)
- 10 µl CPR o stężeniu 1U/1 µl
- 120 µl roztworu NADPH o stężeniu 10 mM (1 mM)
- Odpowiednia ilość roztworu buforowego RCPR uzupełniająca końcową objętość do 1200 µl

#### Przebieg doświadczenia

Mieszaninę reakcyjną zawierającą związek, reduktazę i roztwór buforu umieszczono w kuwecie i wykonano jej widmo absorbcyjne. Następnie po 5 min preinkubacji mieszaniny w temperaturze 37°C w spektrofotometrze dodano 120 µl NADPH i rejestrowano zmianę widma przez 30 minut w odstępach czasu, co 1 minutę.

#### ▪ Aparatura

Spektrofotometr Cary Bio 300

### 5.7.4.2 Analiza chromatograficzna

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie, końcowe stężenie związków 10 mM
- CPR 1U/1 µl
- NADPH o stężeniu 10 mM [8,33 mg NADPH / 1ml roztworu buforowego, RCPR]
- Roztwór buforowy, RCPR
- Roztwór buforowy, RHPLC
- Metanol, czystość HPLC

#### Mieszanina reakcyjna

Reakcje w obecności CPR prowadzono w następującym roztworze: (stężenia końcowe podano w nawiasach)



Dla C-857:

- 2,4 µl roztworu C-857 o stężeniu 10 mM (0,2 mM)
- 1 µl CPR o stężeniu 1U/1 µl
- 9,6 µl roztworu NADPH o stężeniu 10 mM (0,8 mM)
- Odpowiednia ilość roztworu buforowego RCPR uzupełniająca końcową objętość do 120 µl

Dla C-1748:

- 2,4 µl roztworu C-1748 o stężeniu 10 mM (0,2 mM)
- 2 µl CPR o stężeniu 1U/1 µl
- 12 µl roztworu NADPH o stężeniu 10 mM (1 mM)
- Odpowiednia ilość roztworu buforowego RCPR uzupełniająca końcową objętość do 120 µl

### **Przebieg doświadczenia**

Biotransformację związków wobec reduktazy cytochromu P450, CPR, prowadzono w roztworze buforowym RCPR o pH 7,4. Mieszaninę reakcyjną zawierającą związek, NADPH i roztwór buforu preinkubowano w temperaturze 37°C w łaźni wodnej przez 5 minut po czym dodano roztwór CPR. Po upływie określonego czasu inkubacji w temperaturze 37°C zahamowano przebieg reakcji dodając do mieszaniny 120 µl schłodzonego metanolu. Po 10 minutach chłodzenia w łaźni z lodem roztwór wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. obr./min. 50 µl supernatantu nanoszono na kolumnę analityczną i analizowano bezpośrednio po wymieszaniu reagentów oraz w różnych odstępach czasu w układzie gradientowym nr 6.

### **Analiza HPLC**

#### **▪ Aparat**

1. Chromatograf 996
2. Kolumna analityczna i prekolumna
3. Łaźnia wodna

#### **▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkiem C-857 i C-1748 (układ gradientowy nr 6).

*Tabela 43. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 1-nitroakrydyny w obecności CPR.*

<b>UKŁAD GRADIENTOWY NR 6</b>			
<b>Czas (min)</b>	<b>Skład fazy ruchomej w %</b>		
	<b>Metanol</b>	<b>Mrówczan amonu pH~3</b>	<b>Krzywa gradientu</b>
0	20	80	-
30	95	5	6
45	20	20	6
50	20	20	10

### **Detekcja pików w analizie HPLC**

Do identyfikacji produktów przemian zawartych w pikach chromatograficznych wykorzystano analizę widm UV-VIS oraz ESI-MS, jak w punkcie 5.7.1.



### 5.7.5 Biotransformacja Ledakrinu i związków C-857, C-1748 oraz C-450 wobec wybranych izoform cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie, stężenie końcowe 2 mM
- Roztwór Ledakrinu i związku C-450 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,4; 0,42 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie, stężenie końcowe 2 mM
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450 z wysokim (CYP H) i niskim poziomem reduktazy cytochromu P450 (CYP L)
- NADPH o stężeniu 20 mM [16,66 mg NADPH / 1 ml roztworu RCYP]
- Roztwór buforowy, RCYP
- Roztwór buforowy, RHPLC

#### Mieszana reakcyjna

Reakcje w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 prowadzono w następującym roztworze: (stężenia końcowe podano w nawiasach)

- 5 µl roztworu związku o stężeniu 2 mM (0,2 mM)
- 5 µl roztworu NADPH o stężeniu 20 mM (2 mM)
- objętość izoenzymu cytochromu P450 zależna od wyjściowego stężenia białka podana w tabeli 44 (50, 200 pmoli/ml)
- roztwór buforowy RCYP do objętości końcowej 50 µl.

Tabela 44. Objętość izoenzymów cytochromu P450 o niskim (L) lub wysokim (H) poziomie CPR.

Rodzaj izoenzymu cytochromu P450	Objętość dodawanego enzymu w zależności od stężenia	
	50 pmol/ml	200 pmol/ml
1A2-H	1,19 µl	4,76 µl
1A2-L	1,52 µl	6,09 µl
2C19-H	2,55 µl	10,2 µl
2C19-L	1,74 µl	6,96 µl
3A4-H	1,74 µl	6,96 µl
3A4-L	2,23 µl	8,92 µl

#### Przebieg doświadczenia

Rozmrożone w temperaturze pokojowej izoenzymy cytochromu P450 wprowadzono do roztworu buforowego RCYP o pH 7,4 i po lekkim wytrząsaniu (Vorteks) preinkubowano ze związkiem przez 5 minut w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Następnie dodano odpowiednią ilość NADPH. Po upływie określonego czasu inkubacji w temperaturze 37°C przebieg reakcji zahamowano dodając do mieszaniny 50 µl schłodzonego metanolu. Po 10 minutach chłodzenia w łaźni z lodem roztwór wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. obr./min. Supernatant nanoszono w ilości 50 µl na kolumnę analityczną po czym analizowano bezpośrednio po wymieszaniu reagentów oraz w różnych odstępach czasu w układzie gradientowym nr 7.

#### Analiza HPLC

##### ▪ Aparatura

Jak w punkcie 5.7.4.2.

### ▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC

Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej po inkubacji ze związkiem C-857 i C-1748 (układ gradientowy nr 7)

Tabela 45. Zmiany składu fazy ruchomej podczas przemian pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności izoenzymów cytochromu P450.

UKŁAD GRADIENTOWY NR 7			
Czas (min)	Skład fazy ruchomej w %		
	Metanol	Mrówczan amonu pH~3	Krzywa gradientu
	15	85	-
25	80	20	6
28	100	0	6
30	15	85	6
40	15	85	10

### Detekcja pików w analizie HPLC

Do identyfikacji produktów przemian zawartych w pikach chromatograficznych wykorzystano analizę widm UV-VIS oraz ESI-MS, jak w punkcie 5.7.1.

### 5.7.6 Biotransformacja związków C-857 i C-1748 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych z zastosowaniem tzw. Reaction Phenotyping Kit, RPK

#### Roztwory wyjściowe

- Roztwór związku C-857 i C-1748 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33 mg związku / 10 µl DMSO] rozcieńczony w wodzie, stężenie końcowe 2mM
- enzymy mikrosomalne zawarte w RPK, 20 mg/ml (pkt. 5.3)
- NADPH o stężeniu 20 mM [16,66 mg NADPH / 1ml roztworu RM]
- Roztwór buforowy, RM
- Roztwór buforowy, RHPLC

Podczas badania przemian związków C-857 i C-1748 wobec RPK zastosowałam warunki identyczne jak w punkcie 5.7.3. (mieszanina reakcyjna, przebieg doświadczenia i układ gradientowy).

### 5.7.7 Przemiany pochodnych 1-nitroakrydyny wobec mysich enzymów mikrosomalnych z prawidłowym WT i obniżonym, HRN poziomem ekspresji genu NADPH-reduktazy cytochromu P450

#### 5.7.7.1 Izolacja frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy

Izolacja frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy została wykonana na podstawie procedury otrzymanej od dr Colina Hendersona z Biomedical Research Centre w Dundee, Szkocja.

### **Roztwory do izolacji**

Skład roztworów wykorzystanych do izolacji frakcji mikrosomalnej z komórek wątroby myszy został podany w punkcie 5.5.

- Roztwór A
- Roztwór B
- Roztwór C

### **Przebieg doświadczenia**

Zamrożona wątroba mysia została zważona i dwukrotnie wypłukana roztworem A w objętości równej trzykrotnej objętości wagowej wątroby (ok. 3 ml). Następnie pociętą na kawałki i zawieszoną w buforze B wątrobę, poddano homogenizacji i wirowano w przez 20 minut przy 11 tys rpm w temperaturze 4°C. Osad odrzucono, a supernatant wirowano przez 80 minut przy 45 tys. rpm. w 4°C w wyniku czego otrzymano frakcję cytozolową i pelet białek, które w kolejnym etapie poddano ręcznej homogenizacji i wirowaniu przez 60 minut przy 45 tys. rpm. w temperaturze 4 °C. Uzyskany pelet zawieszono w roztworze C i przechowywano w temperaturze 4°C.

#### **▪ Aparatura**

1. Homogenizator
2. Wirówka XL-70 Ultracentrifuge, rotor NVTi65,

### **5.7.7.2 Oznaczanie stężenia białka w enzymach mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy.**

Stężenie białka we frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z komórek wątroby myszy określono według metody Bradford.

### **Roztwory wyjściowe**

- Enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby myszy dzikiego typu, WT i z nokautem genu CPR, myszy HRN [11 i 20 mg/ml]
- Odczynnik Bradford
- Woda redestylowana
- Roztwór BSA 1 mg/ml, bydlęca albumina płodowa, Sigma Chemical Co., USA

### **Mieszanka reakcyjna**

- 1 µl frakcji enzymów mikrosomalnych
- 200 µl odczynnik Bradford
- 799 µl woda redestylowana
- roztwór BSA do krzywej wzorcowej

### **Przebieg doświadczenia**

W celu wyznaczenia stężenia białka do mieszaniny enzymów mikrosomalnych i wody dodano odczynnik Bradford i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie po wymieszaniu (Vorteks) zmierzono absorbancję przy długości fali 595 nm i na podstawie krzywej wzorcowej BSA przygotowanej w zakresie stężeń (0-100) µg/ml wyznaczono stężenie białka.

#### **▪ Aparatura**

Spektrofotometr

**5.7.7.3 Inkubacja enzymów ze związkami C-857, C-1748, C-450 oraz z Ledakrinem****Roztwory wyjściowe**

- Roztwór związku C-857, C-1748 i C-450 o stężeniu 100 mM [odpowiednio 0,32; 0,33, 0,41 mg związku / 10  $\mu$ l DMSO] rozcieńczony w wodzie, stężenie końcowe 2 mM
- Roztwór Ledakrinu o stężeniu 2 mM [0,4 mg związku / 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O]
- Enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby myszy dzikiego typu, WT (11 mg/ml) i HRN (20 mg/ml)
- NADPH o stężeniu 20 mM [16,66 mg NADPH / 1ml roztworu fosforanu sodu, RM]
- Roztwór buforowy, RM
- Roztwór buforowy RHPLC

**Mieszanina reakcyjna**

Reakcje w obecności enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy typu dzikiego, WT i HRN prowadzono w następującym roztworze: (stężenia końcowe podano w nawiasach)

- 5  $\mu$ l roztworu związku o stężeniu 2 mM (0,2 mM)
- 5  $\mu$ l roztworu NADPH o stężeniu 20 mM (2 mM)
- enzymy mikrosomalne WT i HRN (2 mg/ml), objętość podana w tabeli 53
- roztwór buforowy, RM do objętości końcowej 50  $\mu$ l.

Tabela 46. Objętość zawiesiny enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy.

Frakcja mikrosomalna komórek wątroby	Stężenie białka w reakcji [mg/ml]	Objętość zawiesiny białka [ $\mu$ l]
Typ dziki, WT	2	9,1
HRN	2	5

**Przebieg doświadczenia**

Rozmrożone w temperaturze pokojowej enzymy mikrosomalne wprowadzono do roztworu buforowego RM o pH 7,4 i po lekkim wytrząsaniu (Vorteks) preinkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Następnie dodawano odpowiednią ilość związku i NADPH. Po upływie określonego czasu inkubacji w temperaturze 37°C przebieg reakcji zahamowano dodając do mieszaniny 50  $\mu$ l schłodzonego metanolu. Po 10 minutach chłodzenia w łaźni z lodem roztwór wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. obr./min. Supernatant nanoszono w ilości 50  $\mu$ l na kolumnę suplex pKb-100 (Supelco). Mieszaninę HPLC analizowano bezpośrednio po zmieszaniu reagentów oraz w różnych odstępach czasu w układzie gradientowym nr 7.

**Analiza HPLC****▪ Aparatura**

1. Chromatograf HPLC 996
2. Kolumna analityczna i preparatywna
3. Łaźnia wodna – FisherBrand

**▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Podczas analizy HPLC mieszaniny reakcyjnej zastosowano identyczny skład fazy ruchomej jak podczas badania przemian pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (układ gradientowy nr 7).

**Detekcja pików w analizie HPLC**

Do identyfikacji produktów przemian zawartych w pikach chromatograficznych wykorzystano analizę widm UV-VIS oraz ESI-MS, jak w punkcie 5.7.1.

**5.7.8 Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, hepatoma, HepG2****5.7.8.1 Hodowla komórek HepG2**

Hodowlę komórek ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2 prowadzono w pożywce MEM (pkt. 5.4.) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (10%) i antybiotykami: streptomycyną i penicyliną. Komórki rosły w postaci monowarstwy w temperaturze 37°C w 5% atmosferze CO<sub>2</sub> i 95% wilgotności w inkubatorze NUAIRE. Komórki pasażowane były dwa razy w tygodniu po 2 mln komórek i hodowane w 20 ml pożywki. Dodatkowo, co trzy dni wymieniano pożywkę na świeżą. Czas podwojenia komórek w warunkach hodowli *in vitro* wynosił ok. 32 godziny.

**▪ Aparatura**

1. Inkubator do hodowli komórek NUAIRE
2. Licznik komórek, Coulter, Beckman Z1
3. Wyciąg laminarny Labgard Class II laminar flow

**5.7.8.2 Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec komórek nowotworowych HepG2 metodą MTT****Roztwory wyjściowe**

- Roztwory: Ledakrinu, związku C-857 i C-1748 o stężeniach 20mM [odpowiednio 0,8, 0,64; 0,66 mg związku / 100 µl C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH]
- roztwór MTT w wodzie (4 mg/ ml)
- DMSO 2ml / 20 tys komórek
- Etanol

**Mieszanka reakcyjna**

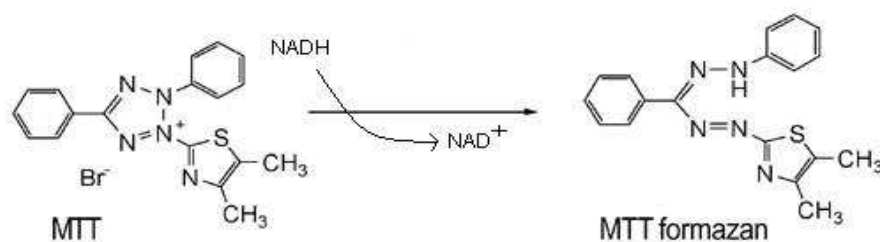
Badanie aktywności cytotoksycznej pochodnych 1-nitroakrydyny prowadzono przy następujących stężeniach: (0,0001, 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 µM) na płytkach 24-studzienkowych

Każda studzienka zawierała:

- 20 tys. komórek
- 50 µl roztworu związku o stężeniu 100 razy wyższym (CX100)
- 2 ml pożywki do hodowli komórek
- 50 µl roztworu 50% etanolu do komórek kontrolnych

**Przebieg doświadczenia**

W celu ilościowego określenia aktywności cytotoksycznej badanych związków wobec komórek ludzkiego nowotworu wątroby HepG2, posłużono się metodą opartą na zdolności oksydoredukcyjnej mitochondriów z wykorzystaniem odczynnika MTT.



Rys. 212. Schemat redukcji MTT do formazanu.

Test MTT oparty jest na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej komórek do redukcji rozpuszczalnego w wodzie roztworu MTT (kolor żółty) do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu (kolor fioletowy). Zdolność tą wykazują tylko żywe komórki, dlatego test ten pozwala na określenie populacji komórek żywych.

Komórki wysiewano na płytkę 24-studzienkową w ilości 20 tys./ 2 ml pożywki na studzienkę. Komórki preinkubowano przez 24 godziny (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aby umożliwić ich przyklejenie do podłoża, po czym dodano po 20 µl roztworu badanego związku (po dwie studzienki na każde stężenie związku), w zakresie stężeń końcowych: (0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10, 50) Do komórek kontrolnych tzn. nietraktowanych związkiem dodawano 20 µl 50% alkoholu etylowego. Komórki inkubowano ze związkiem przez 72 godziny w inkubatorze Nuair (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), po czym dodano 200 µl wodnego roztworu MTT do każdej studzienki. Po 4 godzinach inkubacji usunięto supernatant z nadkryształów wytrąconego formazanu, dodano po 2 ml DMSO do każdej studzienki. Płytkę z komórkami łagodnie mieszano przez 30 minut na wytrząsarce orbitalnej, aby rozpuścić kryształy formazanu, po czym 200 µl roztworu z każdej studzienki przeniesiono do dwóch nowych studzienek na płytce 96 studzienkowej. Absorbancję roztworów w studzienkach mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm, przy użyciu czytnika płytek DigiScan firmy Asys Hitech. Na podstawie uzyskanych wyników wyliczono procent zahamowania wzrostu komórek HepG2 w obecności Ledakrinu oraz związków C-857 i C-1748, przyjmując absorbancję roztworu uzyskanego dla komórek kontrolnych za 100%. Następnie sporządzono wykres zależności zahamowania wzrostu komórek HepG2 (% kontroli) w zależności od logarytmu stężenia badanych pochodnych. Z uzyskanych równań fragmentów prostoliniowych, przedstawiających zależność zahamowania wzrostu komórek HepG2 od logarytmu stężenia związku, wyliczono wartości stężenia EC<sub>50</sub> pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, tj. stężeń, przy których proliferacja komórek HepG2 została zahamowana w 50%.

#### ▪ Aparatura

Aparatura zastosowana jest identyczna jak w punkcie 5.7.8.1.

### 5.7.8.3 Izolacja metabolitów z komórek HepG2 traktowanych Ledakrinem, związkiem C-857 i C-1748

#### 5.7.8.3.1 Metoda ekstrakcji metabolitów roztworem metanolu

##### Roztwory wyjściowe

- Roztwory: Ledakrinu, związku C-857 i C-1748 o stężeniu 20 mM [odpowiednio 0,8, 0,64; 0,66 mg związku / 100 µl C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH]
- Odczynniki do hodowli komórek str. 200
- Roztwór PBS-u 2 x 4 ml na płytkę
- Etanol 50%
- Metanol 60%
- Roztwór buforowy, RHPLC



**Mieszanka reakcyjna**

- Komórki HepG2 wysiane po  $2 \times 10^6$  na 5 ml płytkę Petriego
- 50  $\mu$ l roztworu związku o stężeniu 10 i 20 mM na 5 ml pożywki (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M)
- pożywka MEM 5 ml na płytkę Petriego

**Przebieg doświadczenia**

Do izolacji metabolitów zastosowano metodę ekstrakcji 60% roztworem metanolu w połączeniu z sonifikacją w łaźni ultradźwiękowej [143,144]. Komórki HepG2 ( $2 \times 10^6$ ) hodowano w 5 ml pożywki na płytce Petriego przez 24 godziny w inkubatorze Nuair w temperaturze 37°C 95% wilgotności i 5% CO<sub>2</sub> (preinkubacja), po czym dodano 50  $\mu$ l badanego związku o stężeniu 10, 20 mM na określony czas inkubacji (stężenie końcowe wynosiło 100 i 200  $\mu$ M). Do komórek kontrolnych dodano 50  $\mu$ l 50% etanolu. Po zakończeniu inkubacji płytki z komórkami wyjęto z inkubatora, usunięto pożywkę i komórki przemyło 2-krotnie 4 ml zimnego roztworu PBS-u o, a następnie zdrapano scraperem z płytek w obecności 0,8 ml, 60% schłodzonego roztworu metanolu. Otrzymaną zawiesinę komórek przeniesiono do probówek wirówkowych i poddano sonifikacji (150 W, 15 min), po czym wirowano przez 15 minut przy 13 tys. rpm/ min. Uzyskany supernatant wysuszono w strumieniu powietrza i ponownie zawieszono w 200  $\mu$ l metanolu, a następnie analizowano techniką HPLC.

**Analiza HPLC****▪ Aparat**

1. Chromatograf HPLC 996
2. Kolumna analityczna i prekolumna
3. Inkubator do hodowli komórek NUAIRE
4. Licznik komórek, Coulter, Beckman Z1
5. Wyciąg Laminarny
6. Wirówka CENTRIFUGE 5810
7. Łaźnia ultradźwiękowa

**▪ Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zastosowano identyczny skład fazy ruchomej (układ gradientowy nr 7), oraz metodę identyfikacji pików chromatograficznych, jak podczas badania przemian pochodnych 1-nitroakrydyny wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 i enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy.

**5.7.8.3.2 Metoda ekstrakcji mieszaniną CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH****Roztwory wyjściowe**

- Roztwory: Ledakrinu, związku C-857 i C-1748 o stężeniu 1 mM [odpowiednio 0,4, 0,32; 0,33 mg związku / 1 ml C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH]
- Odczynniki do hodowli komórek str 200
- Roztwór PBS-u 2 x 4 ml na płytkę
- Etanol 50%
- Roztwór CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Roztwór buforowy RHPLC

**Mieszanka reakcyjna**

- $2 \times 10^6$  komórek HepG2 hodowane na płytce Petriego
- 50  $\mu$ l roztworu związku o stężeniu 10, 100 i 500  $\mu$ M na 5 ml pożywki [0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M 5  $\mu$ M]
- 5 ml pożywki

**Przebieg doświadczenia**

Do izolacji metabolitów zastosowano metodę ekstrakcji mieszaniną  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  w proporcjach (2:1) [145].

Komórki HepG2 ( $2 \times 10^6$ ) hodowano w 5 ml pożywki na płytce Petriego przez 24 godziny w inkubatorze Nuair w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  95% wilgotności i 5%  $\text{CO}_2$  (preinkubacja), po czym dodano 50  $\mu\text{l}$  badanego związku o odpowiednim stężeniu 10, 100 i 500  $\mu\text{M}$  na 12, 24 i 48 godzin inkubacji (stężenie końcowe wynosiło 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  5  $\mu\text{M}$ ). Do komórek kontrolnych dodano 50  $\mu\text{l}$  50% roztworu etanolu. Po zakończeniu inkubacji płytki z komórkami wyjęto z inkubatora, usunięto pożywkę i przemyto komórki 2-krotnie 4 ml zimnego roztworu PBS-u, a następnie odklejono od podłoża za pomocą roztworu trypsyny (0,8 ml). Komórki rozpipetowano, przeniesiono do probówki wirówkowej i wirowano przez 5 min w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przy 1000 obr./min. Supernatant odrzucono, a do peletu komórek dodano 4 ml roztworu PBS-u i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu do komórek dodano 1 ml roztworu PBS-u i poddano sonifikacji (150 W, 1 min) [145]. Następnie do uzyskanej zawiesiny dodano mieszaninę  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  w proporcjach (2:1) i intensywnie mieszano (Vorteks). W ten sposób uzyskano dwie rozdzielone warstwy. Za pomocą strzykawki zebrano frakcję organiczną i poddano ją suszeniu w strumieniu azotu. Po wysuszeniu osad rozpuszczono w 250  $\mu\text{l}$  roztworu metanolu i analizowano techniką HPLC.

**Analiza HPLC**

Zastosowałam identyczną aparaturę jak w punkcie 5.7.8.3.1.

- **Zmiany składu fazy ruchomej podczas analizy HPLC**

Zastosowano identyczny skład fazy ruchomej (układ gradientowy nr 7), oraz metodę identyfikacji pików chromatograficznych jak w punkcie 5.7.5.

#### **5.7.8.4 Obserwacje komórek HepG2 traktowanych pochodnymi 1-nitroakrydyny przy zastosowaniu techniki mikroskopii**

**Roztwory wyjściowe**

- Roztwory: Ledakrinu, związku C-857 i C-1748 o stężeniu 20 mM [odpowiednio 0,8, 0,64; 0,66 mg związku / 100  $\mu\text{l}$   $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ]
- Odczynniki do hodowli komórek str 200
- Roztwór PBS-u do płukania komórek

**Przebieg doświadczenia**

Zmiany morfologiczne komórek HepG2 obserwowałam po: 1, 2, 3, 6, 12, godzinnej inkubacji z Ledakrinem, związkiem C-857 i związkiem C-1748 o stężeniu 200  $\mu\text{M}$ .

Komórki HepG2 wysiewano na płytce Petriego w ilości 0,5 mln. w 5 ml pożywki i poddawano 24 godzinnej preinkubacji w inkubatorze Nuair ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  i 95% wilgotności), po czym dodano 50  $\mu\text{l}$  badanego związku o stężeniu 200  $\mu\text{M}$  i kontynuowano inkubację w przedziale czasu od 3 do 12 godzin. Po określonym czasie inkubacji zebrano pożywkę z płytki Petriego i przenosiono do probówki wirówkowej, natomiast monowarstwę komórek przemyto 1 ml roztworu PBS-u i odklejono od podłoża roztworem trypsyny (2 ml/ na płytkę). Zawiesinę komórek wraz z pożywką wirowano przez 5 minut w  $4^\circ\text{C}$  1000 obr./ min., a następnie dodano 5 ml zimnego roztworu PBS-u i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Ostatni etap powtarzano 3-krotnie. Po ostatnim wirowaniu usunięto supernatant, a komórki zawieszono w 200  $\mu\text{l}$  roztworu PBS-u, rozpipetowano i 20  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek naniesono na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Preparat komórkowy bezpośrednio po wykonaniu obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX60 w zakresie światła widzialnego. Zdjęcia preparatów wykonano przy powiększeniu 40 i 60 krotnym.

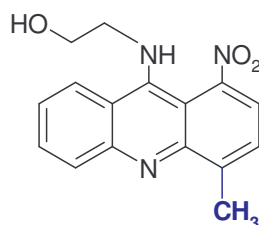


▪ **Aparatura**

1. Chromatograf HPLC 996
2. Kolumna analityczna i prekolumna
3. Inkubator do hodowli komórek NUAIRE
4. Licznik komórek, Coulter, Beckman Z1
5. Wyciąg laminarny
6. Wirówka CENTRIFUGE 5810
7. Łaźnia ultradźwiękowa
8. Cytowirówka, „Cytofuge 2”
9. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60

## 6. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI

Celem badań prezentowanych w niniejszej pracy było z jednej strony poznanie molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej i zróżnicowanej toksyczności. Z drugiej strony zmierzałam do określenia udziału w metabolizmie tych związków wybranych enzymów zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby zwierząt i ludzi próbując tym samym znaleźć selektywność w szlaku przemian metabolicznych związków: C-857 i C-1748. Jak przedstawiono na rys. 213 struktury chemiczne tych związków różniły się między sobą obecnością grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny.



Rys. 213. Struktury chemiczne związków: C-857 (Capridine  $\alpha$ ) i C-1748 (Capridine  $\beta$ ).

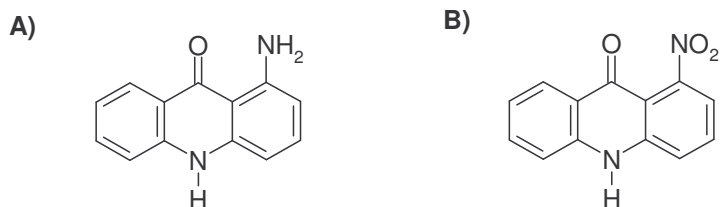
Obserwując przemiany enzymatyczne wobec białek mikrosomalnych różnego pochodzenia stwierdziłam, że związki te były bardziej reaktywne wobec szczurzych, niż wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych i znacznie mniej reaktywne w obecności enzymów wyizolowanych z komórek wątroby myszy. Wynik ten bardzo jasno potwierdził znane z literatury różnice w zdolności do przemian metabolicznych związków w obecności białek enzymatycznych występujących u różnych gatunków ssaków. Jednocześnie wynik ten wskazał, że w celu poznania przemian badanych związków, jakie mogą zachodzić w organizmie człowieka dalsze badania metabolizmu należy prowadzić w obecności enzymów pochodzenia ludzkiego.

Badania przemian enzymatycznych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny prowadzone były wcześniej dla Ledakrinu wobec enzymów mikrosomalnych i oksydazy ksantynowej. Natomiast dla związków: C-857 i C-1748 i innych analogów o zróżnicowanej strukturze chemicznej także wobec DT-diaforazy, która katalizuje 2-elektronową redukcję. Te ostatnie badania po raz pierwszy wskazały, że istnieje różnica w podatności na transformację enzymatyczną pomiędzy związkami różniącymi się obecnością grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny. [132,133]. Wiadomo było też, że elektrochemiczny potencjał red-ox grupy nitrowej obniżał się w obecności grupy metylowej [149]. W ramach niniejszej pracy wykazałam, że związek C-857 jest bardzo reaktywny

wobec ludzkich i szczurzych enzymów mikrosomalnych. Już po 30 minutach reakcji roztwór mieszaniny reakcyjnej zmieniał barwę z żółtej na szarofioletową, a na chromatogramie obserwowałam, co najmniej 7 pików produktów. Natomiast inkubacja pochodnej C-1748 zawierającej grupę metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny przez kilka godzin prowadziła do częściowego przereagowania substratu i powstania tylko trzech głównych produktów. Tym samym potwierdziłam słuszność postawionej wstępnie hipotezy o obniżonej zdolności do metabolizmu pochodnej o niższej toksyczności.

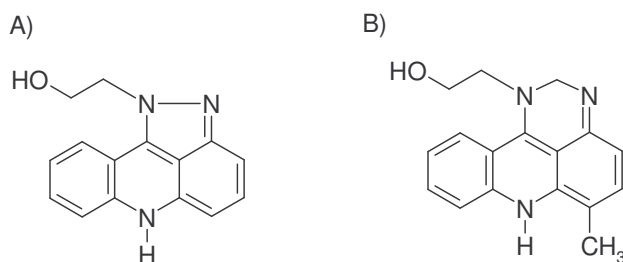
W celu określenia struktur chemicznych otrzymanych w badanych reakcjach metabolitów pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny zbadalam przemiany obu tych związków wobec łagodnego chemicznego reduktora – ditiotreitolu (DTT), który wykazuje jednocześnie silne właściwości nukleofilowe. Zastosowanie tego odczynnika wynikało z wcześniejszych wyników badań, podczas których wykazano, że identyczne addukty związku C-857 z DNA powstają zarówno w obecności enzymów mikrosomalnych, jak w obecności DTT [130]. Zgodnie z danymi prezentowanymi powszechnie w literaturze redukcja aromatycznych związków nitrowych prowadzi do powstania nie tylko amin aromatycznych, ale również pochodnych: nitrozoaminy, hydroksyloaminy. Reakcje te zachodzą m.in. podczas reakcji redukcji związków przeciwnowotworowych takich jak pochodne: nitroimidazolu i pyrazoloakrydyny [150-153].

Przemiany badanych w niniejszej pracy pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w obecności DTT prowadziły do powstania trzech grup produktów. Jedną z nich to pochodne akrydonu: 1-nitroakrydon i 1-aminoakrydon. (rys. 214). 1-Nitroakrydon obserwowałam tylko w niskim stężeniu i głównie po kilkugodzinnej inkubacji związku C1748 czyli był to produkt hydrolizy łańcucha bocznego. 1-Aminoakrydon jest prawdopodobnie trwałym końcowym produktem redukcji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, który powstaje w wysokim stężeniu podczas przemian pochodnej C-857, a w bardzo niskim stężeniu podczas przemian związku C-1748. Wykazano wcześniej, że odszczepienie łańcucha bocznego w Ledakrinie i innych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, w nieobecności związków tiolowych, następuje dopiero po kilku godzinach hydrolizy w wysokiej temperaturze w roztworze o niskim pH. Zatem obserwowane w warunkach redukcyjnych powstawanie ugrupowania karbonylowego w pozycji 9 pierścienia akrydyny nie jest następstwem hydrolizy [129]. Z badań tej reakcji prowadzonej przez M. Koniecznego z zastosowaniem związku znakowanego izotopowo wynika, że atom tlenu w pozycji 9 pierścienia akrydyny w 1-aminoakrydonie pochodzi z grupy nitrowej znajdującej się w pozycji 1 tego pierścienia, a nie z cząsteczki wody atakującej atom azotu. Prawdopodobnie w przypadku pochodnej z grupą metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny taki mechanizm jest utrudniony.



Rys. 214. Struktury chemiczne metabolitów: A) 1-aminoakrydon i B) 1-nitroakrydon.

Do drugiej grupy produktów przemian pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny obserwowanych w łagodnych warunkach redukcyjnych należą związki powstające w wyniku zamknięcia dodatkowego pierścienia między sąsiadującymi ze sobą atomami azotu w pozycji 1 i 9 cząsteczki akrydyny.



Rys. 215. Struktury chemiczne: A) produktu związku C-857 z dodatkowym pierścieniem pięcioczołowym, **D4** i B) metabolitu związku C-1748 z pierścieniem sześcioczołowym, **D4'**.

Można przyjąć hipotezę, że zamknięcie dodatkowego pierścienia następuje w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji pomiędzy grupą aminową i nitrową. Podobnie jak powstawanie 1-aminoakrydonu, reakcja ta jest możliwa w łagodnych warunkach redukcyjnych, gdzie redukcji może ulegać grupa nitrowa. Należy przypuszczać, że jest to główny powód, dla którego w tej reakcji nie obserwujemy klasycznych produktów redukcji grupy nitrowej – pochodnych: hydroksyloaminy i nitrozoaminy, chociaż w przypadku mniej reaktywnego związku C-1748 obserwujemy metabolit D1', którego struktura może odpowiadać pochodnej N-hydroksyloaminy. Trudnym do wyjaśnienia jest fakt obecności pięcioczołowego pierścienia dla związku C-857 i sześcioczołowego dla C-1748. Być może jest to związane z reaktywnością grupy nitrowej. Bardziej reaktywny atom azotu w pozycji 1 związku C-857 może szybciej zamykać pierścień reagując bezpośrednio z drugim atomem azotu a dla słabiej reaktywnej grupy nitrowej związku C-1748 dodatkowy atom węgla zostaje włączony pomiędzy atomami azotu. Ten dodatkowy atom. podatny na atak nukleofilowy może pochodzić np. z aldehydu mrówkowego, który powstaje w wyniku utleniania składnika roztworu buforowego, tris(hydroksymetylo)-aminometanu, w reakcji typu Fenton [146].

Trzecia grupa produktów powstających w obecności DTT to produkty podstawienia, w których do pierścienia przyłącza się cała cząsteczka ditiotreitolu. W przypadku C-857 powstawało kilka takich produktów, natomiast podczas przemiany związku C-1748 tylko jeden. Różnica ta ma istotne konsekwencje biologiczne. Związek o niższej podatności na

atak nukleofilowy prawdopodobnie może być również słabiej podatny na atak innych biologicznie ważnych nukleofili, jak grupy aminowe z cząsteczki DNA czy białek. W konsekwencji, uszkodzenia ważnych biomolekuł w komórce będą w przypadku C-1748 znacznie słabsze. Fakt ten może być bezpośrednią przyczyną ograniczonej toksyczności związku C-1748 w badaniach na zwierzętach. W tym miejscu należy też zwrócić uwagę, że podatność badanych cząsteczek akrydyny na atak nukleofilowy jest ściśle związana z jednoczesną redukcją grupy nitrowej prowadzącą do zmiany charakteru pierścienia aromatycznego tej cząsteczki. Aktywowany na podstawienie elektrofilowe pierścień akrydyny z grupą nitrową lub nitrozową zmienia swój charakter podczas reakcji redukcji i staje się pochodną podatną na podstawienie nukleofilowe zawierającą w pozycji 1 grupę aminową lub hydroksyloaminową.

Na podstawie porównania z produktami redukcji z DTT zaproponowałam struktury metabolitów C-857 i C-1748 powstających wobec mieszaniny szczurzych enzymów mikrosomalnych. W przypadku C-1748 były to trzy produkty: P1' ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej, P4' o strukturze 1-amino-4-metyloakrydonu oraz P3' z dodatkowym pierścieniem sześcioczołowym. W przypadku związku C-857 udało się zidentyfikować tylko dwa spośród czterech metabolitów. Były to: 1-aminoakrydon (P6) i produkt P1 ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej. Dwa następne produkty metabolizmu związku C-857 powstające w obecności enzymów mikrosomalnych, a nie obserwowane z DTT to metabolity z dodatkowym pierścieniem sześcioczołowym: produkt P3 posiadający zachowany łańcuch boczny oraz P4 pozbawiony tego łańcucha.

Znalezione dotychczas różnice w reaktywności związków C-857 i C-1748 skłoniły mnie do głębszego zbadania metabolizmu tych pochodnych w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych. Głównym składnikiem enzymów mikrosomalnych są izoenzymy cytochromu P450 i współpracująca z nimi reduktaza cytochromu P450. Prowadząc badania biotransformacji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec tych enzymów poszukiwałam selektywności w metabolizmie obu związków. Porównanie produktów metabolizmu związku C-857 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych oraz ludzkiej rekombinantowej reduktazy P450 dało zaskakujący wynik. Wszystkie produkty otrzymane w tych układach enzymatycznych były identyczne. Natomiast w przypadku związku C-1748 dwa metabolity z trzech powstających w obecności reduktazy P450 były identyczne, jak w obecności enzymów mikrosomalnych. Istotna rola reduktazy w przemianach obu badanych związków widoczna była także podczas ich przemian wobec izoenzymów cytochromu P450 z podwyższonym poziomem reduktazy cytochromu P450. Wyniki te pozwalają stwierdzić, że w metabolizmie związków C-857 i C-1748 reduktaza nie pełni roli pomocniczej, ale jest kluczowa dla ich metabolizmu. Wniosek ten potwierdziły moje dalsze wyniki badań metabolizmu tych związków wobec

enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy dzikiego typu i z nokautem genu kodującego reduktazę cytochromu P450, które wykazały, że stężenie powstających metabolitów było bardzo niskie w obecności enzymów mikrosomalnych pozbawionych reduktazy P450. Przy czym rola reduktazy jest znacząca głównie w przemianach pochodnej C-857, natomiast obecność grupy metylowej w pochodnej C-1748 ogranicza tą rolę.

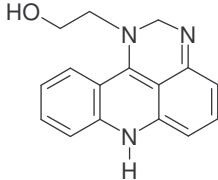
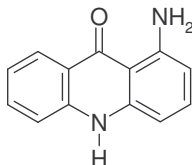
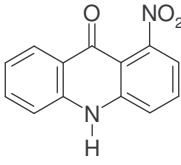
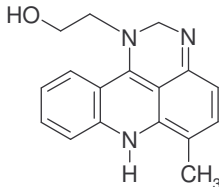
Dodatkowo, badania metabolizmu w obecności rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 wykazały, że związek C-1748 jest również znacznie mniej reaktywny, niż jego analog, pozbawiony tej grupy, C-857, co prezentują wyniki w tabeli 47 A, B.

Tabela 47. Produkty metabolizmu związków C-857 i C-1748 wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 wraz ze strukturami chemicznymi.

A)

Izoenzymy cytochromu P450	C-857	C-1748
CYP1A2 H i L	C2- brak w CYP1A2L C3 C7	-
CYP2C19 H i L	C2, C3, C7	C3'
CYP3A4 H i L	C2, C3, C7, C7a	C3'

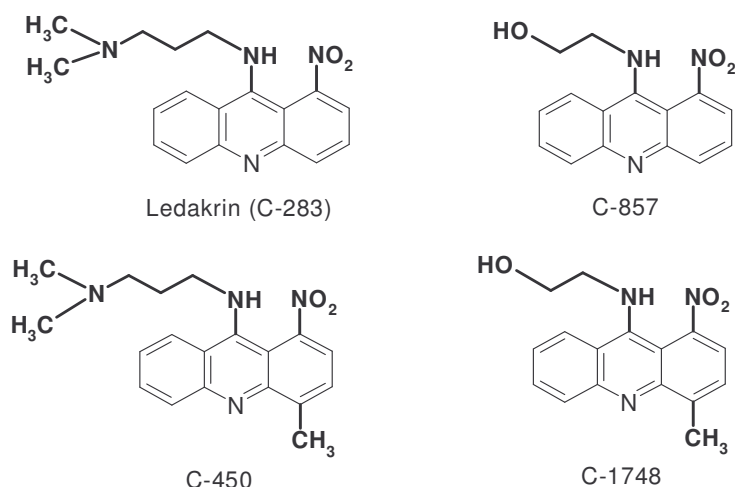
B)

Struktury chemiczne metabolitów			
Metabolity C-857	<p>C3</p> 	<p>C7</p> 	<p>C7a</p> 
Metabolit C-1748	<p>C3'</p> 		

Związek C-857 metabolizował w obecności wszystkich badanych izoenzymów, w wyniku czego powstawały 3 główne metabolity. Natomiast w przemianach pochodnej C-1748 istotną rolę odgrywał izoenzym CYP2C19. Główny produkt powstający w tej reakcji, jak również w obecności CYP3A4 to metabolit C3' posiadający dodatkowy pierścień sześciocłonowy. Warto też podkreślić, iż podczas przemian związku C-1748 w obecności izoenzymów rekombinantowych nie powstawały pochodne akrydonu:

1-amino i 1-nitroakrydon, co stanowi istotną różnicę pomiędzy biotransformacją związków C-857 i C-1748. W świetle różnic międzyosobniczych w ekspresji genów izoenzymów P450, może to być istotny punkt selektywności działania obu związków oparty na ich metabolizmie.

Niższa reaktywność związku C-1748 w badanych dotychczas reakcjach metabolizmu skłoniła mnie do głębszej analizy roli grupy metylowej w metabolizmie pochodnych 1-nitroakrydyny. W tym celu do zestawu badanych pochodnych dołączyłam dwa związki o zmienionej strukturze łańcucha bocznego: ledakrin i związek, C-450 (rys. 216) i porównałam ich reaktywność wobec rekombinantowych izoenzymów P450. Podsumowanie wyników zebrałam w tabeli 48.



Rys. 216. Struktury chemiczne badanych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

Tabela 48. Produkty pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu.

	Związki z łańcuchem dimetyloaminopropylaminowym		Związki z łańcuchem hydroksyetyloaminowym	
	Bez grupy CH <sub>3</sub> <b>Ledakrin</b>	Grupa CH <sub>3</sub> <b>C-450</b>	Bez grupy CH <sub>3</sub> <b>C-857</b>	Grupa CH <sub>3</sub> <b>C-1748</b>
CYP1A2	4 produkty: CL2, CL3, CL4 CL7	brak	3 produkty: C2, C3, C7	brak
CYP2C19	4 produkty: CL2, CL3, CL4 CL7	2 produkty: CL3' i CL8'	4 produkty: C2, C3, C4, C7	2 produkty: C3', C8'
CYP3A4	4 produkty: CL2, CL3, CL4 CL7	1 produkt: CL3'	7 produktów: C1, C2, C3, C4, C6, C7, C7a	1 produkt: C3'



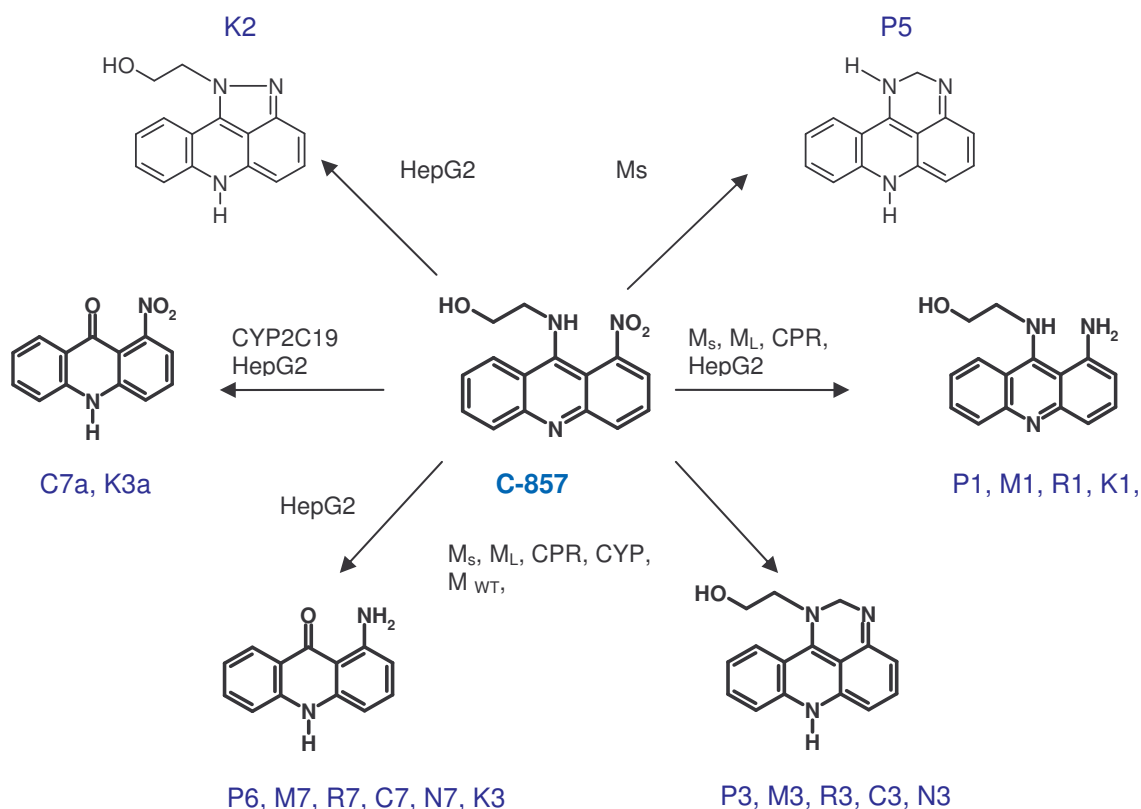
Stopień przemiany związku C-857 był wyższy w obecności izoenzymu CYP3A4, niż CYP2C19, natomiast w metabolizm związku C-1748 był zaangażowany głównie izoenzym CYP2C19. W przypadku drugiej pary związków, Ledakrin metabolizował podobnie zarówno wobec izoenzymu CYP2C19 jak i CYP3A4. Natomiast związek C-450, podobnie jak C-1748 metabolizował głównie wobec CYP2C19, w wyniku czego powstawał jeden metabolit. Wszystkie badane związki, a w szczególności pochodne posiadające dodatkową grupę metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny były znacznie mniej reaktywne w obecności enzymu CYP1A2. Wykazałam więc, że wpływ struktury łańcucha bocznego na reaktywność związków w badanych przemianach jest znacznie mniej istotny, niż obecność grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny. Jednocześnie, obecność grupy metylowej ma większy wpływ w przypadku pary związków C-857 i C-1748, niż pary Ledakrin i C-450. Badając poszerzony zestaw związków uzyskałam też potwierdzenie, że szczególnie w przypadku pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny z grupą metylową w pozycji 4 izoenzymy P450 wykazują istotną selektywność w metabolizmie tych związków.

Od początku mojej pracy stawiałam pytanie: Czy tak różnorodny zbiór metabolitów, jaki obserwowałam podczas przemian w wielu układach modelowych powstaje również w komórkach nowotworowych, czyli w jednym z miejsc ich oczekiwanego działania terapeutycznego? W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że wszystkie badane związki wnikają do komórek ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i tam ulegają biotransformacji tworząc szereg metabolitów. Analiza HPLC/DAD/MS ekstraktów z komórek inkubowanych z tymi związkami wykazała, że niektóre z metabolitów obserwowane były wcześniej podczas przemian związków C-857 i C-1748 w układach enzymatycznych. Związek wykazujący najniższą aktywność cytotoksyczną w komórkach HepG2, czyli C-1748, był najmniej reaktywny w badanym układzie komórkowym. W reakcji powstawały cztery główne produkty, które w odróżnieniu od metabolitów Ledakrinu i związku C-857 widoczne były na chromatogramie nawet po 12 godzinach inkubacji komórek ze związkiem. Wynik ten pozwolił postawić wniosek, że słabiej reaktywne metabolity pochodnej C-1748 nie wiązały się tak szybko, jak produkty C-857, do struktur komórkowych. Zastanawiającym jest jednak fakt, że cytotoksyczność obu związków w stosunku do komórek HepG2 nie różni się tak znacząco jak ich toksyczność ogólna i jak na to wskazują różnice w ich zdolności do metabolizmu. Nie zaobserwowano też wcześniej różnic pomiędzy cytotoksycznością wobec komórek nowotworów jelita grubego HCT8 i HT29. Być może mamy do czynienia z efektem jednoczesnego działania kilku czynników. Z jednej strony obniżona reaktywność metabolitów hamuje efekty cytotoksyczne, z drugiej strony mniej aktywne metabolity nie są szybko „wychwytywane” w komórce nowotworowej i mogą swobodnie dotrzeć do miejsca ich działania. Poza tym,

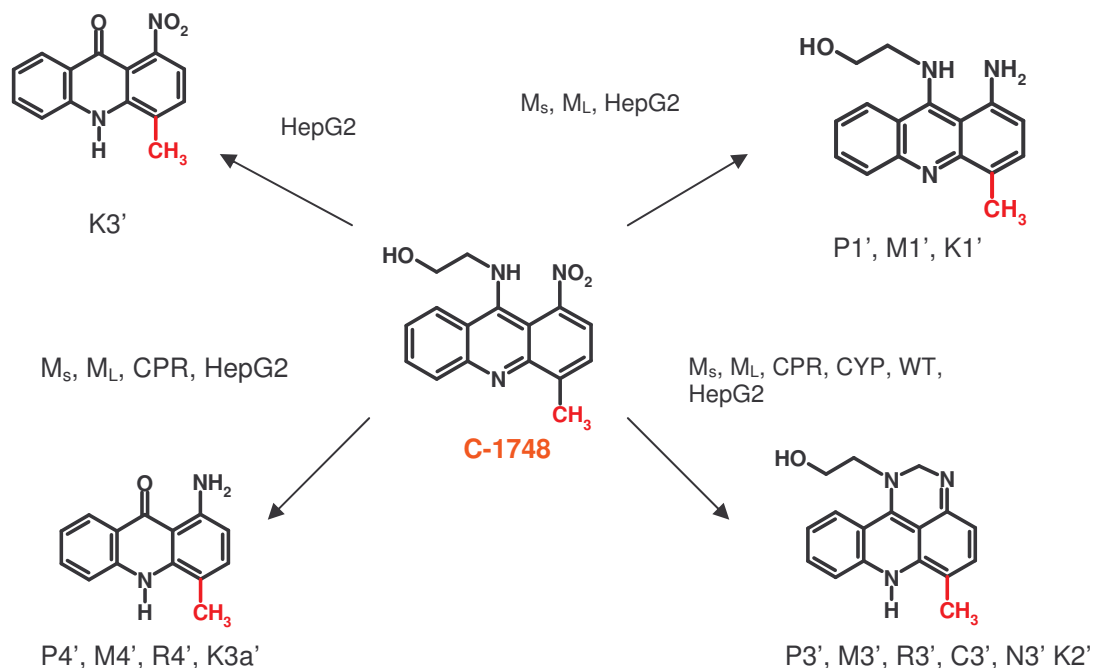


możliwym jest, że komórki nowotworowe w inny sposób reagują na aktywne metabolity niż komórki normalne zdrowego organizmu. Taki wypadkowy korzystny efekt działania C-1748 byłby bardzo pożądanym gdyby miał miejsce w komórkach nowotworu rozwijającego się w organizmie potencjalnego pacjenta, gdyż umożliwiłyby sterowanie terapią indywidualną w zależności od ekspresji enzymów metabolizujących i typu nowotworu u potencjalnych pacjentów.

Podsumowując, związek C-1748 okazał się znacznie mniej reaktywny od swojego metylowego analogu, związku C-857 zarówno we wszystkich enzymatycznych układach modelowych, jak również w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2. Biotransformacja związku C-857 prowadzi do powstania sześciu produktów i tylko czterech w przypadku związku C-1748, co przedstawiłam na rys. 217 i 218. Wszystkie metabolity związku C-1748 są analogami odpowiednich produktów związku C-857 gdyż ich struktury chemiczne różnią się od struktur metabolitów związku C-857 jedynie obecnością grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny.



Rys.217. Struktury chemiczne zidentyfikowanych metabolitów związku C-857 powstających w obecności badanych enzymów metabolizujących; struktury chemiczne **pogrubione** to produkty analogiczne do metabolitów otrzymanych dla C1748(Objaśnienie symboli zestawiono poniżej)



Rys. 218. Struktury chemiczne głównych metabolitów związku **C-748** powstających w obecności badanych enzymów metabolizujących, (Objaśnienie symboli zestawiono poniżej)

#### Objaśnienie symboli do rys. 217 i 218

C <sub>n</sub>	produkt metabolizmu <b>C-857</b> wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
C <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu <b>C-1748</b> wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 (n = 1, 2...)
CPR	NADPH zależna reduktaza cytochromu P450
cpr	gen kodujący NADPH-reduktazę cytochromu P450
CYP H i L	Izoenzymy cytochromu P450 z wysokim i niskim poziomem koekspresji NADPH-reduktazy cytochromu P450
D <sub>n</sub>	produkt reakcji <b>C-857</b> z ditionitroilem (n = 1, 2...)
D <sub>n</sub> '	produkt reakcji <b>C-1748</b> z ditionitroilem (n = 1, 2...)
DTT	ditionitroil
HRN	frakcja mikrosomalna wyizolowana z komórek wątroby myszy z nokautem genu kodującego NADPH-reduktazę cytochromu P450
K <sub>n</sub> '	produkty metabolizmu <b>C-1748</b> powstające w komórkach HepG2
M <sub>L</sub>	frakcja ludzkich enzymów mikrosomalnych
M <sub>m</sub>	enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby myszy
M <sub>n</sub>	produkt metabolizmu <b>C-857</b> w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych (n = 1, 2...)
M <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu <b>C-1748</b> w obecności ludzkich enzymów mikrosomalnych (n = 1, 2...)
M <sub>s</sub>	enzymy mikrosomalne wyizolowane z komórek wątroby szczura
N <sub>n</sub>	produkt metabolizmu <b>C-857</b> wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
N <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu <b>C-1748</b> wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy (n = 1, 2...)
P <sub>n</sub>	produkt metabolizmu <b>C-857</b> wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura (n = 1, 2...)
P <sub>n</sub> '	produkt metabolizmu <b>C-1748</b> wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczura (n = 1, 2...)
R <sub>n</sub>	produkt metabolizmu <b>C-857</b> w obecności reduktazy cytochromu P450 (n = 1, 2...)
R <sub>n</sub> '	produkt reakcji <b>C-1748</b> w obecności reduktazy cytochromu P450 (n = 1, 2...)
WT	frakcja mikrosomalna wyizolowana z komórek wątroby myszy typu dzikiego

Spośród czterech produktów metabolizmu C-1748 tylko jeden powstawał we wszystkich badanych układach modelowych, w tym również w komórkach nowotworowych. Jest to produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocząłowym i grupą metylową w pozycji 4 pierścienia akrydyny. Analog strukturalny tego produktu pozbawiony grupy metylowej również był głównym produktem przemian pochodnej C-857. Jednak w tym przypadku produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocząłowym powstawał tylko w obecności enzymów. W komórkach HepG2 związek C-857 podobnie, jak Ledakrin metabolizował do produktu z dodatkowym pierścieniem pięciocząłowym. Różnica ta może być kolejną przyczyną obniżonej cytotoksyczności związku C-1748 w porównaniu do związku C-857 w komórkach nowotworowych, a również obniżonej toksyczności ogólnej. Kolejna grupa metabolitów powstających w wyniku biotransformacji związku C-857 i C-1748 to akrydony: 1-aminoakrydon i 1-nitroakrydon oraz ich metylowe pochodne. Spośród tych metabolitów tylko 1-aminoakrydon, metabolit związku C-857 powstawał we wszystkich badanych przez mnie układach modelowych, w tym również w komórkach HepG2. Metylowy analog tego produktu nie występował w obecności izoenzymów cytochromu P450 i enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z dwóch typów komórek wątroby myszy. 1-nitroakrydon powstawał głównie podczas przemian związku C-857 w obecności izoenzymu CYP2C19 oraz w komórkach, gdzie obserwowałam go również po inkubacji z pochodną C-1748.

Oprócz wymienionych powyżej metabolitów przemiany enzymatyczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny prowadziły również do powstania produktu ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej. Metabolit ten powstawał podczas przemian związków C-857 w obecności wszystkich enzymów metabolizujących z wyjątkiem: izoenzymów cytochromu P450 i enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy.

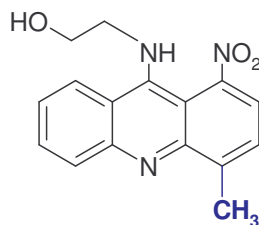
Zwraca uwagę fakt, że w przypadku C-1748 największą liczbę jego metabolitów obserwowałam po inkubacji związku w komórkach nowotworu wątroby, HepG2. W obecności izoenzymów cytochromu P450 nie powstawał produkt redukcji grupy nitrowej do aminowej ani akrydony. Ponadto wykazałam, iż istnieje pewna selektywność w działaniu izoenzymów cytochromu P450 na ten związek. W obecności CYP2C19 związek C-1748 metabolizował do dwóch produktów, w obecności CYP3A4 pojawił się jeden produkt, a w obecności CYP1A2 nie zaobserwowałam żadnych metabolitów. Powyższa selektywność metabolizmu zaobserwowana *in vitro* wobec ludzkich izoenzymów P450 byłaby bardzo korzystną cechą efektów działania C1748, gdyby miała miejsce w organizmie pacjenta. Umożliwiłaby zastosowanie terapii indywidualnej dla pacjenta w zależności od poziomu ekspresji genów jego enzymów metabolizujących.

Zaproponowane w niniejszej pracy struktury chemiczne głównych metabolitów C857 i C1748 powstających w enzymatycznych układach modelowych jak i w komórkach

nowotworowych wskazują na pewne różnice molekularnych mechanizmów ich przemian, które wynikają z obecności grupy metylowej w pozycji 4 pochodnych 1-nitroakrydyny. Wskazuje to, że możliwe jest zaprojektowanie dalszych modyfikacji strukturalnych, które poszerzą te różnice w kierunku wyższej selektywności wobec enzymów metabolizujących. To, z kolei, powinno umożliwić indywidualną terapię pacjentów i w konsekwencji jeszcze znacznie obniżyć toksyczność 9-amino-1-nitroakrydyn przy zachowaniu efektu terapeutycznego wobec komórek nowotworowych. Wyniki wskazują, że dalszą korzystną modyfikacją struktury 9-amino-1-nitroakrydyny mogłoby być wprowadzenie grupy metylowej w pozycji 2 lub jeśli byłoby to możliwe w pozycji 3 pierścienia akrydyny.

## 7. STRESZCZENIE

Przedmiotem badań niniejszej pracy były aktywne przeciwnowotworowo pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, w szczególności związek nowej generacji, C-1748 zsyntetyzowany w zespole Profesora Konopy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii PG.



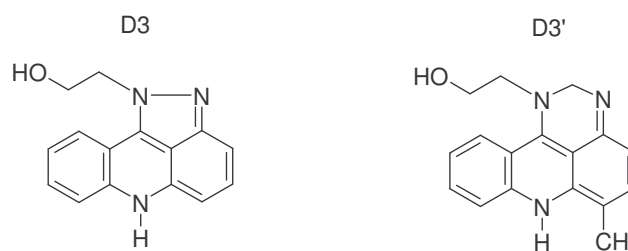
Rys. 219. Struktury chemiczne związków: C-857 (Capridine  $\alpha$ ) i C-1748 (Capridine  $\beta$ ).

Celem prezentowanej pracy jest, z jednej strony poznanie molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych, który może być odpowiedzialny za działanie przeciwnowotworowe, ale również za toksyczność badanych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny. Z drugiej strony zmierzałam do określenia, które izoenzymy cytochromu P450 biorą udział w metabolizmie związków: C-857 i C-1748, aby znaleźć selektywność w szlaku ich przemian metabolicznych, które mogą zachodzić w organizmie pacjenta. Badania te mają szczególne znaczenie wobec faktu, że związek C-1748 (Capridine  $\beta$ ) został wyselekcjonowany do I fazy badań klinicznych ( Innovate Oncology Inc. )

Realizując powyższy cel, w pierwszym etapie pracy wykazałam, że związek C-1748 jest mniej podatny na przemiany metaboliczne w obecności szczerzych enzymów mikrosomalnych, niż pochodna C-857 pozbawiona grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia akrydyny. Reaktywność badanych związków wzrastała, gdy frakcja mikrosomalna zawierała wyższe stężenie izoenzymów cytochromu P450. Wynik ten wskazywał, że metabolizm badanych związków zachodzi zgodnie z mechanizmem reakcji I fazy biotransformacji ksenobiotyków. Analiza chromatograficzna powyższych przemian oraz widm UV-VIS poszczególnych metabolitów wskazała, że związek C-857 ulega przemianom do wielu zróżnicowanych strukturalnie produktów, przy czym niektóre z nich pojawiły się też po inkubacji związku C-1748 z enzymami mikrosomalnymi. Wyniki te skłoniły mnie do określenia struktur chemicznych powstających metabolitów, które mogą być kluczowe dla (i) poznania molekularnego mechanizmu przemian enzymatycznych, oraz (ii) przyczyn zróżnicowanej toksyczności tych związków. Ilości metabolitów otrzymane w wyniku reakcji enzymatycznej badanych związków były niewystarczające do badania ich struktury chemicznej, dlatego w dalszych badaniach metabolizmu

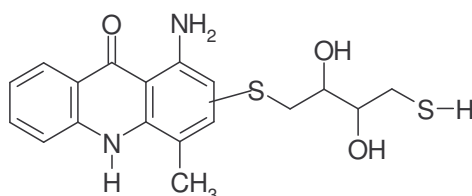
zastosowałam chemiczny czynnik redukcyjny, ditiotreitol, DTT. Wykazano wcześniej, że identyczne addukty związku C-857 z DNA powstają zarówno w obecności DTT, jak w obecności enzymów mikrosomalnych [21].

Stosując techniki HPLC-ESI-MS, MS/MS oraz HR-MS a także w przypadku jednego produktu spektroskopię NMR określiłam struktury chemiczne niektórych produktów reakcji dla związków C-857 i C-1748 z DTT. W badanych warunkach C-1748 był mniej podatny na przemiany redukcyjne. W reakcji z DTT nie powstawały produkty częściowej redukcji grupy nitrowej tak, jak w przypadku C-857. Natomiast dla obu związków zaobserwowałam produkty: D3 i D3' z dodatkowym pierścieniem odpowiednio pięciocłonowym i sześciocłonowym utworzonym pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny, które świadczą o wysokiej reaktywności produktów przejściowych tych związków.



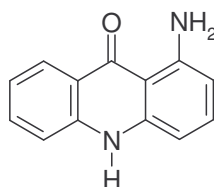
Rys. 220. Struktury chemiczne produktów redukcji związków C-857 i C-1748 w obecności DTT D3 i D3.'

Reakcja związków C-857 i C-1748 z DTT wskazała też możliwość nukleofilowego podstawienia w pierścieniu zawierającym grupę nitrową. W takim przypadku atak nukleofilowy atomu siarki z DTT musiał zachodzić prawdopodobnie po częściowej redukcji grupy nitrowej, gdyż grupa nitrowa jest podstawnikiem aktywującym pierścień na atak czynników elektrofilowych. Wskazuje na to struktura produktu z DTT, D5', przy czym dla związku C-857 powstają cztery takie analogi, a dla C-1748 tylko jeden.



Rys. 221. Struktura chemiczna produktu D5'.

Trzecią grupę produktów reakcji z DTT były akrydony. 1-nitroakrydon powstający w wyniku reakcji hydrolizy związku C-1748 zachodzącej podczas długiego czasu inkubacji związku z DTT. Natomiast 1-aminoakrydon to, jak wykazano wcześniej produkt reakcji redukcji z przegrupowaniem wewnątrzcząsteczkowym.



Rys. 222. Struktura chemiczna 1-aminoakrydonu.

Opisana powyżej reakcja z DTT pozwoliła nie tylko zidentyfikować produkty reakcji redukcji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, ale wskazała, że podczas przemian redukcyjnych cząsteczka związku może ulegać reakcji z odczynnikami nukleofilowymi, również z makromolekułami w komórce, tj. zasadami DNA i grupami aminowymi białek. Można przyjąć, że obniżona reaktywność związku C-1748 w porównaniu z C-857 wobec tych biomolekuł może być przyczyną obniżonej toksyczności związku C-1748.

Porównanie odpowiednich widm UV-VIS i ESI-MS produktów reakcji związku C-857 i C-1748 z DTT z otrzymanymi dla produktów obserwowanych po inkubacji z enzymami mikrosomalnymi pozwoliło stwierdzić, że w badanych warunkach powstawały: 1-aminoakrydon, metabolit z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w poz. 1 i 9 pierścienia akrydyny, ale także produkt P1 ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej. Wykazałam też, że reaktywność obu badanych związków jest niższa wobec ludzkich, niż szczurzych enzymów mikrosomalnych, przy czym bardziej znacząca jest różnica w tych przemianach w przypadku związku C-1748.

Poszukując różnic między transformacją metaboliczną związków C-857 i C-1748 wobec enzymów mikrosomalnych a także selektywności w ich metabolizmie podjęłam próbę identyfikacji głównych metabolitów tych związków powstających w obecności:

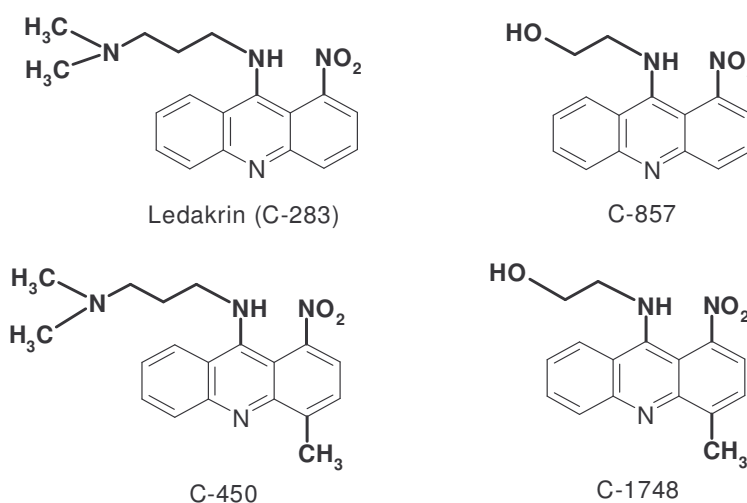
1. rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450
2. rekombinantowej ludzkiej reduktazy cytochromu P450
3. enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy z nokautem genu tej reduktazy.

Przemiany wobec wyizolowanych rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 przeprowadziłam, aby oddzielić efekt działania innych enzymów mikrosomalnych od enzymów cytochromu P450. Stopień przemiany związku C-857 był wyższy w obecności CYP3A4, niż izoenzymu CYP2C19, natomiast w metabolizm C-1748 zaangażowany był głównie CYP2C19. W obecności CYP1A2 oba badane związki metabolizowały najslabiej. Natomiast podwyższone stężenie reduktazy P450 współpracującej z cytochromem P450 obecne w poszczególnych frakcjach izoenzymów istotnie podwyższało stężenie powstających metabolitów. Ponadto wykazałam, że po inkubacji związku C-857 z samą rekombinantową reduktazą cytochromu P450 powstawały identyczne produkty z tymi, jakie obserwowałam wcześniej podczas przemian tego związku wobec enzymów mikrosomalnych. Jednak C-1748 okazał się być bardziej

wrażliwy na działanie reduktazy P450, niż w obecności mieszaniny enzymów mikrosomalnych. Porównanie przedstawionych powyżej przemian związków: C-857 i C-1748 wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych, izoenzymów cytochromu P450 i reduktazy P450 pozwoliło wysunąć następujące wnioski:

- reduktaza cytochromu P450 odgrywa kluczową rolę w metabolizmie badanych związków
- tylko niektóre izoenzymy cytochromu P450 biorą udział w metabolizmie pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny
- selektywność działania izoenzymów P450 jest wyższa dla mniej toksycznego C-1748

Poszerzając badania nad rolą grupy metylowej w metabolizmie pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny do zestawu badanych związków dołączyłam dwa związki o zmienionej strukturze łańcucha bocznego.



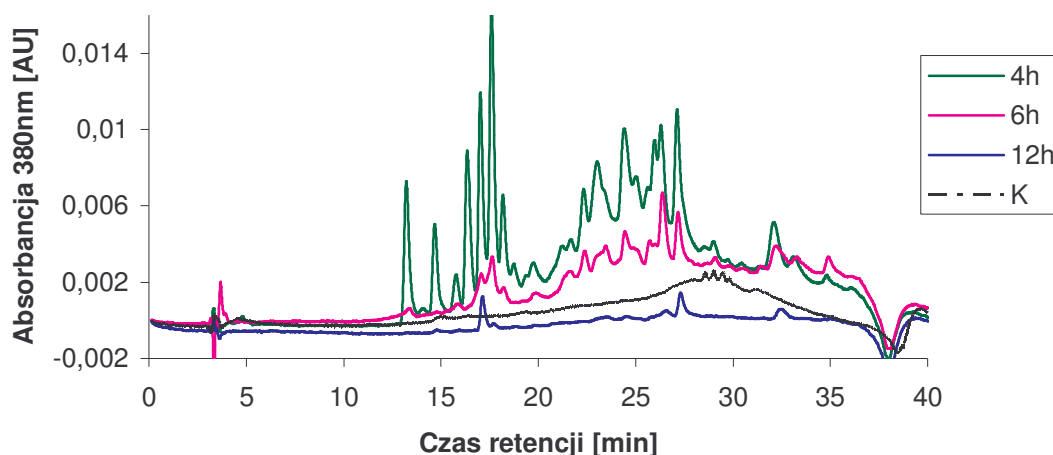
Rys. 223. Struktury chemiczne pochodnych 1-nitroakrydyny;

Dla trzech par związków zbadalam: rolę grupy metylowej i struktury łańcucha bocznego w metabolizmie wobec rekombinantowych izoenzymów P450 i enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby myszy dzikiego typu i z nokautem genu kodującego reduktazę P450. W przypadku drugiego z wymienionych układów trudno było wysunąć jednoznaczny wniosek o roli elementów struktury chemicznej w reaktywności badanych związków, ale wyniki badań biotransformacji w obecności rekombinantowych izoenzymów były dość jednoznaczne. Wykazały one, że wpływ łańcucha bocznego na reaktywność pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w badanych przemianach jest znacznie słabszy, niż grupy metylowej obecnej w pozycji 4 pierścienia akrydyny. Grupa metylowa zdecydowanie obniża reaktywność badanych związków, szczególnie dla pary: C-857 i C-1748, chociaż efekt ten jest także widoczny w przypadku



związków posiadających łańcuch dimetylopropyloaminowym czyli Ledakrinu i związku C-450.

W ostatnim etapie pracy zbadalam metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w jednym z miejsc ich oczekiwanego działania w terapii tj. w komórkach nowotworowych. Do badań wybrałam komórki ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, które ze względu na obecność enzymów I fazy ( CYP1A, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4 ) i II fazy metabolizmu ( UGT, NAT, GST ) są często stosowane w badaniach przemian metabolicznych wielu leków i ksenobiotyków [127,128,129]. Wykazałam, że zarówno Ledakrin jak związki: C-857 i C-1748 wnikają do komórek HepG2 i tam ulegają biotransformacji tworząc szereg metabolitów, przy czym kilka z nich obserwowałam już wcześniej podczas metabolizmu tych związków w obecności innych enzymów mikrosomalnych. Analiza HPLC ekstraktów z komórek potwierdziła obecność dużej liczby metabolitów o zróżnicowanej strukturze chemicznej. Nawiekszą liczbę metabolitów zaobserwowałam w przypadku związku C-857, co przedstawiłam na rys. 224.



Rys. 224. Chromatogram metabolitów związku C-857 wyizolowanych z komórek HepG2 w zależności od czasu inkubacji ze związkiem; 0,2 mM C-857,  $2 \times 10^6$  HepG2, \* K –kontrola, komórki nie traktowane związkiem.

Podobny obraz zaobserwowałam w przypadku Ledakrinu. Ponadto wykazałam, że po 6 godzinach inkubacji komórek ze związkiem stężenie metabolitów dla tych badanych pochodnych wyraźnie spadało, aby „zniknąć” z chromatogramu po 12h inkubacji. Można przypuszczać, że powstające w tych reakcjach produkty były bardzo reaktywne i szybko wiązały się do struktur komórkowych głównie białek i kwasów nukleinowych, co może być przyczyną ich nieobecności po dłuższym czasie inkubacji komórek ze związkiem. Podczas dłuższej inkubacji związku C-1748 w komórkach HepG2 powstawały cztery

główne metabolity, których stężenie w przeciwieństwie do pozostałych pochodnych rosło z upływem czasu inkubacji. Można postawić hipotezę, że metabolity związku C-1748 nie wiązały się tak szybko jak produkty C-857 do struktur komórkowych. W konsekwencji można przypuszczać, że metabolity te mogą dotrzeć selektywnie do miejsca ich działania, co jest szczególnie ważne dla terapii tym potencjalnym lekiem.

Podsumowując badania przemian metabolicznych pochodnych 9-amino-1-ityroakrydyny przedstawione w niniejszej pracy można wysunąć cztery główne wnioski:

- związek C-1748 był mniej podatny na przemiany metaboliczne wobec mieszaniny szczurzych i ludzkich enzymów mikrosomalnych
- biotransformacja badanych związków w różnych układach modelowych prowadzi do powstania trzech typów produktów: produkt ze zredukowaną grupą nitrową, produkt z dodatkowym pierścieniem sześciocząłowym lub pięciocząłowym utworzonym między dwoma sąsiednimi atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny oraz pochodne akrydonu: 1-amino- i 1-nitroakrydon.
- rekombinantowe izoenzymy cytochromu P450 wykazały pewną selektywność w metabolizmie obu związków, ale szczególnie w przypadku C-1748.
- badane związki wnikały do komórek ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 i tam ulegały metabolizmowi, przy czym „czas życia” metabolitów był istotnie dłuższy dla związku C-1748.

## 8. LITERATURA

1. <http://www.nci.nih.gov/statistics>
2. Ledóchowski, A., Stefańska, B., *Research on tumor inhibiting compounds. XXIX. Some N<sup>9</sup>-derivatives of 1-, 2-, 3-, and 4-nitro-9-aminoacridine.* Roczn. Chem. 40: 301-307, (1966)
3. WHO Chronicle Vol. 30 (Suppl. 3), p.11, World Health organization, Genewa, (1976)
4. Bratkowska-Seniow, B., Oleszkiewicz, L., Kozak, E., Krizar, T., *Ledakrin in the treatment of colon carcinoma,* Mater. Med. Pol. (ed Engl), 8: 323-30, (1976)
5. Pawlak, J., Konopa, J., *In vitro binding of metabolically activated (<sup>14</sup>C) – Ledakrin, or 1-nitro-9-<sup>14</sup>C-(3'-dimetyloamino-N-propyloamino)acridine, a new antitumor and DNA cross-linking agent, to macromolecules of subcellular fractions isolated from rat liver and Hela cells.* Biochem. Pharmacol. 28: 3391-402, (1979)
6. Pawlak, J., Pawlak, K., Konopa, J., *The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. II in vitro enzyme mediated covalent binding of a 1-nitroacridine derivative Ledakrin or Nitracrine with DNA and other macromolecules of mammalian or bacterial cells.* Chem. Biol. Interact. 43:151-73, (1983)
7. Pawlak K., Pawlak, J., W., Konopa J., *Cytotoxic and antitumor activity of 1-nitroacridines as an after effect of their interstrand DNA cross-linking,* Cancer Res. 44: 4289-96, (1984)
8. Wilson W., R., Denny, W., A., Twigden S., J., Baguley, B., C., Probert I., C., *Selective toxicity of nitracrine to hypoxic mammalian cells,* Br. J. Cancer, 49: 215-223, (1984)
9. Lee, H., H., Wison W., R., Denny, W., A., *Nitracrine N-oxides: effects of variations in the nature of the side chain N-oxide on hypoxia-selective cytotoxicity,* Anti-Cancer Drug Design. 14: 487-97, (1999)
10. Mazerska Z., Łukowicz, J., Konopa, J., *Antitumor activity of 1-nitro-9-aminoacridines including nitracrine against some ascetic experimental tumors,* Arzneim. –Forsch., 40: 472-77, (1990)
11. Gniazdowski, M., Szmigiero, L., *Nitracrine and its congeners: an overview,* Gen. Pharmacol. 26, 3: 473-81, (1995)
12. Konopa, J., Wysocka-Skrzela, B., Tiwari, R., K., *9-alkiloamino-1-nitroacridine derivatives.*; Patent europejski 01910914.9-2101-US0105199 (1981), Patent amerykański 6.589.961 B2 (2003)
13. Chen, Y., Ashok, B., T., Garikapaty, V., P., S., Lin, Szostek, A., Wysocka-Skrzela, B., Banerjee, D., Konopa, J., Miller, D., Y., Tiwari, R., K., *Preclinical studies of 1-nitroacridines derivatives: Effective anti-tumor agents for prostate cells,* Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 45, abs. 390, (2002)
14. Tadi, K., Chen Y., Ashok, B., T., Banerjee, D., Konopa, J., Tiwari, R., K., *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, abs. 5885, (2005)
15. Innovate Oncology, Inc. Announces an exclusive agreement with prostagenics LLC to develop Capridine-Beta for the treatment of prostate cancer, Innovate Oncology, Inc., OTC BB: IOVO. OB, (2005)
16. Ashok, B., T., Tadi, K., Chen Y., Banerjee, D., Konopa, J., Latropoulos, J., Tiwari, R., K., *Preclinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine derivatives (C-1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs,* Life Sci., 79: 1334-42, (2006)
17. Narayanan, R., Tiwari, P., Inoa, D., Ashok T., *Comparitive analysis of mutagenic potency of 1 nitro-acridine derivatives,* Life Sci., 77, 2312-23, (2005)
18. Ashok, B., T., Tadi, K., Venkata, P., S., Chen Y., Huang, Q., Banerjee, D., Konopa, J., Tiwari, R., K., *Preclinical toxicological examination of a putative prostate cancer-specific 4-methyl-1-nitroacridine derivative in rodents,* Anti-Cancer Drugs, 18, 87-94, (2007)
19. Guengerich, F., P., *Comparison of catalytic selectivity of cytochrom P450 subfamily enzymes from different species,* Chem. Biol. Interact., 106: 161-82, (1997)
20. Brandon, E., F., A., Raap, C., D., Meijerman, A., Beijnen, J., H., Schellens, J., H., M., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons,* Toxicol. Appl. Pharmacol., 189, 3: 233-46, (2003)
21. Gorlewska, K., Mazerska, Z., Sowiński, P., Konopa, J., *Products of metabolic activation of the antitumor drug ledakrin(Nitracrine) in vitro,* Chem. Res. Toxicol. 14: 1-10, (2001)

22. Gorlewska, K., *Badanie aktywacji grupy nitrowej oraz wiązania się ze składnikami DNA leku przeciwnowotworowego Ledakrin*, praca doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk, (1999)
23. Guengerich F., P., *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*, Chem. Res. Toxicol., 14, 6: 611-50, (2000)
24. Mueller, G., C., Miller, J., A., *The metabolism of 4,4'-dimethylaminoazobenzene by rat liver homogenates*, J. Biol. Chem., 176: 535-44, (1948)
25. Nebert D., Russel, D., W., *Clinical importance of cytochrome P450*, Lancet, 360: 1155-62, (2002)
26. Roos, P., H., *Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b<sub>5</sub>*, J. Chromatogr. B. Biomed Appl., 684: 107-31, (1996)
27. Okita, R., T., Masters, B., S., *The Cytochromes P450, Biotransformations*, 23: 981-97, (1998)
28. Luet-Lok Wong, *Cytochrome P450 monooxygenases*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 2: 263-68, (1998)
29. Lamb D.C. Waterman, M .R., Kelly, S.L., and Guengerich, F.P., *Cytochromes P450 and drug discovery*, Curr. Opin. Biotechnol., 18, 6: 504-12, (2007)
30. [http://www.bu.edu/biology/Faculty Staff/djw.html](http://www.bu.edu/biology/Faculty%20Staff/djw.html)
31. Lewis, D., F., *On the recognition of Mammalian Microsomal Cytochrome P450 substrates and their characteristics*, Biochem. Pharmacol., 60, 3: 293-306, (2000)
32. Gonzales, F., J., *Human cytochromes P450 problems and prospects*, Trends Pharmacol. Sci. 13, 9: 346-52, (1992)
33. Bernhard, R., *Cytochromes P450 as versatile biocatalysts*, J. Biotechnol, 124, 1: 128-45, (2007)
34. Degtyarenko, K.N. and Archakov, A.I. *Molecular evolution of P450 superfamily and P450 containing monooxygenase systems*. FEBS Lett. 11, 332, (1-2): 1-8, (1993)
35. <http://drnelson.utm.edu/cytochromeP450.html>
36. Gotoh, O., *Evolution and differentiation of P450 genes, Cytochrome P450*. 2<sup>nd</sup> ed by Omura, T., Ishimura, Y., and Fujii-Kuriyama, Y., Kodansha, Tokyo, and VCH, Weinheim, p. 255-72, (1993)
37. Isin E. M, Guengerich, F.P., *Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes*, Biochim. Biophys. Acta., 1770, 3: 314-29, (2007)
38. Smith, D., A., Acland, M.,J., Jones, B., C., *Properties of cytochrome P-450 and their substrates. Part 1: Active site characteristics*. Drug Discovery Today, 1: 10, 406-14, (1997)
39. Poulos, T.L., Finzel, B.C. and Howard, A.J. *Highresolution crystal structure of cytochrome P450cam*. J. Mol. Biol. 195, 3: 687-700, (1987)
40. Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawaraji, K., Sagowa, K., Muramatsu, M., *Primary structure of a cytochrome P450 coding nucleotide sequence phenobarbital inducible P450 cDNA from the rat liver*, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 79, 9: 2793-97, (1982)
41. Sakaguci, M., Mihara, K., Sato, R., *A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence*, EMBO. J. 6, 8: 2425-31, (1987)
42. Johnson, E., F., *Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monoksygenases*, Biochem. Biophys. Res., Commun., 338: 331-36, (2005)
43. Snawder, J., E., Lipscomb, J., C., *Interindividual Variance of Cytochrome P450 Forms in Human Hepatic Microsomes: Correlation of Individual Forms with Xenobiotics Metabolism and Implications in Risk Assessment*, Regul. Toxicol. Pharmacol. 32, 2: 200-9, (2000)
44. Estabrook, R., W., *Drug Metabolism and Drug Toxicity*, wyd. J.R.Mitchel, M.G.Horning, Raven Press, New York, 1-20, (1984)
45. Rowland, P. Blaney, F., E. at all, *Crystal structure of human Cytochrome P450 2D6*, J., Biol., Chem., 281, 11: 7614-622, (2006)
46. <http://opm.phar.umich.edu/protein.php>
47. Sakaki T., Inouye, K., *Practical Application of Mammalian Cytochrome P450*, J. Biosci. Bioeng. 90, 6: 583-90, (2000)
48. Guengerich, F., P., *Human cytochrome P450 enzymes*, in: *Cytochrome P450: Structure mechanism and biochemistry*, ed by P.R. Ortiz de Montellano, Kluwer Akademik / Plenum Publishers, Nev York, 337-530, (2005)
49. Gerber, N., C., Sligar, S., G., *Catalytic mechanism of cytochrome P450: evidence for distal charge relay*, J. Am. Chem. Soc., 114: 8742-43, (1992)

50. Murataliev, M., B., Feyereisen, R., Wlaker, F., A., *Electron transfer by diflavin reductases*; Biochim. Biophys. Acta 1698, 1: 1-26, (2004)
51. Reed J., R., Holenberg P., F., *Egzamining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b<sub>5</sub>: the effect of cytochrome b<sub>5</sub> on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase*, J. Inorg. Biochem., 97, 3: 265-75, (2003)
52. Vergéres, G., Waskell L, *Cytochrome b<sub>5</sub>, its function, structure and membrane topology*, Biochimie, 77, 7-8: 604-20, (1995)
53. Zhang, H., Hamdane, D., Sang-Choul Im, Waskell, L., *Cytochrome b<sub>5</sub> Inhibits Electron Transfer from NADPH-Cytochrome P450 Reductase to Ferric Cytochrome P450 2B4*, J. Biol. Chem., 283, 9: 5217-25, (2008)
54. Ziegler, G., A., Vornhein, C., Hanukoglu, I., Shulz, G., *The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for biosynthesis*, J. Biol. Chem., 289, 4: 981-90, (1999)
55. Sevrioukova, I. F., Li, H., Poulos T., L., *Crystal Structure of Putidaredoxin Reductase from Pseudomonas putida, the Final Structural Component of the Cytochrome P450cam Monooxygenase*, J., Mol., Biol., 336: 4, 889-902, (2004)
56. Ekins, S., Ring, B. J., Grace, J., *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 44, 1: 313-24, (2000)
57. Ohyama, Y., Meaney, S., Heverin, M., Ekström, L., Brafman, A., Shafir, M., Andersson, U., Olin, M., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., Feinstein, E., and Björkhem I., *Studies on the Transcriptional Regulation of Cholesterol 24-Hydroxylase (CYP46A1): Marked insensitivity toward different regulatory axes*, J. Biol. Chem., 281, 7: 3810-20, (2006)
58. Tavera-Mendoza, L., E., White, J., H., *Śloneczna tarcza*, Świat nauki, 1: 197, 34-41, (2008)
59. Conlan, R., Sherman, E., *Unraveling the Enigma of Vitamin D*, Beyond Discovery Series, National Academy of Sciences, (2003)
60. Ray, W., J., Bain, G., Yao, M., and David I. Gottlieb, *CYP26, a novel mammalian Cytochrome P450, is induced by Retinoic Acid and defines a new family*, J. Biol. Chem., 272, 30: 18702-8, (1997)
61. Osanai, M., Petkovich, M., *Expression of the Retinoic Acid-Metabolizing Enzyme CYP26A1 Limits Programmed Cell Death*, Mol. Pharmacol. 67, 5: 1808-17, (2005)
62. Guengerich, F., P., *Enzymatic Oxidation of Xenobiotic Chemicals*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 25, 2: 97-153, (1990)
63. Morag C., E., McFadyen, M., C., E., Melvin, W., T., Murray, G., I., *Cytochrome P450 enzyme: Novel options for cancer therapeutics*, Mol. Cancer Ther. 3, 3: 363-371, (2004)
64. Choi, M., H., Skipper, P., L., Wishnok, J., S., Tannenbaum, S., R., *Characterization of testosterone 11-β-hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450*, Drug Metab. Dispos, 33: 6, 714-8, (2005)
65. Guengerich F., P., *Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity*, AAPS J. 8, 1: E101-E111, (2006)
66. Richelson, E., *Pharmacokinetic drug interactions of new antidepressants: a review of the effects on the metabolism of other drugs*, Mayo Clin. Proc., 72, 9: 835-47, (1997)
67. Tassaneeyakul W, Birkett D., J, McManus M., E., Tassaneeyakul W., Veronese M., E., Andersson T., Tukey R., H., Miners J., O., *Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms*, Biochem. Pharmacol. 18, 47(10): 1767-76, (1994)
68. Zhong DF et al, *Microbial transformation of naproxen by Cunninghamella species*, Acta Pharmacol Sin, 24: 5, 442-47, (2003)
69. Wójcikowski, J., Pichard-Garcia, L., Maurel, P., and Daniel W., A., *Contribution of human cytochrome P-450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine*, Br. J. Pharmacol., 138: 8, 1465–74, (2003)
70. Guengerich, F., P., Coon, M., J., *Rates of individual steps in hydroksylation reactions catalyzed by reconstituted liver microsomal systems containing cytochrome P450*, Pharmacologist, 17: 216, (1975)
71. Guengerich, F. P., Vaz, Alfin D. N., Raner, Gregory N., Pernecky, Steven J., Coon, Minor J., *Evidence for a role of a perferryl-oxygen complex, FeO<sup>3+</sup>, in the N-oxygenation of amines by cytochrome P450 enzymes*, Mol. Pharmacol., 51: 147-51, (1997)
72. Guengerich F., P., *Metabolism of chemical carcinogens*, Carcinogenesis, 21: 3, 345-51, (2000)



73. Alexandrov, Kroum, Rojas, Margarita, Rolando, Christian, *DNA damage by Benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals*, *Cancer Res.*, 66: 11938-45, (2006)
74. Macdonald, T., L., Gutheim, W., G., Martin, R., B., Guengerich, F., P., *Oxidation of substituted N,N-dimethylanilines by cytochrome P-450*, *Biochemistry*, 28: 2071, (1989)
75. Korslot, A., van Gestel, C., A., M., Straalen, N., M., *Environmental stress and cellular response in Arthropods, The integrated cellular stress defense system* ed by CRC Press, (2004)
76. Leonnides C., *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Role of metabolism in chemical toxicity*, Joannides, C., ed by CRP Press, (1996)
77. Wood, P., M., *A comparison of peroxidase and cytochrome P450*, *Biochem. Soc. Transact.*, 20: 349-52, (1992)
78. Halpert, J., R., Guengerich, F., P., Bend, J., R., *Selective Inhibitors of Cytochromes P450*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 125: 163-175, (1994)
79. Roberts, E., t S., Vaz, A., D., N., Coon, M., J., *Catalysis by cytochrome P450 of an oxidative reaction in ksenobiotic aldehyde metabolism: with olefin formation*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8963-66, (1991)
80. Rettie, A., E., Rettenmeier, A., W., Howald, W., N., Bailie, T., A., *Cytochrome P450 catalyzed formation  $\delta^4$  - VPA, a toxic metabolite of valproic acid*, *Science*, 235: 890-93, (1987)
81. Rauth, A., M., Melo, T., Misra V., *Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanism of action*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1: 42 (4), 755-62, (1998)
82. Moreno, S., D., N., Docampo, R., *Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis*, *Environmental Health Perspectives*, 64, 199-208, (1985)
83. Beland, F., A., Heflich, R., H., Howard, P., C., Fu, P., P., *The in vitro metabolic activation of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. In: Harrey R., G., ed by Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*. Washington, DC: Am. Chem. Soc. 371-96, (1985)
84. Mason, R., P., Josephy, P., D., *Free radical mechanism of nitroreductase. In: Toxicity of nitroaromatic compounds*, ed by D., Rickert, 121-140, (1985)
85. Mottley, C., Kalyanaraman, B., Mason, R., P., *Spin trapping artifacts due to reduction of nitroso spin traps*, *FEBS Lett.*, 130, 12-14, (1981)
86. Mason, R., P., Holtzman, J., L., *The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> consumption of nitroreductase*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1267-74, (1975)
87. Bangshawe, K., D., Springer, C., J., Searle, F., Antoniwi, P., Melton, R., G., Herwood, R., F., *A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites*, *Br. J. Cancer*, 58, 700-3, (1988)
88. McCord, J., M., Fridovich, J., *Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyperin (hemocuperin)*, *J. Biol. Chem.* 244, 6049-55, (1969)
89. Kappus, H., *Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling*, *Biochem. Pharmacol.*, 35: 1, 1-6, (1986)
90. Francisko, I., Pnotti, M., H., P., *Cyanogenic glucosides in plants*, *Braz. Arch. Biol. Tech.* 45: 5, 487-492, (2000)
91. McFarlene, I., J., Lees, E., M., Conn, E., E., *The in vitro biosynthesis cyanogenic glycoside of Sorghum bicolor*, *J. Biol. Chem.*, 250: 12 (25), 4708-13, (1975)
92. Urlacher V., B., Eiben, S., *Cytochrome P450 monoksygenases perspectives for synthetic application*, *Trends Biotechnol.*, 24: 7, 324-30, (2006)
93. Karlgren, M., Miura, S., Igelman-Sundberg, M., *Novel extrahepatic cytochrome P450s*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: 57-61, (2005)
94. Smith, D., A., Acland, M., J., Jones, B., C., *Properties of cytochrome P450 and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P450 substrates*, *Drug Discovery. Today*, 2: 479-86, (1997)
95. Purnapatre, K., Khattar, S., Saini, K., S., *Cytochrome P450 in the development of target based anticancer drugs*, *Cancer Lett.*, 259: 1-15, (2008)
96. De Wildt, S., N., Kearns, G., L., Leeder, J., L., van der Anker, J., N., *Cytochrome P450 3A*, *Clin. Pharmacokinet.*, 37: 6, 485-505, (1999)
97. Rooseboom, M., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen N., P., E., *Enzyme-Catalyzed Activation of anticancer Prodrugs*, *Pharmacol. Rev.* 56: 53-102, (2004)
98. Mathijssen, R., H., J., Schaik, R., H., N., *Genotyping and fenotyping cytochrome P450: Perspectives for cancer treatment*, *Eur. J. Cancer*, 42: 141-48, (2006)

99. McFadyen, M., C., E., Melvin, W., T., Murray, G., I., *Cytochrome P450 enzyme: Novel options for cancer therapeutics*, Mol. Cancer Ther. 3: 3, 363-371, (2004)
100. Omieciński, C., J., Rimmel, R., Hosagrahara, V., P., *Concise review of the cytochrome P450s and their role in toxicology*, Toxicol. Sci., 48: 2, 151-6, (1999)
101. Spatzenegger, M., Jaeger, W., *Clinical Importance of Hepatic Cytochrome P450 in Drug Metabolism*, Drug Metab. Rev., 27: 3, 397-417, (1995)
102. Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sundberg, M., *Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer*, Oncogene, 13: 25 (11), 1679-91, (2006)
103. Ingelman-Sundberg, M., *Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development*, Drug. Metab. Dyspos., 29: 4 part 2, 570-73, (2001)
104. Buetow, K., H., Edmonson, M., N., Cassidy, A., B., *Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data*. Nat. Genet. 21, 323-325, (1999)
105. Van Shaik R., H., N., *Implications of cytochrome P450 genetic polymorphism on the toxicity of antitumor agents*, Ther. Drug. Monit. 26: 236-240, (2004)
106. Hewitt, N., J., *Primary hepatocytes; current understanding of the regulation of metabolic enzymes transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter clearance, and hepatotoxicity studies*, Drug. Metab. Rev., 39: 1, 159-234, (2007)
107. Handschin, C., Meyer, U., E., *Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors*, Pharmacol. Rev., 55: 4, 649-73, (2003)
108. Elmore, C., L., Porter, T., D., *Modification of the nucleotide cofactor-binding site of cytochrome P-450 reductase to enhance turnover with NADH in vivo*, J. Biol. Chem. 277: 50, 48960-964, (2002)
109. Vergères, G., Waskell L., *Cytochrome b<sub>5</sub>, its function, structure and membrane topology*, Biochimie, 77: 7-8, 604-620, (1995)
110. Ram, P. A., Waxman, D. J., *Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms*, J. Biol. Chem. 267: 5, 3294-301, (1992)
111. Schacter, B., A., Nelson, E., B., Marver, H., S., Masters; B., S., *Immunochemical evidence for an association of Heme Oxygenase with the microsomal electron transport system*; J. Biol. Chem. 10: 247 (11), 3601-7, (1972)
112. Enoch; H., G., Strittmatter; P., *Cytochrome b<sub>5</sub> reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase*; J. Biol. Chem. 254: 18, 8976-81, (1979)
113. [http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR\\_enzymology.htm](http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm)
114. Hubbard, P., A., Shen, A., L., Paschke, R., Kasper, C., B., Kim, J., P., *NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hybrid and electron transfer*, J. Biol. Chem. 276: 31, 29163-170, (2001)
115. Miwa, G., T., West, S., B., Huang, M., T., Lu, A., Y., *Studies on the association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome c reductase during catalysis in a reconstituted hydroxylating system*, J. Biol. Chem. 254: 13 5695-700, (1979)
116. Shen, A., L., Kasper, C., K., *Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c*, J. Biol. Chem. 270: 46, 27475-80, (1995)
117. Nisimoto, Y., *Localization of cytochrome c-binding domain on NADPH-cytochrome P450 reductase*, J. Biol. Chem. 261: 30, 14232-39, (1986)
118. Bridges, A., Gruenke, L., Changi, Y., Vakser, I., A., Loew, G., Waskell, L., *Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b<sub>5</sub> and cytochrome P450 reductase*, J. Biol. Chem. 273: 27, 17036-49, (1998)
119. Henderson, C., Pass, G., J., Wolf, R., *The hepatic cytochrome P450 reductase null mouse as tool to identify a successful candidate entity*, Toxicol., Lett., 162: 1, 111-17, (2006)
120. Henderson C., J., Otto, D., M., E., Magnuson, M., A., McLaren A., W., Rosewell, I., Wolf, C., R., *Inactivation of the hepatic Cytochrome P450 system by conditional deletion of Hepatic Cytochrome P450 Reductase*, J. Biol. Chem. 278: 15, 13480-13486, (2003)
121. Cummnings, J., *The role of reductive enzymes in cancer cell resistance to mitomycin C*, Drug Resist. Updat., 3: 3, 143-8, (2000)
122. Bartoszek A., *Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase, overview of its biological and biochemical effects*, Acta Bioch. Pol. 49: 2, 323-31, (2002)

123. Franaces, H., Bligh, J., Bartoszek, A., Robson, C., N., Hickson, J., D., Kasper, C., B., Beegs, J., D., Wolf, *Activation of Mitomycin C by NADPH:cytochrome P450 Reductase*, *Cancer Res.*, 50: 24, 7789-92, (1990)
124. Brown J., M., Wilson W., R., *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*, *Cancer*, 4, 437-447, (2004)
125. Manoj, K., M., *The di-flavoenzyme reductase directly activates oxygen for the metabolism of diverse drug molecules by liver microsomal Cytochrome P450s*, 15th International Conference on Cytochromes P450, Bled, Slovenia, 17– 21. 06. 2007, Book of abstracts p. 188.
126. Brandon E., F., Sparidans R., W., Meijerman I., Manzanares I., Beijnen J., H., Schellens J., H., *In vitro characterization of the biotransformation of thiocoraline, a novel marine anti-cancer drug*, *Invest New Drugs.*, 22: 3, 241-51, (2004)
127. Fardel O., Morel, F., Ratanasanh D., Fautrel A., Beaune F., Guillouzo A., *Cellular and Molecular aspects of Cirrhosis, Expression of drug metabolizing enzymes in human hepatoma cells*, 216, 327-30, ed by Clement, B., Guillouzo, A., in John Libbey Eurotext, (1992)
128. Wilkening, S., Bader, A., *Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2*, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17: 4, 207-13, (2003)
129. Konieczny M., T., and Ledóchowski, A., *Nucleophilic substitution of hydrogen atom in 1-nitroacridine derivatives Part II. Mechanism of 1-nitro-9-piperidinoacridine reactions with piperidine. Intramolecular transfer of oxygen atom from the nitro group to acridine ring*, *Pol. J. Chem.* 54, 2233-37, (1980)
130. Bartoszek, A., Konopa, J., *<sup>32</sup>P-post-labeling analysis of DNA adduct formation by antitumor drug Nitracrine (Ledakrin) and other nitroacridines in different biological systems*, *Biochem. Pharmacol.* 38: 8, 1301-12, (1989)
131. Szostek, A., Konopa, J., *Międzyłańcuchowe sieciowanie DNA w komórkach nowotworowych przez wybrane pochodne z grupy 1-nitroakrydyny*, XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa biochemicznego, Toruń, poster (2001),
132. Szostek, A., Mazerska, Z., Wysocka-Skrzela, B., Konopa, J., *Metabolic activation in vitro of 1-nitro-4-metyl-9-hydroxyethylacridine derivatives, the effective agents against*, 18th European Workshop on Drug Metabolism. Valencia, Spain, Book of abstracts p.131, poster, (2002)
133. Szostek, A., *Wiązanie się do DNA pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny wykazujących właściwości przeciwnowotworowe*, praca doktorska, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, (2003)
134. Wiśniewska, A., *Przemiany metaboliczne wybranych związków przeciwnowotworowych, pochodnych akrydyny*, Sesja sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym PG, Gdańsk, Materiały konferencyjne str. 104, (2004)
135. Wiśniewska, A., Mazerska, Z., Konopa, J., *Metabolic activation of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivatives C-857, C-1748 as a preliminary step of the covalent binding of this drug to DNA*, Gliwice Scientific Meetings, Book of abstracts p. 73. Gliwice, poster, (2004)
136. Sawicka, K., Chrapkowska, A., Klimkowska, A., Kot-Wasik, A., Bartoszek, A., Paine, M., Wolf, R., Konopa, J., Mazerska, Z., *NADPH-cytochrome P450 reductase is strongly involved in activating metabolic transformations of 9-amino-1-nitroacridine antitumor agents*, XXXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin, *Acta Biochim. Pol.*, 52: 1 p. 141, poster, (2005)
137. Wiśniewska, A., Zbieć, K., Chrapkowska, A., Konopa, J., Z. Mazerska, *Cytochrome P450 izoenzymes involved in metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivatives, C-857, C-1748*, XXXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, *Acta Biochim. Pol.*, 53: 1, p. 83, oral, (2006)
138. Wiśniewska, A., Chrapkowska, A., Presz, P., Konopa J., and Mazerska, Z., *Selectivity in CYP mediated metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivative, C-1748 (Capridine β)*, 15th International Conference on Cytochromes P450, Bled, Slovenia, Book of abstracts p. 170, poster, (2007)
139. Wiśniewska, A., Presz, P., Chrapkowska A., Henderson, C., Konopa J., and Mazerska, Z., *The role of Cytochrome P450 Reductase in metabolism of potent nitroacridine antitumor agent, C-1748*, XXXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, *Acta Biochim. Pol.*, 54: 4, p.158, poster, (2007)
140. Wiśniewska, A., Koprońska, J., Niemira, M., Augustin, E., Kot-Wasik, A., Hołownia, A., Konopa J., and Z. Mazerska, *Metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivative, C-1748 (Capridine beta<sup>R</sup>) in HepG2 tumor cells*, Xth European Regional ISSX Meeting, Wiedeń, Austria, *Drug Metab. Rev.* 40, p. 132, poster, (2008)



141. Wiśniewska, A., Koprowska, J., Augustin, E., Niemira, M., Kot-Wasik, A., Hołownia, A., Konopa J., and Z. Mazerska, *Metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivative, C-1748 (Capridine beta<sup>R</sup>) in human hepatoma HepG2 cells*, VI MKNOL, Przemyśl, Book of abstracts p. 22, poster, (2008)
142. Chrapkowska A., *Przemiany metaboliczne przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny zachodzące w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby*, praca magisterska, Politechnika Gdańska, (2005)
143. Hernandez-Santiago, B., Placidi, L., Cretton-Scot, E., Faraj, A., Bridges, E., G., Bryant, M., L., Rodriguez-Orengo, J., Imbach, J., L., Gosselin, G., Pierra, C., Dukhan, D., Sommadossi, J., P., *Pharmacology of  $\beta$ -L-Thymidine and  $\beta$ -L-2'-Deozycytidine in HepG2 cells and primary human hepatocytes: relevance to chemotherapeutic efficacy against Hepatitis B Virus*, *Antymicrob. Agents Chemotherapy*, 46, 6, 1728-1733, (2002)
144. Gómez-Silva, M., Garza-Ocañas, L., Waksman, N., Rivas, V., Piñeyro-López, A., *In vitro metabolism and toxicity assessment of toxin T-514 (Peroxisomicine A1) of Karwinskia humboldtiana in microsomes and primary cultured hepatocytes*, *Toxicol. In Vitro*, 19:1, 47-53, (2005)
145. Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., Nagao, A., *Biotransformation of flucoxanthinol into amarouciaxanthin of fucoxanthin metabolites*, *Drug Metabol. Dispos.*, 32: 2, 205-11, (2004)
146. Schacker, M., Foth H., Schluter, J., Kahl, R., *Oxidation of Tris to one - carbon compounds in a radical-producing model system, in microsomes, in hepatocytes and in rats*, *Free Radical Res. Commun.* 11, 339-347, (1991)
147. Moś-Rompa, A., *Pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 oraz 1-nitroakrydyny C-857 – wpływ na przebieg cyklu życiowego oraz indukcje apoptozy lub starzenia komórek nowotworowych*, praca doktorska, Wydział chemiczny, Politechnika Gdańska, (2008)
148. Johnstone, R., A., W., Rose, M., E., *Teoria Spektrometrii mas, Spektrometria mas*, PWN, str. 272-303, (2001)
149. Denny, W. A. Atwell, G., J., Andersen, R., F., Wolson, W., R., *Hypoxia-selective antitumor agents. Relationships between structure, physicochemical, properties and hypoxia-selective cytotoxicity for nitracrine analogues with varying side chain the iminoacridan hypothesis*, *J. Med. Chem.*, 33, 1288-95, (1990)
150. Ehlhardt, W., J., Beaulien, B., B., Goldman, P., *Formation of an amino reduction product of metronidazole in bacterial cultures: lack of bactericidal activity*, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 259-64, (1987)
151. McClelland, R., A., Fuller, J., R., Seaman, N., E., Rauth, A., M., Battistella, R., *2-hydroxylaminoimidazoles-unstable intermediates in reduction of 2nitroimidazoles*, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 303-309, (1984)
152. Raleigh, J., A., Liu, S., F., *Reductive fragmentation of 2-nitroimidazole, amines and aldehydes*, *Int. J. Radiat.Oncol. Biol. Phys.*, 10, 1337-1340, (1984)
153. Palomino, e., Foster, B., Kempff, M., Corbett, T., Wiegand, R., Horwitz, J., Baker, L., *Identyfication and antitumor activity of a reduction product in murine metabolism of pyrazoloacridine (NSC-366140)*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 38, 453-58, (1996)