



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Anna Mieszkowska**
Dyscyplina naukowa: **nauki chemiczne - biotechnologia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Przemiany metaboliczne *in vitro* niesymetrycznych bisakrydyn w układach bezkomórkowych i w komórkach nowotworowych oraz określenie wpływu tych pochodnych na aktywność enzymów metabolizujących leki

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

***In vitro* metabolic changes of unsymmetrical bisacridines in noncellular systems and in tumor cells and determination of the influence of these compounds on the activity of drugs metabolizing enzymes.**

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska	Dr hab. Ewa Augustin, prof. uczelni
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
<Stopień, imię i nazwisko>	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>



Pragnę serdecznie podziękować Pani Profesor Zofii Mazerskiej za opiekę, pomoc naukową i merytoryczną, przekazaną wiedzę, poświęcony czas, a także okazane wsparcie i życzliwość.

Pani Profesor Ewie Augustin za wsparcie naukowe i cenne rady.

Dziękuję wszystkim członkom Zespołu, z którymi miałam okazję pracować, za wspólnie spędzony czas, pomoc w pracy laboratoryjnej i wiele cennych dyskusji.

Rodzicom za wychowanie, wiarę we mnie, bezgraniczną miłość i nieocenioną pomoc.

Dziękuję mojemu Mężowi Karolowi za jego miłość i wsparcie oraz za to, że zawsze przy mnie jest.



Spis Treści

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW.....	9
STRESZCZENIE	11
ABSTRACT.....	13
I. WSTĘP I CEL PRACY.....	15
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	19
II.1. Biotransformacja leków	19
II.1.1. Ogólna charakterystyka procesu biotransformacji	19
II.1.2. Modyfikacje metaboliczne leków	20
II.1.3. Międzyosobnicze różnice w metabolizmie leków	21
II.2. Cytochromy P450 (I faza metabolizmu).....	24
II.2.1. Ogólna charakterystyka enzymów cytochromu P450	24
II.2.2. Rola cytochromów P450 w metabolizmie leków	27
II.2.3. Białka sieroce cytochromu P450	28
II.3. Monooksygenazy flawinowe (I faza metabolizmu).....	33
II.3.1. Ogólna charakterystyka enzymów FMO	33
II.3.1. Rola FMO w metabolizmie leków	36
II.4. UDP-glukuronylotransferazy (II faza metabolizmu)	38
II.4.1. Ogólna charakterystyka UDP-glukuronylotransferaz	38
II.4.2. Rola UDP-glukuronylotransferaz w metabolizmie leków	40
II.5. Interakcje leków przeciwnowotworowych	41
II.5.1. Interakcje leków związane z enzymami metabolizującymi	41
II.5.2. Przykłady interakcji leków	42
II.6. Metabolizm in vitro, rola w badaniach przedklinicznych	47
II.6.1. Badania metabolizmu w układach bezkomórkowych.....	48
II.6.2. Badania metabolizmu w komórkach nowotworowych.....	51
II.7. Pochodne bisakrydyny	52
II.7.1. Symetryczne bisakrydyny jako potencjalne leki	54
II.7.2. Niesymetryczne, dwufunkcyjne pochodne akrydyny	58
II.7.3. Niesymetryczne bisakrydyny – krótka charakterystyka	59
II.7.4. Metabolizm monomerów badanych niesymetrycznych bisakrydyn	60
II.8. Podsumowanie	61
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	62
III.1. Materiały	62
III.1.1. Związki przeciwnowotworowe	62
III.1.2. Odczynniki chemiczne.....	62
III.1.3. Bufory	63
III.1.4. Enzymy	64
III.1.5. Linie komórkowe ludzkich nowotworów jelita i wątroby	64
III.1.6. Odczynniki stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej	64

III.2. Stosowana aparatura i sprzęt laboratoryjny	65
III.2.1. Aparatura chromatograficzna	65
III.2.2. Pozostały sprzęt laboratoryjny.....	65
III.3. Metody doświadczalne.....	66
III.3.1. Rozpuszczalność bisakrydyn	66
III.3.2. Badanie czystości i stabilności bisakrydyn.....	66
III.3.3. Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej.....	67
III.3.4. Metabolizm bisakrydyn wobec enzymów mikrosomalnych	67
III.3.5. Metabolizm bisakrydyn wobec enzymów rekombinantowych	70
III.3.6. Badanie wpływu bisakrydyn na aktywność enzymów w układach bezkomórkowych.....	72
III.3.7. Określanie parametrów kinetycznych zmian aktywności wybranych izoenzymów P450 3A4 i wybranych UGT wobec bisakrydyn.....	73
III.3.8. Warunki prowadzenia hodowli komórkowej	75
III.3.9. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT	76
III.3.10. Homogenizacja komórek HepG2.....	76
III.3.11. Oznaczanie stężenia białka - DC Protein Assay (BIO-RAD)	77
III.3.12. Metabolizm bisakrydyn w komórkach ludzkich nowotworów jelita	77
III.3.13. Wpływ bisakrydyn na aktywność enzymów UGT w komórkach linii HT-29	78
III.3.14. Analiza RP-HPLC	79
III.3.15. Analiza LC-MS.....	80
III.3.16. Analiza statystyczna	80
IV. WYNIKI	81
IV.1. Rozpuszczalność badanych bisakrydyn	81
IV.2. Trwałość i czystość badanych pochodnych bisakrydyny	82
IV.2.1. Trwałość i czystość pochodnych bisakrydyny w roztworach wodnych.....	82
IV.2.2. Trwałość pochodnych bisakrydyny w roztworach DMSO/H ₂ O	85
IV.2.3. Trwałość pochodnych bisakrydyny w roztworach DMSO/HEPES.....	88
IV.2.4. Identyfikacja produktów rozpadu badanych pochodnych bisakrydyn	89
IV.3. Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej	95
IV.3.1. Określenie optymalnej wartości pH fazy ruchomej	95
IV.3.2. Wybór wartości pH próbki przeznaczonej do analizy HPLC	97
IV.4. Metabolizm pochodnych bisakrydyny wobec enzymów mikrosomalnych	99
IV.4.1. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec nieaktywowanych enzymów mikrosomalnych wątroby szczura	99
IV.4.2. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2045 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych.....	101
IV.4.3. Analiza widm UV-vis metabolitów pochodnych bisakrydyny otrzymanych wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych	102
IV.5. Metabolizm pochodnych bisakrydyny wobec enzymów rekombinantowych.....	103
IV.5.1. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450	103
IV.5.1.1. P4503A4	103
IV.5.1.2. P4502C19	105

IV.5.1.3. Identyfikacja metabolitów otrzymanych wobec P450 2C19 i 3A4	107
IV.5.2. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów monooksygenaz flawinowych, FMO	109
IV.5.2.1. FMO1	110
IV.5.2.2. Identyfikacja metabolitów otrzymanych wobec FMO1	111
IV.5.2.3. FMO3 i FMO5	116
IV.5.3. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów UDP-glukurylotransferaz, UGT	120
IV.6. Metabolizm badanych bisakrydyn w komórkach nowotworowych	123
IV.6.1. Metabolizm bisakrydyn C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w komórkach HCT116	124
IV.6.2. Metabolizm pochodnej bisakrydyny C-2045 w komórkach HCT116-1A10	128
IV.6.3. Cytotoksyczność i metabolizm badanych związków w komórkach HT-29	129
IV.6.3.1. Cytotoksyczność badanych związków w komórkach HT-29	129
IV.6.3.2. Metabolizm badanych związków w komórkach HT-29 – stężenie 25 µM	131
IV.6.3.3. Metabolizm badanych związków w komórkach HT-29 – stężenie 5 µM ..	134
IV.6.3.4. Identyfikacja produktów przemian badanych bisakrydyn powstających w wyniku ich inkubacji z komórkami nowotworowymi	136
IV.7. Wpływ badanych pochodnych bisakrydyny na aktywność wybranych izoenzymów rekombinantowych	138
IV.7.1. Wpływ badanych bisakrydyn na aktywność izoenzymów P450 2C19 i 3A4	138
IV.7.2.1. P450 2C19	138
IV.7.2.2. P450 3A4	139
IV.7.2. Wpływ badanych pochodnych bisakrydyny na aktywność wybranych UGT	140
IV.7.2.1. UGT1A1	140
IV.7.2.2. UGT1A4	141
IV.7.2.3. UGT1A6	142
IV.7.2.4. UGT1A9	142
IV.7.2.5. UGT1A10	143
IV.7.2.6. UGT2B7	144
IV.7.2.7. UGT2B15	145
IV.7.2.8. UGT2B17	145
IV.7.3. Parametry inhibicji izoenzymów P450 3A4, UGT1A1 i UGT2B7 przez badane pochodne bisakrydyny	146
IV.7.3.1. Hamowanie P430 3A4 przez C-2045 i C-2053	146
IV.7.3.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT1A1	148
IV.7.3.3. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT2B7	150
IV.8. Badanie zmian aktywności katalitycznej UGT indukowanych przez pochodne bisakrydyny w komórkach nowotworowych	152
IV.8.1. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT w homogenatach komórek HepG2	152
IV.8.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT w komórkach HT-29	155
IV.9. Badanie aktywności izoenzymu P450 3A4 w homogenatach komórek HepG2	156
V. Dyskusja	158
V.1. Właściwości fizykochemiczne niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny	159

V.2. Metabolizm badanych pochodnych bisakrydyny w układach bezkomórkowych .	160
V.3. Metabolizm pochodnych bisakrydyny w komórkach nowotworowych jelita.....	164
V.4. Modulacje aktywności katalitycznej enzymów metabolizujących leki	166
V.5. Podsumowanie	171
WYKAZ LITERATURY.....	174

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW

3MC	frakcja enzymów mikrosomalnych komórek wątroby człowieka aktywowanych 3-metylocholantrenem (ang. human liver microsomes 3-methylcholanthrene-pretreated)
C-1212	5-dimetyloaminopropyloamino-imidazoakrydon
C-1305	5-dimetyloaminopropyloamino-8-hydroksytriazoloakrydon
C-1311	5-dietyloaminoetyloamino-8-hydroksyimidazoakrydon (Symadex)
C-1748	9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna (Capridine β)
C-20XY	badane związki, pochodne UA (C-2028, C-2041, C-2045, C-2053)
C-857	9-(2'-hydroksyetyloamino)-1-nitroakrydyna (Capridine α)
Dex	frakcja enzymów mikrosomalnych komórek wątroby człowieka aktywowanych dexametazonem (ang. human liver microsomes dexamethasone-pretreated)
DME	enzymy metabolizujące leki (ang. drug-metabolizing enzymes)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. dimethylsulfoxide)
EC₅₀	stężenie związku hamujące proliferację komórek w 50% (ang. half maximal effective concentration)
EPI	chlorowodorek epirubicyny (ang. epirubicin hydrochloride)
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpylanie (ang. electrospray ionization- mass spectrometry)
FMO	monooksygenaza flawinowa (ang. flavin-containing monooxygenase)
G-2045	glukuronid C-2045 (ang. C-2045 glucuronide)
HCT116	linia komórkowa nowotworu jelita grubego pochodzenia ludzkiego (ang. human colorectal carcinoma cell line)
HCT116-1A10	linia komórkowa nowotworu jelita grubego pochodzenia ludzkiego HCT116 z nadekspresją genu kodującego izoenzym UGT1A10 (ang. human colorectal carcinoma cell line overexpressed with UGT1A10 isoenzyme)
HepG2	linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby (ang. human hepatocellular carcinoma cell line)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)
HT-29	ludzka linia komórkowa gruczolaka jelita (ang. human colorectal adenocarcinoma cell line)
LC-MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas (ang. liquid chromatography with mass spectrometry)
M1-M4	metabolit C-20XY (ang. C-20XY metabolite)

M5	metabolit C-20XY, N-tlenek pochodnej bisakrydiny (ang. C-20XY metabolite, N-oxide of unsymmetrical bisacridine)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
P450	cytochrom P450 (ang. cytochrome P450)
PB	frakcja enzymów mikrosomalnych komórek wątroby człowieka aktywowanych fenobarbitalem (ang. human liver microsomes phenobarbitone-pretreated)
PBS	buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate-buffered saline)
RLM	frakcja enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura (ang. rat liver microsomes)
SN-38	7-etylo-10-hydroksykamptomecyna (ang. 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin)
TFK	7-hydroksy-4-(trifluorometylo)-kumaryna (ang. 7-hydroxy-4-(trifluoroethyl)coumarin)
TFP	dichlorowodorek trifluoperazyny (ang. trifluoperazine dihydrochloride)
UGT	UDP-glukuronylotransferaza (ang. UDP-glucuronosyltransferase)
UA	niesymetryczna pochodna bisakrydiny (ang. unsymmetrical bisacridine)
UDPGA	kwasy UDP-glukuronowy (ang. UDP-glucuronic acid)
Vmax	maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej (ang. maximum velocity)
Z₁	produkt hydrolizy UA, pochodna imidzoakrydonu (ang. products of UA hydrolysis, imidazoacridone derivative)
Z₂	produkt hydrolizy UA, pochodna akrydonu (ang. (ang. products of UA hydrolysis, acridone derivative)
Z₃	N-tlenek produktu Z ₁ (ang. N-oxide of product Z ₁)

STRESZCZENIE

W racjonalnej terapii przeciwnowotworowej dąży się nie tylko do zwiększenia jej skuteczności, ale również do ograniczenia działań niepożądanych, które mogą wystąpić podczas leczenia pacjenta. Wielokrotnie podkreśla się, że aby określić właściwości terapeutyczne potencjalnego leku przeciwnowotworowego niezbędne jest zbadanie jego szlaku przemian metabolicznych oraz aktywności i ekspresji genów enzymów metabolizujących ten lek w organizmie. Powszechnie wiadomo również, że niektóre leki modulują aktywność enzymów biorących udział w przemianach metabolicznych I i/lub II fazy biotransformacji w wyniku czego wpływają one na metabolizm innych leków w ramach tzw. oddziaływań lek-lek. Badania podstawowe są pierwszym etapem prac nad tworzeniem nowego leku. Kolejny etap nazywany jest przedkliniczną fazą badań. W tej części testów związek przechodzi próby na komórkach w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, podczas których ocenia się m. in. jego potencjalne działanie lecznicze, poznaje przemiany metaboliczne oraz wpływ na aktywność wybranych enzymów metabolizujących leki. Następnie, jeśli wyniki są zadowalające badany preparat może być testowany na zwierzętach doświadczalnych.

Przedmiotem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej są wybrane pochodne z grupy niesymetrycznych bisakrydyn o symbolach C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053, które wykazały aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wielu linii tj. prostaty, piersi, jelita i trzustki oraz hamowały wzrost ludzkich nowotworów przeszczepionych na nagie myszy [Konopa i in. 2019, Paluszkiewicz i in. 2020]. Zamierzeniem prowadzonych badań było z jednej strony określenie podatności tych związków na przemiany metaboliczne, z drugiej zaś zbadanie wpływu tych związków na aktywność katalityczną wybranych enzymów metabolizujących leki w systemach modelowych i komórkowych nowotworowych.

Otrzymane wyniki wskazały, że badane pochodne bisakrydiny wyróżnia w porównaniu z ich monomerycznymi analogami wiele nowych właściwości fizykochemicznych rzutujących na sposób ich podania i losów w organizmie. Ponadto wszystkie cztery związki podlegają w pewnym stopniu przemianom metabolicznym I fazy zarówno wobec enzymów mikrosomalnych, jak i ludzkich enzymów rekombinantowych P450 2C19 i 3A4, które prowadzą do czterech grup metabolitów (M1-4). W wyniku inkubacji związków C-2028, C-2045 i C-2053 z izoenzymem FMO1 otrzymano metabolity, których analiza HPLC-ESI-MS, jak i analiza HPLC-ESI-MS/MS fragmentów poszczególnych metabolitów wykazała, że są one N-tlenkami pochodnych bisakrydiny (M5). Natomiast żaden z badanych związków bezpośrednio nie metabolizował wobec izoenzymów FMO3 i FMO5. Następnie kontynuowano badania rozszerzając je o analizę metabolizmu badanych związków wobec wybranych rekombinantowych izoenzymów II fazy. Wyniki wskazały, że tylko związek C-2045, będący analogiem z grupą hydroksylową w pierścieniu imidzoakrydonu ulegał glukuronidacji wobec UGT1A1, 1A9 i 1A10. Przeprowadzono również badania nad metabolizmem badanych związków wobec trzech linii komórek nowotworowych

jelita: HCT116, HCT116-A10 i HT-29 o zróżnicowanej ekspresji wybranych izoenzymów UGT. W wyniku traktowania związkiem C-2045 zarówno w komórkach HCT116-1A10, jak i HT-29 otrzymano produkty reakcji glukuronidacji. Pozostałe związki nie wykazały zdolności do przemian metabolicznych we wszystkich trzech liniach komórkowych. Pomimo to wobec badanych komórek odznaczały się wysoką cytotoksycznością, a więc związki C-2028, C-2041 i C-2053, aby wykazać efekt terapeutyczny w komórkach nowotworowych nie wymagają uprzedniej biochemicznej aktywacji. Ponadto wszystkie cztery związki hamowały aktywność izoenzymów P4503A4 oraz modulowały aktywność UGT1A1 i UGT2B7, natomiast nie miały one wpływu na aktywność P4502C19. Zbadano również wpływ badanych związków na aktywność izoenzymów UGT w układach komórkowych, w homogenatach komórek linii HepG2 i w komórkach HT-29, charakteryzujących się różną ekspresją izoenzymów m. in. UGT1A1, 1A9, 1A10 i 2B7. Otrzymane wyniki wskazują, że w zależności od charakteru tkanki, a właściwie różnic ekspresji izoenzymów UGT w danej tkance, badane związki mogą powodować odmienny efekt.

Podsumowując, każdy z dwóch pierścieni (imidzoakrydonu i 1-nitroakrydiny) obecny w strukturze badanych pochodnych odgrywa swoją, inną rolę w wykazywanych przez nie właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Właściwości te różnią się też od tych wykazywanych przez ich monomeryczne analogi. Uzyskane informacje mogą być niezwykle przydatne podczas opracowywania, nowych spersonalizowanych terapii przeciwnowotworowych, które oprócz skuteczności będą się charakteryzować większym bezpieczeństwem w porównaniu z terapiami stosowanymi w leczeniu dotychczas.

ABSTRACT

The aim of antitumor therapy is not only the increase in its effectiveness but also the reduced adverse effects that may occur during a patient treatment. It is repeatedly emphasized that in order to determine therapeutic properties of a potential antitumor drug, it is necessary to study its metabolic pathway as well as the activity and expression of genes of enzymes metabolizing this drug in living organism. It is also well known that some drugs modulate the activity of enzymes involved in Phase I and/or Phase II metabolic transformations, and as a result, drug-drug interactions can be observed. Basic research is the first step in developing a new drug. The next step is called preclinical studies. Here, the drug is tested *in vitro* and *in vivo* and during these stages its therapeutic effect, ability to undergo metabolic changes and influence on the activity of selected drug metabolizing enzymes is assessed. If the results are satisfactory, the potential antitumor drug can be tested on experimental animals.

The subject of presented research was concerned on selected derivatives of unsymmetrical bisacridines: C-2028, C-2041, C-2045 and C-2053 which exhibited high cytotoxic activity against many tumor cells, i.e. prostate, breast, intestine and pancreas. These drugs inhibited also the growth of human tumors transplanted into nude mice [Konopa et al. 2019, Paluszkiwicz et al. 2020]. The aim of this research was to determine the ability of these compounds to undergo Phase I and II metabolism and study their influence on catalytic activity of selected drug-metabolizing enzymes in noncellular and cellular systems.

Obtained results indicate that C-2028, C-2041, C-2045 and C-2053 compounds demonstrated many new, compared to monomeric acridine derivatives, physicochemical properties which can influence the method of their administration and fate in the body. In addition, all four compounds were susceptible to Phase I metabolic changes in rat or human liver microsomes and with human recombinant isoenzymes P450 2C19 and 3A4 to four groups of metabolites (M1-4). The HPLC-ESI-MS analysis, as well as the fragments of individual metabolites obtained as a result of the HPLC-ESI-MS / MS analysis, confirmed that the incubation of C-2028, C-2045 and C-2053 compounds with FMO1 enzyme gave one metabolite - bisacridine N-oxides (M5). Tested compounds did not undergo metabolism directly with FMO3 or FMO5. Additionally, screening research showed that only C-2045 (analog with hydroxyl group) underwent glucuronidation with UGT1A1, 1A9 and 1A10. The susceptibility of this compound to glucuronidation was also investigated in three tumor cell lines: HCT116, HCT116-A10 and HT-29, differing in UGT isoenzymes expression. The formation of glucuronide was observed in both HCT116-1A10 and HT-29 cells after treatment with C-2045. Other compounds: C-2028, C-2041 and C-2053 did not undergo metabolic transformation in all tested tumor cells. Nevertheless, they were highly cytotoxic, what probably can mean that C-2028, C-2041 and C-2053 do not require the biochemical activation to exhibit antitumor effect. Moreover, all tested compounds modulated the activity of P4503A4, UGT1A1 and UGT2B7, but they had no effect on the activity of P4502C19. The ability to modulate the activity of UGT in cellular systems

(homogenates of HepG2 and HT-29 cells) by presented drugs was also investigated. The obtained results indicated that depending on the differences in the expression of metabolizing enzymes in a given tissue, the studied compounds may cause a different effect.

In conclusion, each of the two rings present in the structure tested derivatives (imidazoacridone and 1-nitroacridine) plays a different role in the physicochemical and biological properties displayed by unsymmetrical bisacridines. These properties also differ from those exhibited by their monomeric analogs. All this information can be extremely useful in the development of new and safer personalized anti-cancer therapies compared to those used in current antitumor strategies.

I. WSTĘP I CEL PRACY

Choroby nowotworowe wciąż stanowią bardzo poważny problem dla współczesnego świata. Pomimo dostępnego szerokiego wachlarza możliwości walki z chorobami nowotworowymi dzisiejsza medycyna nie jest wystarczająco skuteczna. Analizując najnowsze statystyki można zauważyć, że nowotwory są nadal drugą przyczyną zgonów wśród populacji ludzi [Nagai i in. 2017, Siegel i in. 2020]. Obecnie, dostępne metody terapeutyczne dzielą się na te oddziałujące bezpośrednio na tkankę nowotworową (zabiegi chirurgiczne i radioterapia) oraz na leczenie systemowe oparte najczęściej na chemioterapii, hormonoterapii lub immunoterapii [Michaels i in. 2016, Chamberlain i in. 2020].

Chemioterapia polega na podawaniu pacjentowi (w formie dożylnych zastrzyków lub infuzji, rzadziej natomiast w postaci tabletek) leku o właściwościach cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych w odpowiednio rozłożonym w czasie. [Michaels i in. 2016]. Niestety taki proces leczenia jest bardzo długotrwały i silnie obciążający organizm pacjenta. Dotychczas nie opracowano bezpiecznego leku przeciwnowotworowego, który w pełni byłby skuteczny w walce z większością typów nowotworów [Chamberlain i in. 2020]. Idealny lek powinien selektywnie niszczyć komórki zmienione nowotworowo, bez naruszenia równowagi biologicznej komórek prawidłowych. Jest to niezwykle trudne do osiągnięcia ze względu na brak istotnych różnic jakościowych w procesach biochemicznych zachodzących w komórkach zdrowych i komórkach nowotworowych. Dlatego też podczas stosowania chemioterapii lub po jej zakończeniu istnieje duże zagrożenie wystąpienia poważnych działań niepożądanych [Starland-Davenporti in. 2008, Li i in. 2011]. Działania te występują bardzo często, dlatego poszukiwanie skutecznej, a zarazem bezpiecznej terapii przeciwnowotworowej, stanowi jedno z większych wyzwań dla środowiska naukowego [Nagai i in. 2017]. Badania nad opracowaniem nowych związków o niskiej toksyczności ogólnej, a jednocześnie o silnej aktywności przeciwnowotworowej realizowane są na całym świecie, ale tylko niewielka liczba zsyntetyzowanych związków kwalifikuje się do dalszych badań.

Dotychczas w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w zespole kierowanym przez Profesorów Andrzeja i Zygmunta Ledóchowskich, następnie Profesora Jerzego Konopę, zsyntetyzowano wiele potencjalnych związków przeciwnowotworowych, w tym pochodnych akrydyny o wysokiej aktywności cytotoksycznej. Jednym z nich był pierwszy i jak dotąd jedyny polski lek przeciwnowotworowy, Ledakrin (symbol roboczy C-283) wprowadzony do lecznictwa w 1974 r. pod nazwą Nitracrine^R [WHO 1976, Radzikowski i in. 1974]. Był on stosowany m. in. w terapii raka płuc, okrężnicy, jajnika oraz piersi [Gniazdowski i in. 1979]. Jednakże pomimo wykazanej wysokiej aktywności przeciwnowotworowej został wycofany z lecznictwa ze względu na właściwości mutagenne i występowanie niepożądanych efektów ubocznych [Ferguson i in. 1987, Piotrowska-Sowińska i in. 1976]. Otrzymano również nowe pochodne Ledakrinu – związek C-857 (Capridine α), skierowany do I fazy badań klinicznych na początku lat 80, które m. in. ze względu

na zbyt wysoką toksyczność nie zakończyły się sukcesem oraz związek C-1748 (Capridine β), należący do pochodnych 1-nitroakrydyny nowej generacji o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych [Konopa i in. 1981]. W tym samym zespole naukowym zsyntetyzowano również związek C-1311 (Symadex^R), wykazujący właściwości cytotoksyczne i przeciwnowotworowe, a zarazem ograniczoną mutagenność i niski potencjał tworzenia wolnych rodników [Cholody i in. 1996, Berger i in. 1996, Mazerska i in. 1998]. Przeszedł on pomyślnie przez I fazę badań klinicznych i został skierowany do II fazy, jako aktywny w leczeniu nowotworów jelita grubego i piersi [Isambert i in. 2006, Thomas i in. 2008, Isambert i in. 2010]. Natomiast ostatnio zsyntetyzowano kilka grup nowych pochodnych akrydyny o wysokiej aktywności cytotoksycznej tzw. niesymetryczne bisakrydyny (ang. Unsymmetrical bisAcridines, UAs) [Konopa i in. 2019, Paluszkiewicz i in. 2020] Należą do nich m. in. związki o symbolach C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053, które są przedmiotem niniejszej pracy.

W ostatnich latach obserwuje się również intensywne nasilenie badań w dziedzinie genetyki, biologii nowotworów i biotechnologii. Umożliwia to lepsze poznanie mechanizmów kontrolujących cykl życiowy komórki nowotworowej i zdefiniowanie czynników, które mogą być odpowiedzialne za proces nowotworzenia [Siegel i in. 2020]. Ponadto badania metabolizmu in vitro związków, które mają szansę stać się w przyszłości lekami, pozwalają zidentyfikować enzymy odpowiedzialne za ich przemiany metaboliczne [Plant i in. 2004, Mróz i in. 2018]. Określenie szlaków biotransformacji, jakim podlega potencjalny lek przeciwnowotworowy ważne jest z punktu widzenia zbadania aktywności powstających metabolitów, jak również wykazania, które z nich odpowiedzialne są za wykazywany, właściwy efekt terapeutyczny. Poznanie szlaków metabolicznych ułatwia również analizę oddziaływań pomiędzy lekami. Jest to szczególnie ważne przy stosowaniu terapii wielolekowej, gdzie interakcjom mogą podlegać nie tylko związki wyjściowe, ale również ich metabolity [Yang i in. 2017, Bejrowska i in. 2018]. Dodatkowo obie grupy mogą oddziaływać na poszczególne enzymy metabolizujące, powodując inhibicję lub indukcję biotransformacji innych leków. W konsekwencji może to doprowadzić do zmiany właściwości farmakokinetycznych znanych już leków, które zostały podane w ramach terapii. Co więcej, dany lek może zahamować aktywność tego samego enzymu, który go metabolizuje. Zjawisko takie znane jest pod nazwą inhibicji samobójczej. W konsekwencji, zmienić się może zarówno efekt terapeutyczny jak i toksyczny działania leku [Silverman i in. 1995]. Powyższe relacje indukcja/inhibicja enzymów metabolizujących leki są szczególnie istotne w przypadku wprowadzania ciągle nowych metod chemoterapii, w których stosuje się leczenie kombinowane - pacjentom podaje się więcej niż jedną substancję aktywną.

Chemoterapia przeciwnowotworowa nie zna obecnie leku, który wykazywałby pełną skuteczność leczenia po zastosowaniu monoterapii [Michaels i in. 2016]. Natomiast określenie wpływu leków na przemiany metaboliczne innych substancji jest pierwszym etapem do szerszego poznania i zrozumienia ich działania na organizm. W dalszej kolejności należy określić, jaki mechanizm odpowiada za efekty tych interakcji [Zheng i in. 2011, Martínez-Paz i in. 2012]. Jednoczesne stosowanie wielu leków, bez znajomości mechanizmów ich działania, tzw.

polipragmazja staje się przyczyną nasilenia niebezpiecznych interakcji lek-lek, które mogą prowadzić nawet do śmierci pacjenta [Hajjar i in. 2007, Pawłowska i in. 2011, Mohamed i in. 2020]. Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż wśród pacjentów obserwowane są różnice w reakcji na niektóre leki, tzw. różnice międzyosobnicze. Najczęściej wynikają one z polimorfizmu genetycznego enzymów metabolizujących, który objawiać się może wzrostem, obniżeniem lub brakiem aktywności białka enzymatycznego. Liczne badania dowodzą, że genetycznie uwarunkowane różnice w odpowiedzi na standardowe dawki leków dotyczą w szczególności farmakoterapii przeciwnowotworowej ze względu na poważną toksyczność i wąski indeks terapeutyczny leków cytotoksycznych. Ponadto wykazano, że w zależności od charakteru tkanki nowotworowej, a właściwie od różnic w ekspresji enzymów metabolizujących leki w danej tkance, preparaty przeciwnowotworowe mogą powodować odmienny efekt [Starland-Davenport i in. 2008, Bejrowska i in. 2018, Pawłowska i in. 2020]. Zatem szczegółowa wiedza o warunkach ekspresji i zmiany aktywności enzymów metabolizujących leki pełnią ważną rolę w wyborze odpowiedniej chemioterapii dla danego pacjenta.

Wobec powyższego, celem badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było **z jednej strony zbadanie przemian metabolicznych *in vitro* nowych pochodnych bisakrydyny tj. C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w układach bezkomórkowych i w komórkach nowotworowych, z drugiej zaś określenie wpływu tych pochodnych na aktywność enzymów metabolizujących leki w modelowych układach enzymatycznych i w komórkach nowotworowych, czyli w docelowym miejscu ich działania.** Niniejsze badania mają z jednej strony znaczenie poznawcze, jak również powinny w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych, a zarazem bezpiecznych procedur terapii przeciwnowotworowych, w których stosowane będą niesymetryczne pochodne bisakrydyny.

Zadania badawcze, których realizacja pozwoliła osiągnąć główny cel pracy, były następujące:

1. Zbadanie wybranych właściwości fizykochemicznych związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w celu oceny zachowania się grupy niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny w różnych warunkach eksperymentalnych i fizjologicznych.
2. Poznanie szlaków przemian metabolicznych związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w układach bezkomórkowych z udziałem wybranych enzymów I i II fazy biotransformacji.
3. Zbadanie podatności badanych pochodnych bisakrydyny na przemiany metaboliczne w komórkach nowotworowych o różnej ekspresji enzymów metabolizujących.
4. Ocena wpływu badanych związków na aktywność wybranych enzymów metabolizujących leki w układach bezkomórkowych i w komórkach nowotworowych

Ad.1. Określono czystość, stabilność i rozpuszczalność związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w roztworach wodnych i w DMSO. Rozpuszczalność zbadano również

w różnych roztworach buforowych tj. buforze fosforanowo-potasowym, Tris, HEPES w celu wyboru do badań odpowiedniego środowiska reakcji metabolizmu w układach bezkomórkowych. Dla trzech związków C-2028, C-2041, C-2045 wyznaczano wartości pKa, dzięki czemu możliwa była ocena zachowania tych związków w różnych przedziałach pH, w tym w pH fizjologicznym. Na tym etapie zoptymalizowano również warunki prowadzenia analizy chromatograficznej.

Ad.2. Przy zastosowaniu metod analizy HPLC i LC/MS zbadano podatność związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na metabolizm wobec enzymów I fazy biotransformacji obecnych w frakcji mikrosomalnej wątroby szczura i człowieka, a także wobec wybranych ludzkich izoenzymów rekombinantowych z rodziny cytochromu P450: P450 2C19 i 3A4 oraz monooksygenaz flawinowych: FMO1, FMO3 i FMO5. Ponadto określono podatność badanych związków na biotransformację z udziałem enzymów II fazy metabolizmu, UDP-glukuronylotransferaz, UGT stosując wybrane ludzkie izoenzymy rekombinantowe: UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 i UGT 2B17. Wszystkie otrzymane produkty analizowano i identyfikowano za pomocą spektroskopii UV-vis i techniki spektrometrii mas.

Ad.3. Badania metabolizmu badanych związków w układach komórkowych przeprowadzono z zastosowaniem trzech linii komórkowych ludzkich nowotworów jelita: HCT116, HCT116-1A10 i HT-29 różniących się ekspresją izoenzymów UGT. Dla wszystkich związków określono cytotoksyczność w stosunku do badanych komórek. Następnie opracowano warunki inkubacji komórek ze związkiem oraz warunki analizy chromatograficznej dla składu pożywek po hodowli i dla ekstraktów komórkowych. Badania te posłużyły również do oceny wpływu metabolizmu na wykazywany przez badane pochodne bisakrydyny efekt cytotoksyczny.

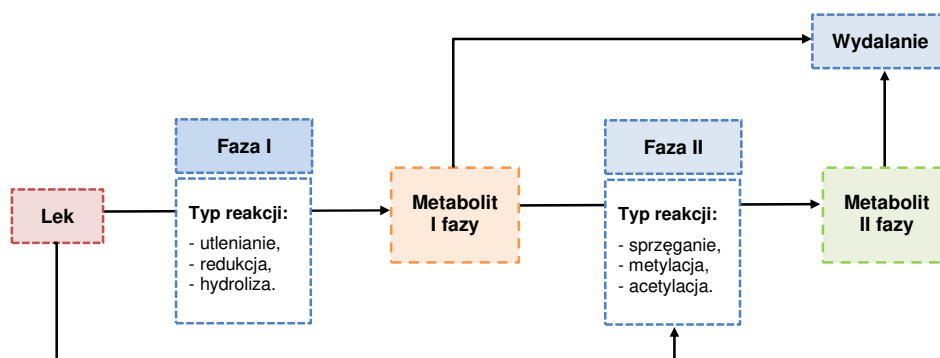
Ad.4. Wpływ badanych związków na aktywność katalityczną wybranych izoenzymów P450 i UGT zbadano stosując modelowe układy enzymatyczne i komórkowe. Zastosowano ludzkie izoenzymy rekombinantowe P450 2C19 i 3A4 oraz UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15 i 2B17, homogenaty z komórek linii HepG2 oraz komórki linii HT-29. Opracowano warunki prowadzenia reakcji metabolizmu standardowych substratów oraz warunki analizy chromatograficznej. Wyznaczono również parametry kinetyczne dla modulacji aktywności rekombinantowych izoenzymów P450 3A4 oraz UGT1A1, UGT2B7 i UGT zawartych w homogenacie linii komórkowej HepG2.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

II.1. Biotransformacja leków

II.1.1. Ogólna charakterystyka procesu biotransformacji

Większość leków dostarczanych do organizmu, aby wywołać właściwy efekt terapeutyczny, musi ulec przemianom metabolicznym, czyli tzw. biotransformacji. Jest to naturalny proces determinujący profil farmakokinetyczny wielu leków. Każdy z nich ma własny szlak przemian metabolicznych zachodzący z udziałem jednego lub kilku układów enzymatycznych. W skutek biotransformacji, leki stają się lepiej rozpuszczalne w wodzie i znacznie łatwiej usuwane są z naszego organizmu. Jeśli równowaga tego procesu zostanie zachwiana, w organizmie może nastąpić wzrost stężenia środka farmaceutycznego, czyli jego akumulacja. To w efekcie może skutkować osiągnięciem poziomu toksycznego i powstaniem różnorodnych efektów ubocznych. Dowiedziono również, że przemiany metaboliczne mogą mieć wpływ na zmniejszenie efektów toksycznych, jak również na osłabienie działania terapeutycznego danego leku [Gonzalez i in. 2006, Murray i in. 2009]. Reakcje, którym ulega lek po wniknięciu do organizmu można podzielić na trzy fazy biotransformacji (Rys.II.1.).



Rys. II.1. Metabolizm leków w komórkach wątroby [Mutschler 2010].

II.1.1.1 Faza I

Na etapie I fazy biotransformacji wyspecjalizowane enzymy (głównie enzymy mikrosomalne: cytochromy P450 i monooksygenazy flawinowe) katalizują reakcje utleniania, redukcji bądź hydrolizy leków o charakterze względnie lipofilowym. W efekcie, modyfikują wyjściową strukturę cząsteczki leku, przekształcając go w bardziej hydrofilowe metabolity, posiadające polarne, reaktywne grupy funkcyjne np. karboksylową, hydroksylową lub amonową. Przemiany te mają duże znaczenie z klinicznego punktu widzenia, bowiem wywierają ogromny wpływ m.in. na farmakodynamikę i farmakokinetykę stosowanych leków. Największy udział w metabolizmie oksydacyjnym wykazują izoenzymy cytochromu P450, ponieważ katalizują przemiany ok. 90% stosowanych obecnie środków farmaceutycznych. Z tego powodu enzymy te zalicza się do tzw. enzymów metabolizujących leki (ang. drug-metabolizing enzymes, DME).

Bardzo rzadko zdarza się, aby lek nie ulegał biochemicznej modyfikacji w organizmie żywym. W większości przypadków produkty metabolizmu powstające w fazie I są przekształcane dalej i ulegają II fazie biotransformacji. Niekiedy zdarza się, iż związek podlega przemianom tylko w fazie I. W takim przypadku powstają tzw. reaktywne metabolity, które mogą być bardziej toksyczne od związków wyjściowych i powodować uszkodzenia białek komórkowych lub cząsteczek DNA oraz RNA [Gonzalez i in. 2006, Murray i in. 2009].

II.1.1.2. Faza II

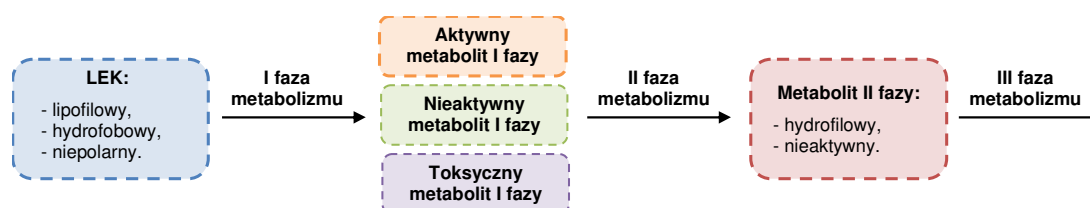
Metabolity powstałe podczas I fazy ulegają dalszym przemianom, czyli sprzęganiu z endogennym substratem np. glutationem, aminokwasem lub z anionami kwasu octowego, siarkowego czy glukuronowego. Reakcje II fazy katalizowane są głównie przez enzymy z rodzin transferaz np. UDP-glukuronylotransferaz (UGT) i S-transferaz glutationu (GST). Produkty powstałe w wyniku tych modyfikacji są lepiej rozpuszczalne w środowisku wodnym, a w konsekwencji łatwiej usuwane z organizmu. Ponadto metabolity II fazy są zazwyczaj mniej toksyczne niż związek pierwotny, zatem reakcje te mają charakter detoksykacyjny. W przeciwieństwie do enzymów I fazy, których rola oraz mechanizmy aktywności zostały dość dobrze poznane, enzymom II fazy poświęcono dotychczas znacznie mniej uwagi [Gonzalez i in. 2006, Murray i in. 2009].

II.1.1.3. Faza III

Za eliminację z komórki hydrofilowych produktów fazy II odpowiada szereg pomp tzw. transporterów błonowych. Ze względu na barierę jaką stanowi lipofilowa błona komórkowa transport ten odbywa się zwykle w sposób aktywny i ma charakter antyportu [Murray i in. 2009, Mutschler i in. 2010]. Procesy te przyjęto traktować jako III fazę biotransformacji leków (Rys.II.2.). Najliczniejszą rodzinę białek transportowych tworzą transportery ABC (ang. ATP-binding cassette transporters). Białka te są ważnymi elementami bariery krew-narząd, wpływają na biologię komórek nowotworowych i niestety mogą uczestniczyć w rozwoju oporności wielolekowej.

II.1.2. Modyfikacje metaboliczne leków

W wyniku przemian metabolicznych ze związku aktywnego farmakologicznie może powstać produkt działający podobnie, ale też charakteryzujący się działaniem słabszym lub wręcz toksycznym dla organizmu (Rys. II.2.).



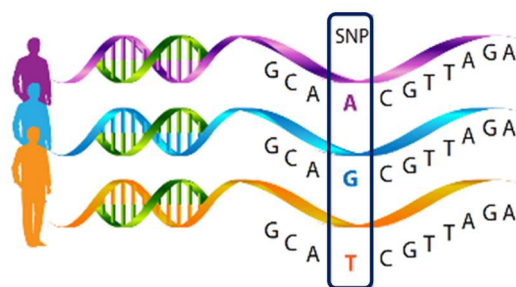
Rys. II.2. Modyfikacje właściwości biologicznych leków [Rang i in. 2007]

W procesie biotransformacji może również dojść do przekształcenia związku nieczynnego farmakologicznie w metabolit o właściwościach terapeutycznych. Właśnie takim przemianom ulegają tzw. proleki. W takiej formie stosowane są niektóre leki przeciwnowotworowe. Swoją aktywność przejawiają dopiero w obrębie tkanek zaatakowanych przez nowotwór, pod wpływem działania układu enzymatycznego komórki nowotworowej, w wyniku czego ryzyko wystąpienia efektów niepożądanych u pacjenta jest znacznie niższe [Gonzalez i in. 2006, Murray i in. 2009].

II.1.3. Międzyosobnicze różnice w metabolizmie leków

Ważnym elementem właściwości farmakologicznych leku jest fakt, że nie u wszystkich pacjentów będzie wywierał identyczny efekt terapeutyczny. Aktywność enzymów detoksykacyjnych, odpowiedzialnych za deaktywację związków mogących mieć szkodliwy wpływ na organizm, podporządkowana jest szeregowi czynników zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych. Udowodniono, że liczne substancje, w tym niektóre przyjmowane leki, mogą wywierać znaczący wpływ na stopień metabolizmu innych leków poprzez inhibicję lub indukację aktywności katalitycznej enzymów metabolizujących [Yang i in. 2017].

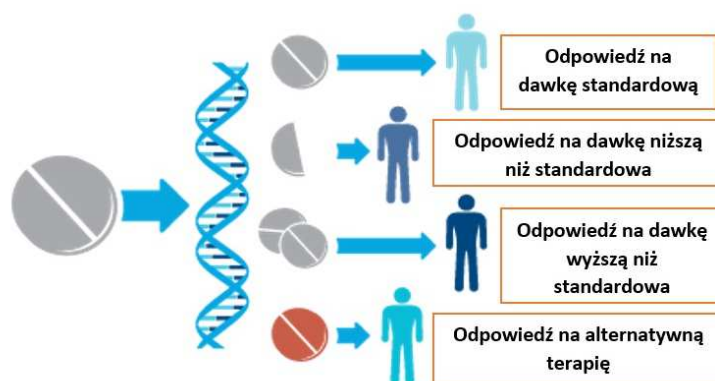
Ponadto liczne badania dowodzą, że na odmienny przebieg biotransformacji leku w organizmie wpływają nie tylko czynniki takie jak: środowisko, wiek, płeć, dieta, jak i stan fizjologiczny organizmu pacjenta, ale również uwarunkowanie genetyczne. Zmienność genetyczna w genomie człowieka jest zjawiskiem powszechnym. Ostatnie badania dowodzą, że genetycznie uwarunkowane różnice w odpowiedzi na standardowe dawki leków dotyczą w szczególności farmakoterapii przeciwnowotworowej ze względu na poważną toksyczność i wąski indeks terapeutyczny tej grupy leków [Li i in. 2011]. Problem ten zasługuje na szczególne uwzględnienie w planowaniu chemioterapii nowotworów, bowiem wrodzone różnice w metabolizmie leków przeciwnowotworowych sprawiają, że przy standardowym dawkowaniu leków u niektórych pacjentów występują poważne powikłania toksyczne, a u innych leczenie jest suboptymalne. Najczęstszą przyczyną odmiennych reakcji na podany specyfik są zmiany w sekwencji nukleotydów genów kodujących białka enzymatyczne odpowiedzialne za transformację metaboliczną leków.



Rys. II.3. Polimorfizm genetyczny (SNP)

[www.whatisdna.net/wiki/single-nucleotide-polymorphisms/, dostęp 2020-02-28]

Pierwsze zmiany mają najczęściej charakter polimorfizmu genetycznego (Rys.II.3.). W 90% jest to polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP - single nucleotide polymorphism), czyli zmiana na poziomie pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA, w wyniku której powstają różne warianty danego genu. [Indelman i in. 2005, Ekhardt i in. 2009, Li i in. 2011]. Niektóre jego warianty mogą mieć bezpośredni wpływ na efektywność ważniejszych ścieżek metabolicznych (Rys. II.4.), dlatego pacjentów klasyfikuje się według czterech odmiennych grup fenotypowych: osoby wolno metabolizujące lek (PM – poor metabolizer), osoby ze zmniejszonym metabolizmem leku (IM – intermediate metabolizer), osoby z prawidłowym metabolizmem leku (EM – efficient metabolizer) i osoby bardzo szybko metabolizujące lek (UM – ultrarapid metabolizer) [Li i in. 2011].



Rys. II.4. Polimorfizm genetyczny a efekt terapeutyczny leku
[opracowanie własne na podstawie: <http://genelex.com/patients/>, dostęp 2020-02-28]

U osób z metabolizmem prawidłowym (fenotyp EM) standardowe dawki leku będą tolerowane prawidłowo. Natomiast u osób, które słabo lub w ogóle nie metabolizują danego leku (PM) do postaci nieaktywnej farmakologicznie może dochodzić do nasilonego działania leku, a także jego kumulacji, czego skutkiem jest zwiększenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych podczas stosowania terapii. Zatem u tych osób należy stosować dużo mniejsze dawki niż standardowe. Szczególnie dotyczy to leków o niskim współczynniku terapeutycznym. Osoby wykazujące bardzo szybkie tempo przemian metabolicznych (UM), aby osiągnąć efektywne, terapeutyczne stężenie leku, wymagać będą większej dawki farmaceutyku, niż standardowa. Wzmoczony proces biotransformacji tych osób prowadzić będzie do szybkiej eliminacji leku, a w konsekwencji krótszego czasu działania, czyli potencjalnie jego niższej skuteczności. Z drugiej strony, gdy enzym odpowiada za przemianę proleku do jego formy aktywnej u osób fenotypem UM może dojść do wytworzenia toksycznego poziomu aktywnej formy leku. Z kolei u pacjentów z fenotypem PM w przypadku podania proleku należy spodziewać się niewielkiego efektu terapeutycznego lub wręcz jego braku [Li i in. 2011].

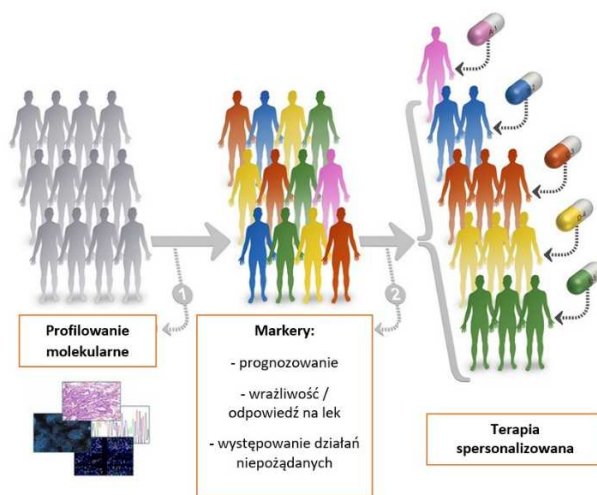
1.1.4. Spersonalizowana terapia przeciwnowotworowa

Nowotwory stanowią wciąż jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Pomimo, iż stosując terapię przeciwnowotworową nowymi lekami uzyskuje się istotną poprawę zdrowia

u niektórych pacjentów, nadal w znacznej grupie chorych obserwuje się działania niepożądane przy równoczesnej niskiej skuteczności leczenia. Szacuje się, iż co roku w Stanach Zjednoczonych umiera około 100 000 osób z powodu wystąpienia ubocznych działań leków, w tym leków przeciwnowotworowych [Murray i in. 2009]. Ustalenie i wybór schematu dawkowania leku, szczególnie dla pacjentów z zaawansowanym stadium choroby napotyka wiele trudności. Konieczne jest bowiem podanie możliwie wysokiej dawki, związanej z możliwie najniższym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych, pamiętając przy tym, że leki stosowane w chemoterapii przeciwnowotworowej charakteryzują się wąskim indeksem terapeutycznym.

Ponadto od wielu wieków w medycynie stosowane było łączenie podobnych chorób i ich objawów w jednolite grupy. Wszystko to miało na celu zwiększenie efektywności przyswajania wiedzy medycznej, która przy tak szybkim rozwoju nauki, rozrasta się w dużym tempie. Jednak w dzisiejszych czasach bardzo ważną potrzebą stało się dążenie do indywidualnego leczenia chorego. Doświadczony lekarz wie, że „każdy pacjent choruje inaczej”. Medycyna personalizowana to całkiem nowe podejścia do procesu diagnostyczno-terapeutycznego szczególnie w dziedzinie chorób nowotworowych [Budin-Ljosne i in. 2015, Fronczak 2016].

Obecnie, w przypadku terapii przeciwnowotworowych próbuje się wyselekcjonować tych chorych, u których istnieje duże prawdopodobieństwo rozwinięcia się silnej odpowiedzi toksycznej. Rozwój farmakogenetyki przyczynił się do lepszego zrozumienia indywidualnych różnic w toksyczności oraz do opracowania nowych, racjonalnie zaprojektowanych, bezpieczniejszych i bardziej dostępnych leków. [Tan i in. 2013]. Medycyna stratyfikowana dzieli pacjentów na grupy w oparciu o ich genetycznie uwarunkowane ryzyko wystąpienia chorób lub ich reakcje na leczenie, w celu zaoferowania pacjentom leczenia celowanego - konkretnie dopasowanego do danej grupy (Rys II.5.).



Rys. II.5. Spersonalizowana terapia przeciwnowotworowa
[opracowanie na podstawie: <https://pct.mdanderson.org/#/> dostęp dnia: 2020-02-26]

Uważa się, iż nowe spojrzenie na terapię przeciwnowotworową przyczyni się w znacznym stopniu do zwiększenia skuteczności farmakoterapii. Możliwe stanie się również zidentyfikowanie, przed zastosowaniem leku, polimorfizmów genetycznych u pacjentów silnie

podatnych na toksyczne działanie leków [Wilkinson 2005, Murray i in. 2009]. Przykłady stosowanych terapii celowanych przedstawiono w Tabeli II.1

Tabela.II.1. Przykłady terapii celowanej wykorzystywane do leczenia pacjentów chorych na nowotwór [Fronczak 2016]

Nowotwór	Lek	Cel	Badany gen/białko	Rodzaj badania	Metoda badania
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	Imatinib	BCR/ABL1	BCR/ABL	obecność fuzji BCR/ABL oraz monitorowanie ilości BCR/ ABL1 w trakcie leczenia	RT-PCR, RQ-PCR
Rak piersi z nadekspresją HER2	Trastuzumab	HER2	HER2	obecność nadekspresji HER2/amplifikacji HER2	IHC, FISH
Rak jelita grubego	Cetuksymab Panitumumab	EGFR	KRAS, NRAS	obecność mutacji w KRAS, NRAS	sekwencjonowanie Sangerowskie DNA, qPCR, NGS
Rak jajnika	Olaparib	PARP-1	BRCA1/2	badanie obecności mutacji w BRCA1/2	sekwencjonowanie Sangerowskie DNA, qPCR, NGS

Wymienione powyżej działania posiadają wspólny cel: zapewnienie „odpowiedniemu pacjentowi odpowiedniego leku w odpowiedniej dawce i w odpowiednim czasie”. Pozwoli to nie tylko na optymalizację leczenia w aspekcie medycznym (zastosowanie bardziej skutecznej terapii), ale również w aspekcie ekonomicznym, ponieważ zastosowanie właściwego leczenia pozwoli uniknąć wydatków spowodowanych leczeniem, które okazałyby się nieskuteczne [Fronczak 2016].

II.2. Cytochromy P450 (I faza metabolizmu)

II.2.1. Ogólna charakterystyka enzymów cytochromu P450

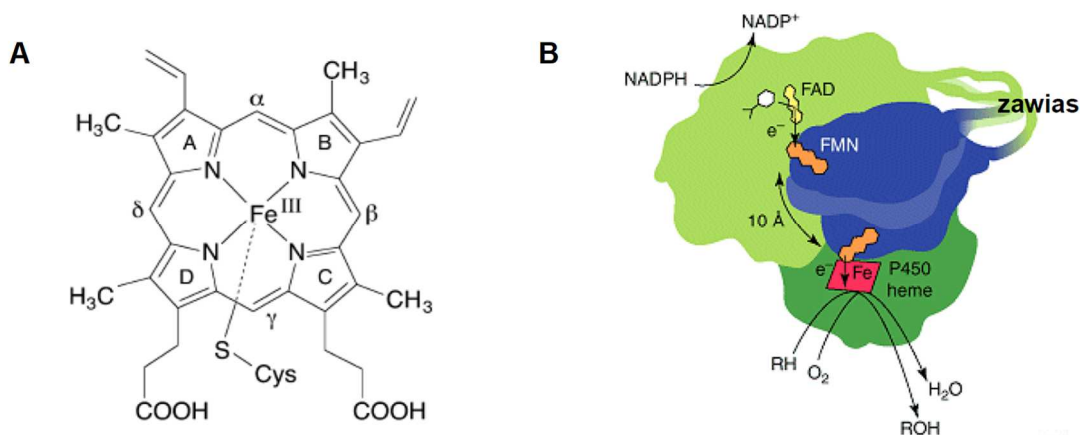
Cytochromy P450 (ang. cytochrome P450, P450) to liczna i wielofunkcyjna grupa białek enzymatycznych wykazujących aktywność monooksygenaz [Isin i in. 2007, Manikandan i in. 2018]. Biorą one udział w I fazie przemian metabolicznych ksenobiotyków. Występują we wszystkich organizmach żywych, począwszy od bakterii, poprzez grzyby, rośliny, do zwierząt i ludzi. Obecne są we wszystkich typach komórek ssaków, za wyjątkiem dojrzałych erytrocytów. Szczególnie wysoką aktywność zróżnicowanych izoenzymów P450 stwierdza się w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów. Białka z grupy cytochromu P450 występują także m. in. w komórkach płuc, nerek, mózgu i jąder, jednak ich łączna aktywność jest tam niższa, niż w wątrobie (Tab.II.2.). Ludzkie izoenzymy cytochromu P450 kodowane są przez 57 genów. W oparciu o strukturę pierwszorzędową izoenzymy cytochromu P450 zostały zaklasyfikowane do 18 rodzin i 43 podrodzin [Nelson 2009, Guengerich 2020].

Tabela.II.2. Zawartość całkowitej frakcji P450 w wybranych ludzkich tkankach [Hrycay i in. 2008]

Tkanka	Zawartość P450 [nmol/mg]
wątroba	0,30 - 0,60
nadnercza	0,23 - 0,54
jelito cienkie	0,03 - 0,21
mózg	0,10
nerki	0,03
płuca	0,01
jądra	0,01

II.2.1.1. Struktura cytochromów P450

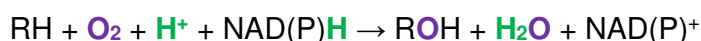
Cytochromy P450 to hemoproteiny o masie cząsteczkowej od 42 do 62 kDa, związane z błoną retikulum endoplazmatycznego oraz wewnętrzną błoną mitochondrialną. Hem, stanowiący grupę prostetyczną tych enzymów, zawiera wyekspozowany w centrum aktywnym atom żelaza (Fe), który związany jest koordynacyjnie z czterema atomami azotu pierścienia porfirynowego i dwoma osiowymi ligandami, z których jeden stanowi reszta cysteiny (Rys.II.6A). W stanie spoczynkowym cytochromy P450 występują w równowadze pomiędzy strukturą sześciokoordynacyjnego niskospinowego jonu Fe(III) z cząsteczką wody w pozycji trans do endogennego ligandu cysteinowego i pięciokoordynacyjnego wysokospinowego jonu Fe(III) z resztą cysteiny jako jedynym ligandem osiowym. Hem ułożony jest równoległy do powierzchni błony, w której zakotwiczone jest białko P450. Wszystkie izoenzymy cytochromu P450 zawierają ten sam kompleks porfirynowo-hemowy jako centrum katalityczne, natomiast poszczególne izoformy różnią się między sobą sekwencją aminokwasów, która wpływa na zmianę topografii ich miejsca aktywnego [Isin in. 2007, Potęga 2010]. Cytochromy P450 są jednym z głównych składników układu wieloczynnościowej monooksydazy (ang. mixed function oxydases, MFO), w skład którego wchodzi także NADPH-reduktaza cytochromu P450 i fosfatydylocholina [Bachmann 2007, Potęga 2010] (Rys.II.6B).



Rys.II.6. **A** - centrum porfirynowo-żelazowe cytochromów P450, **B** - schemat kompleksu enzymatycznego MFO: NADPH-reduktaza cytochromu P450 (kolor jasnozielony), cytochrom P450 (kolor ciemnozielony), fosfatydylocholina (kolor niebieski) [Potęga 2010, Ortiz 2015].

II.2.1.2. Funkcje i mechanizm działania izoenzymów cytochromu P450

Zasadniczą funkcją cytochromów P450 jest kataliza reakcji utleniania związków endo- i egzogennych na drodze monooksygenacji, w której jeden z dwóch atomów cząsteczki tlenu wbudowywany jest do cząsteczki substratu. W reakcji tej izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub z NADH i poprzez inne przenośniki elektronów przenoszą go na cząsteczkę tlenu [Bachmann 2007, Potęga 2010, Manikandan i in. 2018] (Rys.II.7.).

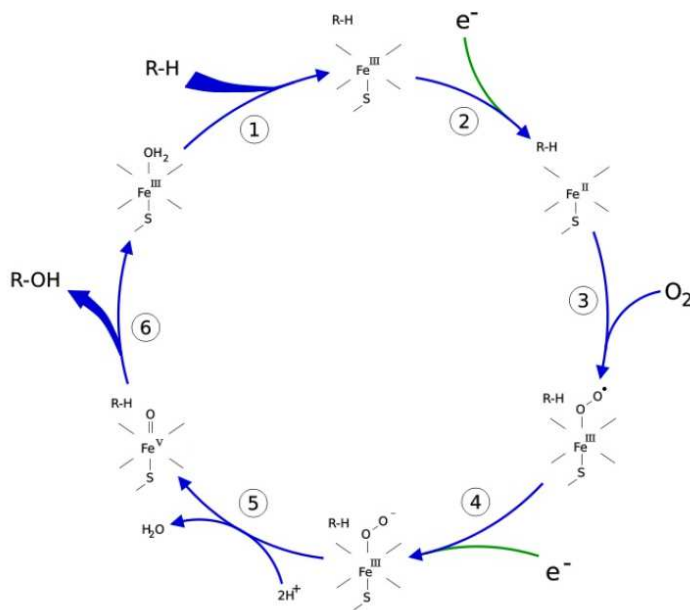


gdzie RH — substrat, ROH — produkt

Rys.II.7. Schemat reakcji utleniania związków endogennych i egzogennych katalizowanej przez P450 [Bachmann 2007, Potęga 2010].

Przedstawiony proces odgrywa istotną rolę w reakcjach endogennych np. w syntezie cholesterolu, a także w dalszych przekształceniach cholesterolu w hormony steroidowe i sole kwasów żółciowych. Cytochromy P450 są także ważnym elementem w metabolizmie ksenobiotyków (leki, zanieczyszczenia środowiska, mykotoksyny czy konserwanty żywności), zwłaszcza substancji o charakterze hydrofobowym. Produkty metabolizmu są zwykle bardziej hydrofilowe od substratów, co sprzyja ich dalszemu metabolizowaniu i wydalaniu [Bachmann 2007, Ortiz 2015, Guengerich 2020].

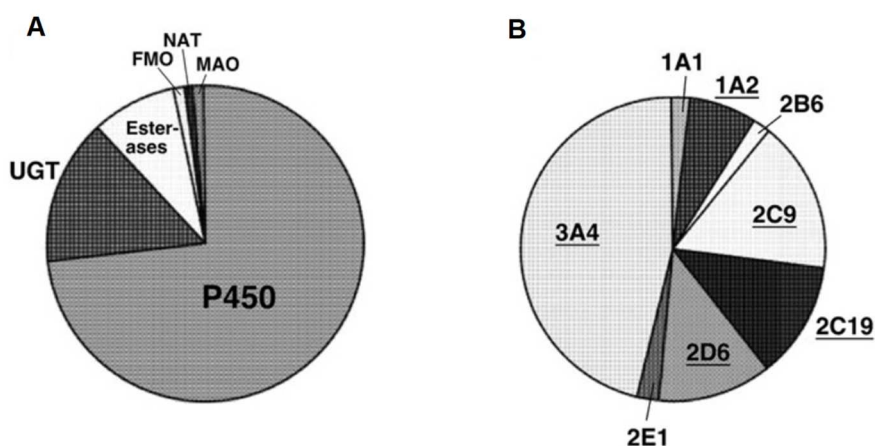
Cykl katalityczny cytochromu P450 (Rys.II.8.) jest inicjowany przez związanie substratu, RH, z cząsteczką białka hemowego (1). Powstanie kompleksu substrat-cytochrom przyspiesza redukcję jonu Fe(III) protoporfiryny IX, co następuje z udziałem elektronu przeniesionego z NADPH przez NADPH-reduktazę cytochromu P450 (2). Redukcja jonu Fe(III) do jonu Fe(II) umożliwia szybkie przyłączenie cząsteczki O₂. Tworzy się addukt Fe(II)-O₂, który szybko ulega przemianie w bardziej trwały kompleks Fe(III)-O₂[•] (3). W dalszym etapie następuje przyjęcie drugiego elektronu i przegrupowanie ładunku, wskutek czego atom żelaza uzyskuje stopień utlenienia +3, a atom tlenu -2 (4). Powstały kompleks Fe(III)-O₂²⁻ oddziałuje z protonem z otaczającego środowiska. Po przyłączeniu kolejnego protonu następuje rozpad wiązania O-O i utworzenie cząsteczki H₂O oraz kompleksu Fe(III)=O (5). Ten reaktywny kompleks przyjmuje rodnik wodorowy z substratu, przechodząc w strukturę Fe(III)-O•H, pozostawiając przejściowy wolny rodnik, R•. Powstałe w ten sposób dwa rodniki podlegają przemianie tworząc produkt reakcji z grupą hydroksylową, ROH (6). Końcowym etapem cyklu przemian jest odłączenie cząsteczki produktu (utlenionego metabolitu) i odtworzenie utlenionej formy cytochromu P450 [Ortiz 2015, Guengerich 2020].



Rys.II.8. Cykl kataliczny cytochromu P450 [Potęga 2010, Ortiz 2015].

II.2.2. Rola cytochromów P450 w metabolizmie leków

U człowieka cytochromy P450 są głównymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm przyjmowanych leków (ok. 75%). W ludzkiej wątrobie dominującymi podrodzinami P450 biorącymi udział w metabolizmie ksenobiotyków, w tym wielu leków są: P4501A (9%), P4502C (27%) i P4503A (45%). Tak znaczny udział izoenzymów P4503A(4) i 2C9 wynika w dużym stopniu z wysokich poziomów ekspresji tych enzymów w wątrobie (i jelicie cienkim) człowieka oraz z ich szerokiej specyficzności substratowej. Na Rys.II.9. uwzględniono również udział innych frakcji enzymów P450 uczestniczących w biotransformacji substancji egzogennych w ludzkiej wątrobie [Ortiz 2015, Manikandan i in. 2018].



Rys.II.9. Enzymy metabolizujące leki. A – udział ludzkich enzymów w metabolizmie leków, UGT – UDP-glukuronylotransferazy, FMO – monooksygenazy flawinowe, NAT – N-acetylotransferazy, MAO – monoaminooksydaza. B – udział poszczególnych frakcji enzymów P450 w metabolizmie leków [Ortiz 2015].

Powstałe produkty metabolizmu zwykle stają się bardziej polarne i lepiej rozpuszczalne w wodzie, co sprzyja ich dalszemu metabolizowaniu i wydaleniu z organizmu [Bachmann 2007]. Różnice w strukturze centrum aktywnego enzymu P450 określają zdolność oddziaływania z substratami o charakterystycznej strukturze chemicznej i pozycji zmian oksydacyjnych ich molekuł. Zatem ksenobiotyki, w tym lek może ulegać biochemicznej modyfikacji przez jedną izoformę bądź kilka różnych form izoenzymatycznych, czego przykładem jest kodeina podlegająca oksydacyjnej O-demetylacji przez P4502D6 i N-demetylacji przy udziale P4503A4 [Tomaszewski i in. 2008]. W zależności od rodzaju substratu oraz pozycji w cząsteczce, do której zostaje dołączony atom tlenu enzymy cytochromu P450 mogą katalizować nie tylko reakcje monooksygenacji, ale również brać udział w reakcjach redukcji, dehydratacji, dehydrogenacji, dehalogenacji, dimeryzacji i izomeryzacji [Bachmann 2007]. Procesy utleniania katalizowane przy udziale enzymów cytochromu P450 obejmują reakcje:

- **hydroksylacji** - elektrofilowy element struktury w hemie $Fe(III)=O$ przyłącza atom tlenu do niespolaryzowanego wiązania C-H (np. szlaki przemian testosteronu),
- **dealkilacji** - hydroksylacja zachodząca w pozycji α do heteroatomów, np. atomu tlenu (etry), siarki (tioestry), azotu (aminy, amidy), gdzie rozpad wiązania prowadzi odpowiednio do O-, S-, N-dealkilacji - procesy bioaktywacji i detoksykacji ksenobiotyków np. leku przeciwdepresyjnego imipraminy,
- **monooksygenacji heteroatomów** – w przypadku amin i amidów I- i II-rzędowych hydroksylacja wiązania N-H do N-hydroksyloaminy, która metabolizowana jest do nitrozopochodnych – proces aktywacji kancerogenów i leków,
- **epoksydacji** – proces otrzymywania związków wysoce reaktywnych i wykazujących właściwości toksyczne (epoksydów), których reakcje z DNA są bezpośrednią przyczyną kancerogennych właściwości wielu związków.

Biotransformacja większości leków przy udziale P4503A4 zachodzi głównie poprzez reakcje hydroksylacji, N-dealkilacji i N-dechloracji, przy czym hydroksylacji ulegają głównie alifatyczne fragmenty cząsteczek a także ugrupowania benzytowe [Li i in. 2011].

II.2.3. Białka sieroce cytochromu P450

Należy również nadmienić, iż spośród odkrytych dotychczas 57 genów kodujących izoenzymy cytochromu P450, aż 1/4 z nich należy do tzw. białek sierocych (ang. orphan proteins). Oznacza to, że ich funkcja, miejsce ekspresji, a także sposób regulacji wciąż nie zostały do końca wyjaśnione [Szaefer i in. 2019]. Brakuje nam wiedzy na temat ich funkcji w metabolizmie endogennym i egzogennym, a także ich roli w metabolizmie substancji toksycznych i rakotwórczych. Nie wykluczone, iż mogą wywierać wpływ na metabolizm leków. Obecnie do sierocych P450 zalicza się 13 izoenzymów: P450 2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22,

4V2, 4X1, 4Z1, 20A1 i 27C1 (Tabela II.3.). Niektóre z nich mają już przypisane przypuszczalne funkcje np. w metabolizmie kwasu arachidonowego. Jednak dla większości sieroctych P450 dostępna jest szersza wiedza na temat ich genów i polimorfizmów pojedynczych nukleotydów niż o ich funkcjach biologicznych [Guengerich i in. 2010].

Tabela II.3. Ludzkie sieroce P450 [Guengerich 2011]

P450	Miejsce ekspresji	Prawdopodobny substrat
2A7	wątroba	
2S1	skóra, wątroba, tchawica, płuco, żołądek, jelito cienkie, śledziona, nowotwory piersi	kwas retinowy, kwas arachidonowy, AQ4N, eliptycyna, niektóre nadtlenki eikozanoidów, 7,8-dihydrodiolowa pochodna benzo(a)pirenu,
2U1	grasica, mózg	kwasy tłuszczowe (ω , ω -1), N-arachidonoyl serotonina, pochodne debrizochiny i terfenadyny
2W1	komórki nowotworowe	substancje rakotwórcze
3A43	wątroba, mózg	alprazolam, testosteron
4A22	wątroba	
4F11	wątroba	kwasy tłuszczowe (ω -1, -2, -3...), β -hydroxy kwasy tłuszczowe, etylomorfin, erytromycyna, chlorpomazyna, imipramina, benzfetamina, werapamil,
4F22	skóra, jądra, szpik kostny, wątroba, jelito cienkie, mięsień szkieletowy, mózg	kwas arachidonowy
4V2	oko	kwasy tłuszczowe (ω)
4X1	mózg, wątroba, skóra, prostata, serce, aorta, piersi, jelito grube, tchawica, aorta nerki	anandamid (AEA)
4Z1	nowotwór piersi	kwasy tłuszczowe (ω -2, -3, -4, -5)
20A1	mózg, wątroba, śledziona, inne	
27C1	Wątroba, nerki, śledziona	

II.2.3.1. P450 2A7

Transkrypty mRNA tego izoenzymu odnotowano w ludzkiej wątrobie i przełyku. Splicing alternatywny jest prawdopodobnie związany z produkcją hybrydy alleli P450 2A6/2A7. Hybryda ta ma niższy poziom aktywności enzymatycznej niż P450 2A6. Do tej pory heterologiczna ekspresja P450 2A7 w różnych systemach nie pozwoliła na otrzymanie aktywnej formy tego izoenzymu. Nie wiadomo również, czy aktywna forma P450 2A7 istnieje [Guengerich 2011].

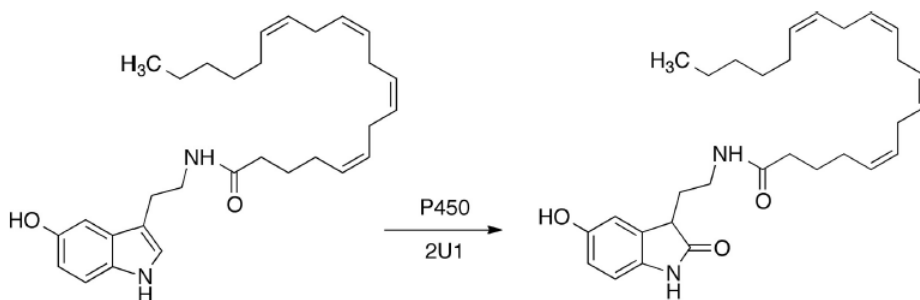
II.2.3.2. P450 2S1

Ekspresję mRNA izoenzymu wykryto w ludzkiej skórze i wątrobie. Istnieją również doniesienia o ekspresji P450 2S1 w tchawicy, płucu, żołądku, jelicie cienkim i śledzionie. Gen ten prawdopodobnie regulowany jest przez czynnik transkrypcyjny - receptor węglowodorów arylowych (ang. aryl hydrocarbon receptor, AhR). Wzrost poziomu ekspresji izoenzymu P450 2S1

zaobserwowano w komórkach MCF-7 po traktowaniu ich różnymi metoksytylbenami, czyli związkami posiadającymi zdolność do zaburzania ekspresji i aktywności AhR. [Szaefer i in. 2019]. Heterologiczna ekspresja została osiągnięta w drożdżach i stosunkowo wysokim poziomie w systemach *E. coli*. ekspresja P450 2S1 Uważa się, że izoenzym CYP2S1 może uczestniczyć w metabolizmie kwasu retinowego, niektórych nadtlenków eikozanoidów. Jednak specyficzność P450 2S1 wobec substratów jest nadal kontrowersyjna. Pojawiło się pytanie, czy P450 2S1 może oddziaływać z reduktazą NADPH-P450i akceptować elektrony. W 2009 roku Bui i Haninson doszli do wniosku, że P450 2S1 nie jest w stanie oddziaływać z reduktazą NADPH-P450 ani przyjmować elektronów z reduktazy. Jednakże praca Bui i Haninsona budziła poważne zastrzeżenia. Dwa lata później stwierdzono, że P450 2S1 redukuje prolek AQ4N. Wyniki te potwierdzają, że P450 2S1 katalizuje reakcje redukcyjne za pomocą reduktazy NADPH-P450, a także sugerują ujawnienie normalnych ról oksydazy o mieszanej funkcji P450 2S1. [Xiao i in. 2011] Ponadto wykazano, że P450 2S1 katalizuje utlenianie związków mających wielopierścieniowe struktury aromatyczne m.in. 7,8-dihydrodiolową pochodną benzo(a)pirenu i lek przeciwnowotworowy – eliptycynę [Mrizova i in. 2016]. Dowiedziono również, iż P450 2S1 katalizuje utlenianie kwasu arachidonowego do 19-HETE, a także wykazuje aktywność wobec kilku innych nienasyconych kwasów tłuszczowych i tylko ω1-hidroksy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [Fekry i in. 2019].

II.2.3.3. P450 2U1

mRNA P450 2U1 wykryto w ludzkim mózgu i grasicy. Heterologiczną ekspresję odnotowano w komórkach owadzi. P450 2U1 odpowiedzialny za metabolizm kwasu arachidonowego i innych kwasów tłuszczowych tj. nienasyconych kwasów tłuszczowych (linolenowego, palmitylowego, wakcenenowego, eikosatrienowego, eikozapentaenowego, EPA i dokozaheksanowego, DHA), a także długich nienasyconych kwasów tłuszczowych (palmitynowego i stearynowego) [Dhers i in. 2017]. Sugeruje się, iż P450 2U1 zaangażowany może być w utlenianie endogennej N-arachidonoyl serotoniny (inhibitora hydrolazy amidowej kwasu tłuszczowego) w pozycji 2 jej pierścienia indolowego (Rys.II.10) [Siller i in. 2014], a także katalizuje hydroksylację pochodnych debrizochiny i terfenadyny [Ducassou i in. 2015]. Wyniki te sugerują, iż ten typ przemian może być istotny dla metabolizmu leków w ludzkim mózgu.



Rys.II.10. Metabolizm N-arachidonoylserotoniny wobec P450 2U1 do 2-okso-Narachidonoylserotoniny [Siller i in. 2014].

II.2.3.3. P450 2W1

Próby znalezienia miejsca ekspresji mRNA P450 2W1 w ludzkiej tkance zakończyły się niepowodzeniem, a ekspresja wydaje się występować tylko w komórkach nowotworowych, szczególnie raka jelita grubego i wątroby [Guengerich 2011, Szaefer i in. 2019]. Izoenzym P450 2W1 bierze udział w aktywacji kancerogennych policyklicznych węglowodorów aromatycznych, co może mieć szczególne znaczenie w świetle lokalizacji tego enzymu w nowotworach. Ze względu na swoistą dla nowotworu ekspresję i wyjątkową aktywność katalityczną w raku jelita grubego CYP2W1 uznano za interesujący cel w leczeniu raka jelita grubego. Nadekspresja tego enzymu wiąże się bowiem przynajmniej ze skróceniem przeżycia pacjentów z rakiem jelita grubego [Chung i in. 2016] Ponadto P450 2W1 katalizuje N-demetylację benzfetaminy, redukcję AQ4N przy udziale reduktazy NADPH-P450 i w małym stopniu utlenianie kwasów tłuszczowych, a także wykazuje pewną aktywność wobec indoli i jego pochodnych [Guengerich 2011]. Wykazano również wpływ niektórych stylbenów na poziom ekspresji tych izoenzymów w komórkach nowotworowych piersi. Obserwowano bowiem wzrost ekspresji P450 2W1 w komórkach linii MCF-7 traktowanych 3,4,2'-trimetoksy-trans-stilbenem oraz spadek poziomu transkryptu P450 2W1 podczas leczenia komórek MDA-MB-231 resweratrolem, związkiem o budowie stilbenu, występującym u roślin naturalnie pod wpływem stresu [Szaefer i in. 2019]. Zatem P450 2W1 odpowiedzialny jest nie tylko za metabolizm leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej, ale również potencjalne środki chemoterapeutyczne mogą modulować poziom ekspresji tych izoenzymów w komórkach nowotworowych [Chung i in. 2016, Szaefer 2019]. Informacje te są niezwykle istotne dla planowania terapii przeciwnowotworowej, w głównej mierze przeciwko nowotworom jelita i piersi.

II.2.3.4. P450 3A43 i P450 4A22

P450 3A43 zlokalizowano w wątrobie i mózgu. Heterologiczną ekspresję tego izoenzymu odnotowano w *E.coli* i komórkach COS-1 [Agarwal 2008]. Prawdopodobnie P450 3A43 bierze udział w metabolizmie alprazolu i w małym stopniu testosteronu. [Guengerich 2011]. Stosunkowo mało wiadomo na temat P450 4A22. Ekspresja tego enzymu nie wydaje się być na wysokim poziomie. Został on zlokalizowany w ludzkiej wątrobie i pełni tam funkcję hydroksylazy kwasów tłuszczowych [Lino Cardenas i in. 2011].

II.2.3.5. P450 4F11

mRNA P450 4F11 ulega ekspresji w wątrobie. Heterologiczna ekspresja została osiągnięta w komórkach drożdży, owadów i *E.coli*. P450 4F11 wykazuje aktywność katalityczną wobec kwasów tłuszczowych, a także ketokwasów tłuszczowych. Nie zaobserwowano bioaktywacji wobec wielu prokancerogenów [Guengerich 2011]. Odnotowano natomiast pewną aktywność przy utlenianiu witaminy K1. Ponadto P450 4F11 katalizuje N- i O-demetylację leków takich jak erytromycyna, benzfetamina, etylomorfina, chlorpromazyna, imipramina i werapamil [Kalsotra i in. 2004].

II.2.3.6. P450 4F22

Ekspresję mRNA P4504F11 wykryto w skórze i jądrach, a także na niewielkim poziomie w szpiku kostnym, wątrobie, jelicie cienkim, mięśni szkieletowym i mózgu. Uważa się, że P450 4F22 bierze udział w bioaktywacji pochodnych kwasu 12R-hydro(peroksy)-eikozatetraenowego i 8R, 11R, 12R-epoksy(hydroksy)-eikosatrienowego. Ponadto dowiedziono, iż P450 4F22 utlenia kwas arachidonowy do mieszaniny kwasów hydroksy-eikozatetraenowych [Guengerich 2011].

II.2.3.7. P450 4V2

mRNA ludzkiego P450 4V2 wykryto w siatkówce oka. Stwierdzono również, że mutacje w genie P450 4V2 związane są z występowaniem dystrofii krystalicznej Biettiego (ang. Bietti's crystalline dystrophy, BCD), rzadkiej choroby objawiającej się powstawaniem krystalicznych wnikających złogów i różnym stopniem atrofii naczyniowo-rdzeniowej rozpoczynającej się na tylnym biegunie gałki ocznej. Przeprowadzone badania biochemiczne wskazują, że u pacjentów z BCD zaburzony jest metabolizm kwasów tłuszczowych. [Nakano i in. 2012]. Zatem uważa się, iż P450 4V2 wraz z innymi izoenzymami P450 może odgrywać rolę w metabolizmie kwasów tłuszczowych i sterydów. Wykazano również, że P450 4V2, którego ekspresję uzyskano w komórkach owadzych katalizuje hydroksylację średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. Medium chain fatty acids, MCFA) [Guengerich 2011], a także metabolizuje wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acid, PUFA) [Nakano i in. 2012].

II.2.3.8. P450 4X1

Ekspresja P450 4X1 ma miejsce m. in. w mózgu, tchawicy, wątrobie, sercu i aorcie. Ekspresję i aktywność P450 4X1 odkryto również w różnych nowotworach. Uznano go zatem za potencjalny cel molekularny terapii przeciwnowotworowej [Kumar 2015]. W badaniach eksperymentalnych dowiedziono, że kwas arachidonowy i jego pochodna anandamid są substratami P450 4X1. Jednakże możliwości metaboliczne P450 4X1 są w dużej mierze nieznane [Guengerich 2011].

II.2.3.9. P450 4Z1

Ekspresja P450 4Z1 jest niewykrywalna lub na bardzo niskim poziomie w większości tkanek ludzkich. Natomiast obfitą ekspresję odnotowano w tkankach sutka i nowotworach piersi. Obecność tego izoenzymu stwierdzono w liniach komórkowych raka piersi T47-D i MCF-7 [Rieger i in. 2004]. Jedynymi zgłaszanymi substratami dla P450 4Z1 są kwasy tłuszczowe, kwas laurynowy i kwas mirystynowy [Guengerich 2011].

II.2.3.10. P450 20A1

Ekspresje mRNA P450 20A1 wykryto w mózgu i wątrobie. Jak na razie nie zidentyfikowano substratów dla tego izoenzymu [Han i in. 2017].

II.2.3.11. P450 27C1

mRNA P450 27C1 ulega ekspresji w wielu tkankach, w tym w wątrobie, nerkach i śledzionie. Enzym ten należy do rodziny P450 27, do której należą również P450 27A1 i 27B1, izoenzymy zaangażowane w hydroksylację witaminy D. Natomiast izoenzym P450 27C1 nie utlenia witaminy D, 25-hydroksy-witaminyD ani cholesterolu. Do tej pory nie zidentyfikowano substratów dla tego izoenzymu [Guengerich 2011].

II.3. Monooksygenazy flawinowe (I faza metabolizmu)

II.3.1. Ogólna charakterystyka enzymów FMO

Monooksygenazy flawinowe (ang. flavin-containing monooxygenases, FMO) biorą czynny udział w metabolizmie i detoksykacji leków o właściwościach lipofilowych, a znaczenie ich było pomijane przez wiele lat. Pierwotnie uchodziły za enzymy pomocnicze dla monooksygenaz cytochromu P450. Jednak scharakteryzowanie członków rodziny FMO, poznanie metabolicznych następstw rzadkich mutacji i ich wariantów polimorficznych doprowadziło do wzrostu znaczenia tych enzymów w aspekcie farmakologicznym i toksykologicznym. FMO i P450 mają wiele podobieństw. Ich ekspresja ma miejsce w tych samych tkankach, angażują w cyklu katalitycznym cząsteczkowy tlen, jak i NADPH jako kofaktor. Nierzadko przejawiają również aktywność metaboliczną wobec tych samych leków [Krueger i in. 2005].

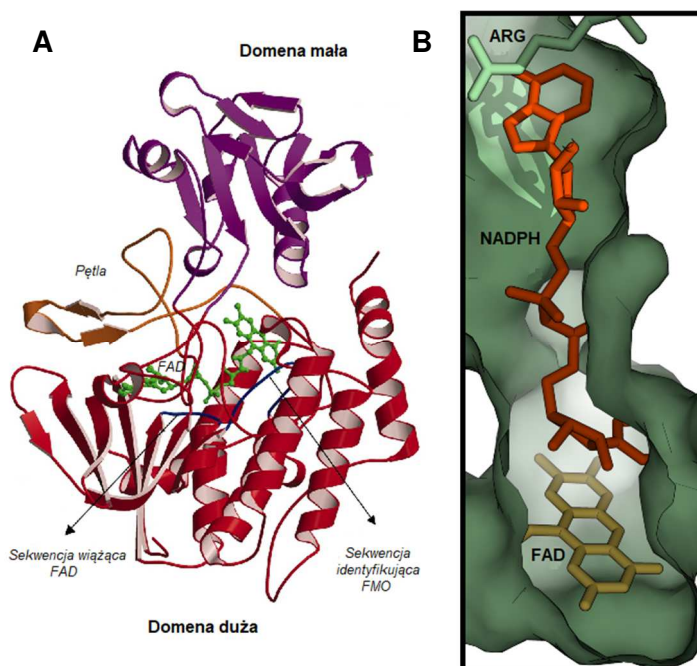
Tabela II.4. Wpływ polimorfizmów genu FMO na metabolizm ksenobiotyków [Phillips i in. 2008 i 2019, Tang i in. 2017]

Gen	Główne miejsce ekspresji	Powiązania z chorobą	Leczenie ¹	SNP ⁴	Efekt końcowy
FMO3	wątroba osoby dorosłej	mutacje upośledzające funkcjonalność i powodujące TMAurię ² działania niepożądane lub zwiększona skuteczność leku	amfetamina, benzydamina	N61K	zmniejszenie lub zniesienie aktywności
			etionamid, clozapina,	R205C	umiarkowany spadek aktywności
			deprenyl	L360P	wzrost aktywności
			matamfetamina, tamoksyfen, tioacetozon, siarczek sulindaku	E158K/E308G	umiarkowany spadek aktywności, u dzieci może powodować przemijające objawy TMAurii, zaobserwowano wzrost skuteczności sulindaku
			promotor różnych SNP	wzrost lub spadek aktywności	

Gen	Główne miejsce ekspresji	Powiązania z chorobą	Leczenie ¹	SNP ⁴	Efekt końcowy
FMO2	pięca	odpowiedź na leki lub inne zw. chemiczne	disulfoton, forat, leki oparte na tiomoczniku	Q472X ³	zniesienie aktywności
FMO1	wątroba u płodu, nerka u płodu, nerka u osoby dorosłej, jelito cienkie	obniżona ekspresja w rdzeniu kręgowym przy ALS	chlorprozamina, imipramina, itopryd	R502X	zniesienie aktywności zależne od substratu
		zwiększona ekspresja przy migotaniu przedsionków odpowiedź na leki	olopatadyna, tamoksyfen, tioacetazon	promotor SNP	spadek aktywności

¹ FMO nie jest jedynym enzymem uczestniczącym w metabolizmie *in vivo* niektórych związków chemicznych. ² Zidentyfikowano ponad 30 mutacji. ³ Inne zidentyfikowane SNP występują w tle Q472X. TMAuria – trimetyloaminuria, ALS - stwardnienie zanikowe boczne (ang. amyotrophic lateran sclerosis) ⁴SNP - Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polymorphism)

W przeciwieństwie do enzymów cytochromu P450, aktywność monoooksygenaz flawinowych na ogół nie jest modulowana przez obce związki chemiczne, co sugeruje, iż środki farmaceutyczne metabolizowane przez FMO są mniej podatne na oddziaływanie z innymi lekami. Zaobserwowane różnice międzyosobnicze w aktywności tych enzymów są zatem bardziej prawdopodobne ze względu na czynniki genetyczne niż czynniki środowiskowe. Obecnie wiadomo, iż człowiek posiada pięć funkcjonalnych genów FMO [Philips i in. 2008]. Trzy z nich (FMO1, FMO2, FMO3) odgrywają największą rolę w metabolizmie leków (Tabela II.4).



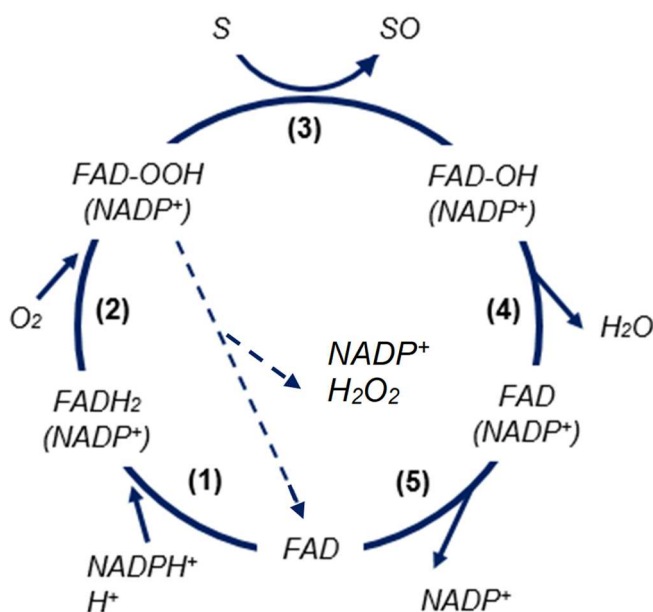
Rys.II.11. A - Model struktury białka FMO **B** - kanał i miejsce aktywne ze związanym NADPH i FAD w bakteryjnej FMO [Eswaramoorthy i in. 2006, Cho i in. 2011].

Enzymy FMO mają ściśle związaną grupę prostetyczną FAD i wiążący kofaktor NADPH. Główną strukturę enzymu FMO można porównać do budowy małży z małą „górną skorupą” i większą dolną (Rys.II.11a). Enzymy FMO zarówno drożdży, jak i bakterii są dimerami. Każdy monomer składa się z dwóch domen strukturalnych, większej w której zakotwiczona jest grupa flawinowa FAD i mniejszej wiążącej NADPH (tzw. domeny insercyjnej). Obie domeny są połączone podwójnym łącznikiem. Kanał między dwiema domenami prowadzi do miejsca aktywnego enzymu, w którym NADPH wiąże obie domeny i zajmuje szczelinę blokującą dostęp do grupy flawinowej FAD (Rys.II.11b). Grupa nikotynamidowa NADPH oddziałuje z FAD, natomiast miejsce wiązania NADPH zachodzi na miejsce wiązania substratu w grupie flawinowej.

II.3.1.2. Funkcje i mechanizm działania izoenzymów FMO

Monooksygenazy flawinowe katalizują reakcję utleniania wielu nukleofilowych związków zawierających heteroatom taki jak azot, siarka czy fosfor. Jednakże niedawno wykazano, że ludzka izoforma FMO5 ma nietypową aktywność, zachowuje się bowiem jak monooksygenaza Baeyera-Villigera (BVMO). FMO są zaangażowane w metabolizm wielu leków, pestycydów i substancji toksycznych, poprzez przekształcanie lipofilowych ksenobiotyków w polarne i łatwo wydalone metabolity.

Do aktywności katalitycznej enzymów FMO wymagany jest dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) jako grupa prostetyczna, NADPH jako kofaktor oraz tlen cząsteczkowy jako kosubstrat. Pierwszym etapem cyklu katalitycznego (Rys.II.12) jest redukcja FAD, która następuje z udziałem dwóch elektronów przeniesionych z NADPH (1). Następnie zredukowana cząsteczka FAD szybko reaguje z tlenem cząsteczkowym tworząc peroksyflawinę, FAD-OOH (2). Powstały wodoronadtlenek jest stabilizowany przez NADP⁺. Przyjmuje się, iż w takiej formie FMO występuje w komórce do momentu napotkania na odpowiedni nukleofil, czyli substrat, S. FAD-OOH reaguje z napotkanym S (3). W wyniku ataku nukleofilowego następuje wbudowanie atomu tlenu do cząsteczki substratu, FAD natomiast pozostaje jako FAD-OH, czyli hydroksyflawina. Następnie FAD-OH przekształca się w FAD poprzez uwolnienie cząsteczki wody (4). Kończącym etapem jest powolne uwolnienie NADP⁺ (5). Rozkład FAD-OH jest najwolniejszym krokiem w całym cyklu, dlatego też uważa się, iż determinuje on V_{max} całego cyklu katalitycznego FMO. W przeciwieństwie do cyklu cytochromu P450 wiązanie substratu do enzymu w cyklu FMO nie ma wpływu na V_{max} [Phillips i in. 2019]. Ponadto w cyklu katalitycznym może dojść do rozszczepienia kompleksu [(FAD-OOH)(NADP⁺)], w wyniku czego uwolniona zostaje cząsteczka NADP⁺ i powstaje H₂O₂. Szybkość tego procesu jest wyższa w obecności substratu. Szacuje się, iż 30-50% związanego tlenu ulega przemianie do H₂O₂ [Siddens i in. 2014].



Rys.II.12. Cykl katalityczny monooksygenaz flawinowych [Phillips i in. 2019].

II.3.2. Rola FMO w metabolizmie leków

Spośród monooksygenaz flawinowych, rodzina FMO1 charakteryzuje się najszerszym zakresem substratowym. Zakres ten obejmuje m.in. lek antydepresyjny - imipraminę, gastroprokinetyczny – itopryd i antyhistaminowy - olopatadinę. Ekspresja FMO1 w wątrobie człowieka zostaje wyciszona w momencie narodzin. Zatem wkład tego enzymu w metabolizm leków u człowieka dorosłego jest ograniczony tylko do tkanek poza wątrobą. Ponadto obniżone stężenie FMO1 obserwuje się u osób chorych na stwardnienie zanikowe boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS). Natomiast wzmożoną ekspresję FMO1 zaobserwowano u pacjentów, u których występowało migotanie przedsionków. Chociaż wyniki te są interesujące, potencjalna rola FMO1 w etiologii wymienionych chorób pozostaje nadal do ustalenia. Określenie znaczenia FMO1 w detoksykacji leków wykazano w badaniu na myszach z niedoborem tego genu. Kiedy podano zwierzętom doświadczalnym imipraminę, która ulega przemianom metabolicznym wobec FMO1 do *N*-tlenku, u myszy wystąpiły działania niepożądane. Towarzyszyło temu zwiększenie stężenia leku macierzystego w osoczu i nerkach oraz wzrost stężenia dezypraminy w mózgu, co wskazuje, iż w przypadku braku FMO1 większość leku jest metabolizowana przez szlak metaboliczny enzymów P450 [Phillips i in. 2008].

FMO2 jest przykładem genu, który znajduje się na dobrej drodze żeby stać się ludzkim pseudogenem. Większość osób jest homozygotą, gdzie w wyniku mutacji nastąpiło zastąpienie kodonu glutaminy kodonem stop. W efekcie allel *FMO2*2A* koduje odcięty, nieaktywny katalitycznie polipeptyd. Taki rodzaj allelu występuje zasadniczo u 100% wszystkich populacji za wyjątkiem afrykańskiej, gdzie następuje kodowanie pełnej długości polipeptydu i potwierdzono tam obecność rodzimego allelu *FMO2*1* w mikrokosmkach płuc. Choć niewiele jeszcze wiadomo

o lekach będących substratami dla FMO2, stwierdzono, że enzymy te są zdolne do utleniania leków przeciwgruźliczych, tj. etionamidu i tioacetazonu, co ma wpływ na toksyczność i skuteczność tych terapeutyków w populacjach afrykańskich [Phillips i in. 2008, Veeramah 2008].

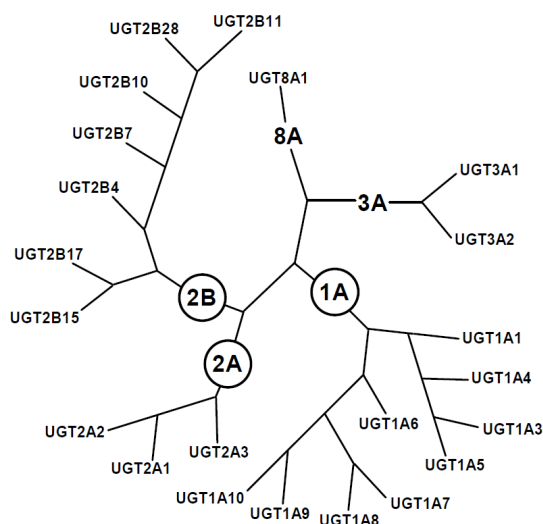
Niedobór produkcji FMO3 prowadzi do tzw. trimetyloaminurii [Fennema i in. 2016]. Dotknięte nią osoby nie są w stanie metabolizować trimetyloaminy (TMA) do N-tlenku. W efekcie nadmiar trimetyloaminy wydalany jest z potem, moczem i w oddechu, powodując silny odór przypominający zapach zgniłych ryb. [Shephard i in. 2015]. Cierpiący na tą chorobę mają również ograniczoną zdolność do metabolizowania benzydminy, czy sulindaku, które należą do niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Sulindak stosowany jest w leczeniu rodzinnej polipowatości gruczolakowatej. Podawany jest w formie proleku. Przez bakterie jelitowe przekształcany jest z sulfotlenku do siarczku, czyli do aktywnej postaci leku. U pacjentów z rodzinną polipowatością gruczolakowatą, u których występują warianty FMO3: E158K i E308G obserwuje się regresję istniejących polipów, a także ochronę przed tworzeniem się gruczolaka. [Tang i in. 2017] FMO3 metabolizuje również klozapinę (lek przeciwpsychotyczny) oraz deprenyl podawany chorym na chorobę Parkinsona, a także tamoksyfen stosowany głównie w terapii raka sutka [Phillips i in. 2008].

W przypadku FMO5, pomimo sekwencji aminokwasów podobnej do pozostałych monooksygenaz flawinowych okazało się, że ludzki izoenzym FMO5 jest zasadniczo nieaktywny wobec związków nukleofilowych. Wykazuje natomiast silną aktywność katalityczną ukierunkowaną na elektrofilowe cząsteczki karbonylu, które są typowymi substratami monooksygenazy Baeyer-Villiger'a (ang. Baeyer-Villiger Monooxygenases, BVMO). Odmienne zachowanie tego izoenzymu prawdopodobnie wynika z faktu, iż gen FMO5 jako jedyny spośród wszystkich innych genów FMO znajduje się poza klastrem 220 kb chromosomu 1 [Fiorentini i in. 2017]. Dotychczas gałąź utleniania Baeyera-Villigera w metabolizmie leków była dość zaniedbywana. Ostatnio w kilku pracach badawczych zasugerowano, iż izoenzym FMO5 bierze udział w metabolizmie aktywnych składników farmaceutycznych (ang. Active Pharmaceutical Ingredient, API) m. in. związku przeciwnowotworowego E7016 i przeciwbakteryjnego MRX-1 [Lai 2011 i in., Meng i in. 2015]. Ponadto wykazano, iż FMO5 wykazuje silną aktywność wobec dwóch rozpowszechnionych leków, nabumetonu i pentoksyfiliny, zawierających ugrupowanie karbonylowe w łańcuchu alifatycznym [Fiorentini i in. 2017]. Dzięki tym badaniom odkryto nie tylko nową ścieżkę szlaku metabolicznego stosowanych leków, ale także podkreślono wkład ludzkich FMO, a przede wszystkim FMO5 w przemiany metaboliczne leków. Wkład ten był przez długi czas niedoceniany. Niesłusznie sądzono, iż jest on incydentalny, a oznaczanie zakresu substratu izoenzymów FMO jest zbędne wobec roli cytochromu P450.

II.4. UDP-glukuronylotransferazy (II faza metabolizmu)

II.4.1. Ogólna charakterystyka UDP-glukuronylotransferaz

UDP-glukuronylotransferazy (ang. UDP-glucuronosyltransferase, UGT) to podstawowe katalizatory reakcji II fazy biotransformacji. Odgrywają u ssaków główną rolę w przemianach substancji endo- i egzogennych, do form lepiej rozpuszczalnych w wodzie, czyli łatwiej usuwanych z organizmu. Obecne są w komórkach roślin, zwierząt i bakterii [Bock 2003]. Większość danych literaturowych przedstawia podział ludzkich białek UGT na 2 rodziny: UGT1 i UGT2 [Guillemette 2010]. Natomiast zgodnie z uaktualnioną klasyfikacją, wymienia się 4 rodziny: UGT1, UGT2, UGT3 i UGT8 oraz 5 podrodziny: UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A i UGT8A, w obrębie których wyróżnia się 22 funkcjonalne izoformy UGT (Rys.II.13.) [Yang i in. 2017, Miners i in. 2020].



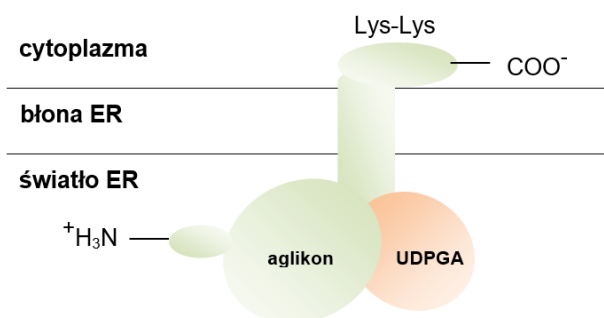
Rys.II.13. Drzewo filogenetyczne ludzkich izoenzymów z rodziny UGT, Podrodziny UGT1A, UGT2A, UGT2B to izoenzymy istotne dla metabolizmu leków i ksenobiotyków [Mazerska i in. 2016, Miners i in. 2020].

Wątroba jest najważniejszym, lecz nie jedynym organem, w którym obecne są UGT. Izoenzymami występującymi poza wątrobą są UGT1A7, obecny w przelyku, żołądku i płucach, UGT1A8 i UGT1A10, których ekspresja ma miejsce w przewodzie pokarmowym oraz UGT2A1 znajdujący się głównie w komórkach nabłonkowych nosa. mRNA kodujący szereg UGT obecny jest także w komórkach nabłonka jelit. W nerkach obecne są izoformy UGT z obydwu rodzin, a poziom UGT2B7 w tym organie dorównuje ekspresji w wątrobie. Enzymy z rodziny UGT2B obecne są też w gruczołach piersi i prostaty [Ohno i in. 2009, Court i in. 2012].

II.4.1.1. Struktura enzymów UGT

UDP-glukuronylotransferazy umieszczone są w siateczce śródplazmatycznej (ER). Białka te zbudowane są z dwóch domen N- i C-końcowej, o łącznej masie 50-60 kDa (Rys.II.14). Cała domena N-końcowa oraz przeważająca część domeny C-końcowej skierowane są do

światła ER. Domena C-końcowa odpowiada za wiązanie kofaktora UDPGA, co jest cechą wspólną omawianych enzymów (jest ona identyczna u wszystkich izoform UGT1 i bardzo podobna u izoform UGT2). Białka różnią się natomiast domeną N-końcową, która determinuje specyficzność substratową poszczególnych izoenzymów [Patana i in. 2008, Fedejko i in. 2011a, Fujiwara i in. 2016].



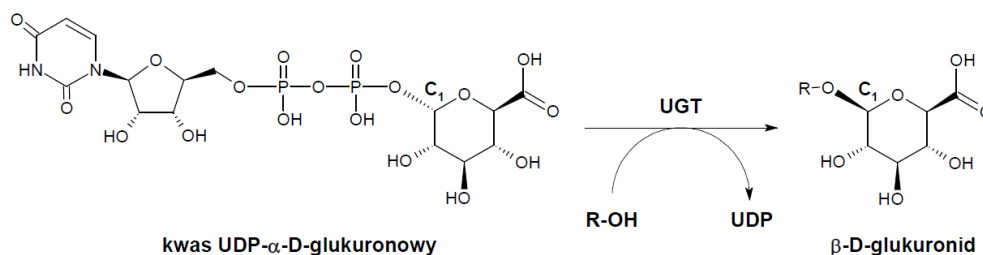
Rys.II.14. Proponowany model umiejscowienia białka UGT w błonie ER. Cała domena N-końcowa (wiążąca aglikon) oraz przeważająca część domeny C-końcowej (wiążącej UDPGA) znajdują się w świetle ER [Fedejko i in. 2011a, Fujiwara i in. 2016].

Funkcjonalne jednostki UGT mogą występować w formie pojedynczej podjednostki lub oligomerów do czterech podjednostek. Wykazano, że białka UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 i 2B7 ulegają homodimeryzacji. Niektóre z nich mogą łączyć się także w heterodimery jak np. UGT1A1 z innymi izoformami podrodziny UGT1A. Możliwe jest również utworzenie heterodimerów przez białka różnych podrodziny np. UGT2B7 z izoformami UGT1A [Fedejko i in. 2011a]. Jak do tej pory wszelkie próby poznania pełnej struktury krystalicznej UGT kończyły się niepowodzeniem. Poważnym ograniczeniem badań nad strukturą UGT jest trudność w otrzymaniu kryształów białka. Problemy związane z uzyskaniem nadekspresji, oczyszczaniem oraz krystalizacją są typowe dla glikozylotransferaz [Miley i in. 2007].

II.4.1.2. Funkcje i mechanizm działania izoenzymów UGT

UDP-glukuronylotransferazy katalizują reakcję glukuronidacji, czyli sprzęgnięcia substratu z kwasem glukuronowym, co prowadzi do powstania glukuronidu (Rys.II.15.). Glukuronidacja jest jedną z głównych ścieżek metabolizmu II fazy. Szacuje się, że enzymy UGT biorą udział w ok. 35% wszystkich reakcji tej fazy [Fedejko i in. 2011a, Mazerska i in. 2016].

Reakcja glukuronidacji polega na przeniesieniu kwasu β -D-glukuronowego z kwasu urydyno-5'-difosfo- α -D-glukuronowego (UDPGA) na odpowiednią grupę funkcyjną aglikonu (hydroksylową, karboksylową, aminową, tiolową lub sulfonamidową). Najbardziej podatnymi na glukuronidację miejscami w cząsteczkach substratów są nukleofilowe atomy tlenu i azotu. Reakcja ta zachodzi zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej typu drugiego (SN₂), następuje atak heteroatomu aglikonu na anomeryczny atom węgla (C1) kwasu α -D-glukuronowego. O mechanizmie tym świadczy zmiana konfiguracji przy C1, w wyniku której powstaje β -D-glukuronid [Fedejko i in. 2011a].



Rys.II.15. Reakcja glukuronidacji [King i in. 2000, Mazerska i in. 2016].

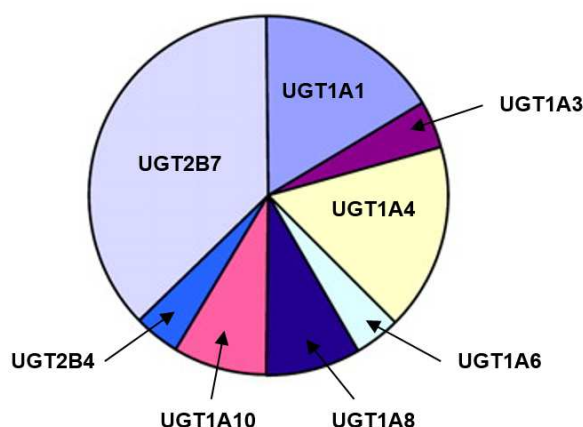
W wyniku glukuronidacji, obok glukuronidu, powstaje urydynodifosforan (UDP), który ulega defosforylacji do urydynomonofosforanu (UMP). Natomiast produkt sprzężenia przedostaje się ze światła siateczki śródplazmatycznej (ER) do cytozolu na drodze ułatwionej dyfuzji z udziałem transporterów anionowych lub może zostać przeprowadzony w wyjściowy aglikon w wyniku hydrolizy katalizowanej przez obecną w ER β -glukuronidazę [Fedejko i in. 2011a, Dai i in. 2015].

II.4.2. Rola UDP-glukuronylotransferaz w metabolizmie leków

Lipofilowy charakter przyjmowanych leków pozwala na ich efektywne przenikanie przez błony biologiczne i selektywne dotarcie do celu molekularnego. Jednakże właściwości te utrudniają eliminację tych związków z organizmu. Dlatego też niezwykle konieczna jest ich przemiana do postaci bardziej hydrofilowej, która znacznie łatwiej będzie wydalana z organizmu. Jak wspomniano wcześniej (II.1.1. Ogólna charakterystyka procesu biotransformacji) mechanizmy reakcji obu faz nie są powiązane i mogą zachodzić niezależnie od siebie. Jednak bardzo często reakcje I fazy skutkują wprowadzeniem lub „odsłonięciem” grupy funkcyjnej, której obecność zwiększa podatność na dalsze przemiany katalityczne wobec enzymów II fazy, w tym wobec UDP-glukuronylotransferaz. Poza ułatwieniem eliminacji leków z organizmu przemiany metaboliczne pełnią również rolę detoksykacyjną, która ma na celu zmniejszenie reaktywności oraz toksyczności stosowanych leków [Rowland i in. 2013].

Szacuje się, iż UDP-glukuronylotransferazy odpowiedzialne są za biotransformację ok. 35% leków, które podlegają reakcjom II fazy. W porównaniu z liczbą leków metabolizowanych przez enzymy cytochromu P450, pula leków usuwanych na drodze sprzężenia z kwasem glukuronowym jest niewielka (ok. 1/7), jednak wystarczająca aby uwzględniać efekty związane z modulacją aktywności enzymów UGT. Substratami UGT są związki hydrofobowe, zazwyczaj o strukturze pierścieniowej, posiadające nukleofilowe atomy tlenu, azotu lub siarki. Glukuronidacji ulegają przede wszystkim ugrupowania hydroksylowe, karboksylowe, aminowe (I-, II- i III-rzędowe), tiolowe, a także kwaśne atomy węgla. Do substratów UGT zalicza się z jednej strony związki endogenne tj. bilirubinę, kwasy żółciowe, kwasy tłuszczowe, hormony steroidowe i tyroidowe oraz witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, ale także ksenobiotyki [Mazerska i in. 2016, Yang i in. 2017, Miners i in. 2020]. Chociaż glukuronidacja przeważnie wiąże się z dezaktywacją, w przypadku niektórych związków można zaobserwować zachowaną lub

podwyższoną aktywność biologiczną glukuronidu. Spektakularnym przykładem jest morfina, której 6-O-glukuronid wykazuje dużo silniejsze działanie analgetyczne niż wyjściowy aglikon [Paul i in. 1989]. Ponadto nie zawsze transformacja oksydacyjna przez enzymy I fazy jest konieczna przed glukuronidacją (lek przeciwwirusowy - zydowudyna). Szerokie spektrum substratowe izoenzymów UGT umożliwia glukuronidację i eliminację wielu związków o zróżnicowanej strukturze. UGT biorą udział w metabolizmie leków należących do wielu grup terapeutycznych m. in. przeciwbólowych, przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych, przeciwpadaczkowych, niesteroidowych leków przeciwzapalnych i uspokajających typu benzodiazepin [Rowland i in. 2013, Yang i in. 2017, Xiao i in. 2018, de Man i in. 2018]. Procentowy udział poszczególnych izoform UGT w metabolizmie leków zaprezentowano na Rys.II.16.

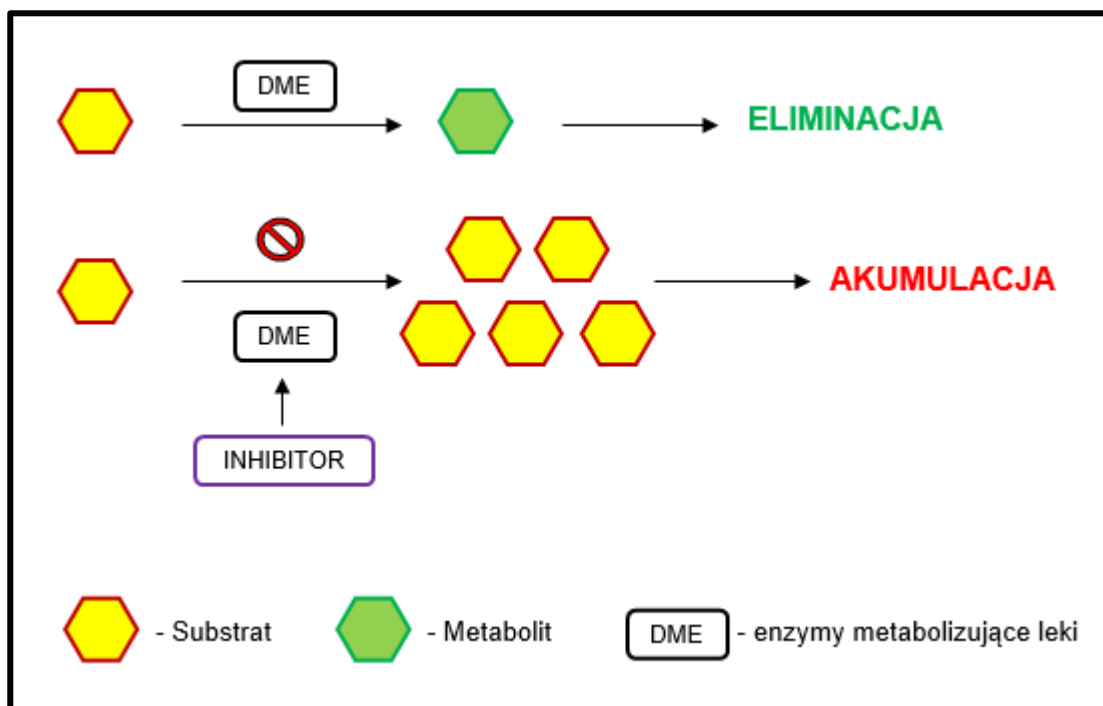


Rys.II.16. Procentowy udział poszczególnych izoform UGT w metabolizmie leków [Williams i in. 2004].

II.5. Interakcje leków przeciwnowotworowych

II.5.1. Interakcje leków związane z enzymami metabolizującymi

Obecnie ze względu na stosowanie terapii wielolekowych co raz częściej obserwuje się występowanie interakcji między lekami. W ramach tych interakcji leki wchodzą ze sobą w reakcje antagonistyczne bądź synergistyczne. O reakcjach antagonistycznych mówimy wówczas, gdy dwa zastosowane przez nas środki działają przeciwstawnie, czyli na przykład jeden lek podnosi, a drugi obniża ciśnienie. Natomiast do reakcji synergistycznych dochodzi wówczas, gdy leki wzajemnie wzmacniają swoje działanie. Jeżeli leki zostaną źle dobrane, mogą pojawić się ostre skutki uboczne. Szacuje się, że w krajach zachodnich około 4% pacjentów jest hospitalizowanych z powodu wystąpienia interakcji lek-lek. W ostatnich latach poświęcono wiele uwagi interakcjom farmakokinetycznym związanym z inhibicją enzymów metabolizujących leki (DME), w szczególności enzymom z grupy cytochromu P450 i UDP-glukuronylotransferaz [Kato 2020]. Zahamowanie aktywności enzymów metabolizujących leki powoduje spadek klirensu wątrobowego, czyli objętości osocza całkowicie oczyszczonego z danej substancji w jednostce czasu. Powoduje to wzrost bioaktywności leku będącego substratem enzymu, a w następstwie akumulację leku w organizmie, a zarazem wzrost toksyczności (Rys.II.17.). Jest to jedna z głównych przyczyn wycofywania z rynku wielu leków [Rowland i in. 2013].



Rys.II.17. Wpływ obecności inhibitora DME na metabolizm leków [Rowland i in. 2013]

Badanie potencjalnych interakcji lek-lek jest konieczne nie tylko z punktu widzenia klinicznego, ale również ekonomicznego. Należy zauważyć, że ewentualne wycofanie leku generuje duże straty dla firm farmaceutycznych. Zjawisko modulacji aktywności enzymów metabolizujących leki ma szczególne znaczenie w przypadku co raz częściej stosowanych przeciwnowotworowych terapii wielolekowych. Związane są one z dużym ryzykiem występowania efektów niepożądanych, a ich wąskie okna terapeutyczne, wysoki potencjał toksyczności leków, jak i możliwe interakcje międzylekowe ograniczają ich stosowanie [Paul i in. 1989]. Wiele badań wskazuje na zdolność stosowanych leków przeciwnowotworowych do modulacji enzymów rodziny P450 i UGT [Korprasertthaworn i in. 2019, Leow i in. 2019, Kato 2020]. Inhibicja tych enzymów może prowadzić nie tylko do niebezpiecznych interakcji pomiędzy lekami, ale także do zaburzenia funkcjonowania organizmu poprzez zahamowanie metabolizmu związków endogennych. Indukcja UGT z kolei wiąże się ze wzmożoną inaktywacją i eliminacją leków cytotoksycznych, skutkiem czego jest osłabienie ekspozycji komórek nowotworowych na działanie leku, a więc zmniejszenie jego efektu terapeutycznego [Rowland i in. 2013, Kato 2020].

II.5.2. Przykłady interakcji leków

II.5.2.1. Indukcja i inhibicja izoenzymów cytochromu P450

Równowaga reakcji prowadzonych przez enzymy cytochromu P450 może być zakłócana przez wiele czynników. Ich aktywność katalityczna może ulegać zmianie nie tylko poprzez czynniki genetyczne, przebyte schorzenia wątroby, endogenne systemy regulacji hormonalnej, ale również przez udział związków egzogennych będących ligandami receptorów jądrowych, które mogą indukować zarówno aktywację jak i represję genów docelowych [Indelman-Sundberg i in.

2005, Wang i in. 2017, Manikandan i in. 2018]. Zatem zarówno substancje pochodzenia endogennego (hormony, cytokiny) jak i egzogennego (składniki diety, zanieczyszczenia środowiska, przyjmowane leki) mogą modulować funkcjonowanie enzymów P450 poprzez inhibicję bądź indukję aktywności poszczególnych izoform [Wang i in. 2017, Manikandan i in. 2018]. Może to mieć wpływ na stopień metabolizmu niektórych leków, a w konsekwencji na końcowy efekt terapii [Indelman-Sundberg i in. 2005].

Hamowanie działania enzymu może zachodzić wskutek antagonizmu kompetycyjnego np. chinidyna – z udziałem P450 2D6 lub niekompetycyjnego np. ketokonazol, który tworzy silne wiązania z jonem żelaza na trzecim stopniu utlenienia (Fe(III)) ugrupowania hemowego izoenzymu P450 3A4. Indukcja enzymów może nastąpić po wielokrotnym podaniu niektórych leków np. ryfampicyny, etanolu czy karbamazepiny, które zwiększają aktywność oksydazy mikrosomalnej i układu sprzęgającego poprzez wzmożenie syntezy enzymów mikrosomalnych [Manikandan i in. 2018]. Ciekawym przykładem jest również efekt działania soku grejpfrutowego. Zawarte w nim składniki (szczególnie 6,7-dihydroksybergamotyna) hamują aktywność izoenzymu P450 3A4. Wynikiem tego jest zmniejszenie metabolizmu m.in. doustnych blokerów kanałów wapniowych, estradiolu, diazepam, midazolamu, czy statyn np. symwastatyny, której głównym metabolitem jest β -hydroksykwas. Jest to inhibitor reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA), enzymu katalizującego wczesny etap biosyntezy cholesterolu. W przypadku spożycia szklanki soku grejpfrutowego efekt jest minimalny i nie ma znaczenia klinicznego. Jednakże spożywanie bardzo dużych ilości soku (ponad 1 litr na dobę) znacznie zwiększa aktywność w osoczu reduktazy HMG-CoA. Dlatego też, przy przyjmowaniu leków najlepiej jest popijać je czystą wodą niegazowaną [Salomon i in. 2007]. Przykłady indukcji i inhibicji wybranych izoenzymów cytochromu P450 zamieszczono w Tabelach II.5. i II.6

Tabela II.5. Przykłady indukcji aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 [Wilkinson 2005, Futunde i in. 2020]

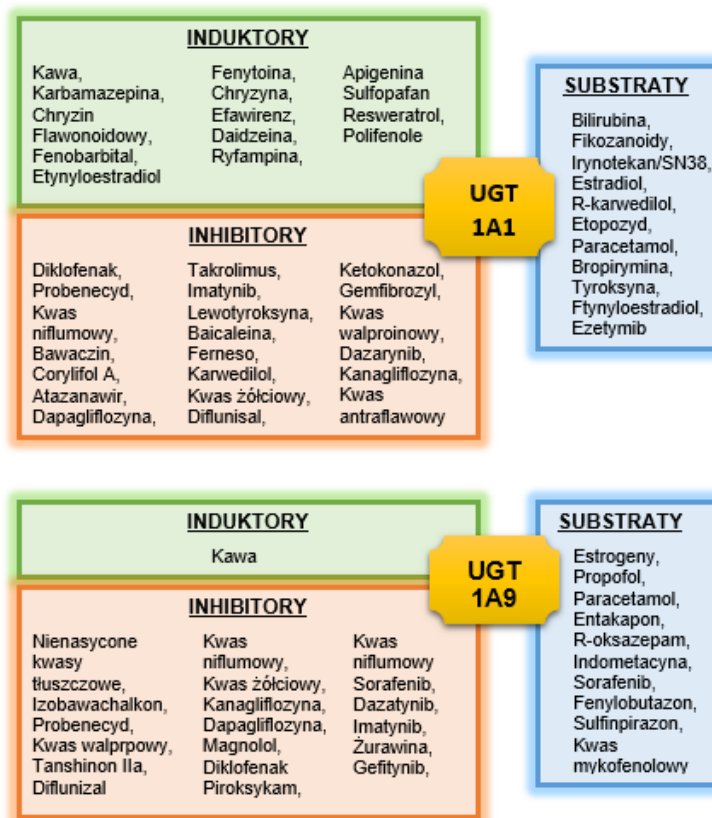
Rodzina P450	Substancje indukujące metabolizm	Leki, których metabolizm jest wzmożony
1A2	benzopiren (dym papierosowy), karbamazepina, fenobarbital, ryfampicyna	acetaminofen, klozapina, haloperidol, teofilina, TLPD, warfaryna
2C9	barbiturany (zwłaszcza fenobarbital), fenytoina, prymidon, ryfampicyna	barbiturany, chloramfenikol, warfaryna, doxorubicyna, ibuprofen, tolbutamid, fenytoina, chlorpromazyna, sterydy,
2C19	karbamazepina, fenobarbital, fenytoina	TLPD, fenytoina, topiramata, warfaryna
2E1	etanol, izoniazyd	acetaminofen, etanol, halotan
3A4	ryfampicyna, kortykosteroidy, barbiturany, karbamazepina, efawirenz, fenytoina, troglitazon	TLPD, ketokonazol, blokery wapnia, SSRI, cyklosporyna, doksorubicyna, tamoksifen, erytromycyna, estrogeny, benzodiazepiny, omeprazol, ryfampicyna, efawirenz,

Tabela II.6. Przykłady inhibicji wybranych izoenzymów cytochromu P450 [Wilkinson 2005, Futunde i in. 2020]

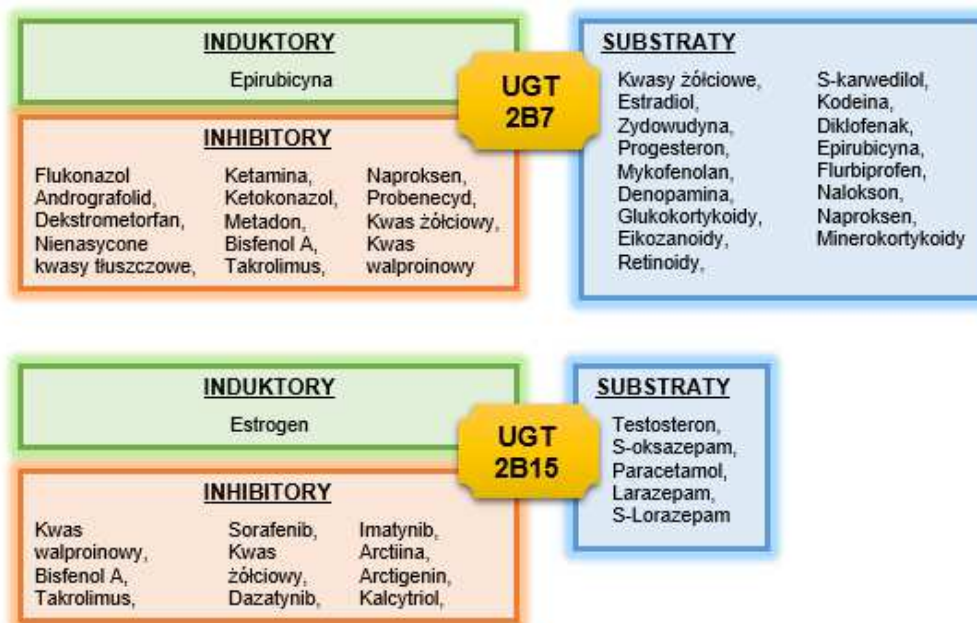
Rodzina P450	Substancje hamujące metabolizm	Leki, których metabolizm jest hamowany
1A2	cymetydyna, fluorochinony, makrolidy, izoniazyd, zileuton, sok grapefruitowy	acetaminofen, klozapina, haloperidol, teofilina, TLPD, warfaryna
2C9	amiodaron, chloramfenikol, cymetydyna, izoniazyd, SSRI, metronidazol, zafirlukast	barbiturany, chloramfenikol, warfaryna, doxorubicyna, ibuprofen, tolbutamid, fenytoina, chloropromazyna, sterydy,
2C19	omeprazol, SSRI	fenytoina, topiramát, warfaryna
2D6	amiodaron, cymetydyna, chinidyna, SSRI	TLPD, flekainid, lidokaina, opioidy meksyletyna,
3A4	amiodaron, ketokonazol, cymetydyna, klarytromycyna, SSRI, fluorochinony, sok grapefruitowy, erytromycyna, tacrolimus, chinina,	antyarytmiki, TLPD, ketokonazol, tamoksyfen, benzodiazepiny, blokery wapnia, cyklosporyna, doksorubicyna, SSRI, efawirenz, omeprazol, sildenafil, trazodon, erytromycyna, estrogeny, ryfampicyna, nefazodon,

II.5.2.2. Modulacja aktywności izoenzymów UGT

Podobnie jak w przypadku izoenzymów cytochromu P450, na ekspresję i aktywność UDP-glukuronilotransferaz mogą mieć wpływ różne czynniki, w tym czynniki genetyczne (polimorfizm genetyczny) i niegenetyczne czynniki regulujące (receptory jądrowe, szlaki sygnalizacji komórkowej, nieprawidłowe stany fizjologiczne itp.). Wszelkie zaburzenia ekspresji, jak i aktywności metabolicznej izoenzymów UGT mogą wpływać na stan fizjologiczny, równowagę metaboliczną endogennych lub egzogennych substancji, ich toksyczność, a także powodować choroby wywołane zaburzeniami metabolicznymi [Korprasertthaworn i in. 2019]. Na przykład zahamowana bądź obniżona aktywność UGT1A1 powoduje zaburzenia w metabolizmie bilirubiny, co związane jest występowaniem chorób takich jak zespół Criglera-Najjara i zespół Gilberta. Zmiany właściwości funkcjonalnych enzymów UGT mogą znacząco wpłynąć na klirens czynników rakotwórczych, powstanie przewlekłego stanu zapalnego, a także inicjację procesu nowotworzenia. Wiadomo bowiem, że polimorfizmy izoenzymów UGT1A1, 1A6, 2B4, 2B7 oraz 2B15, metabolizujących hormony steroidowe ściśle związane są z rakiem piersi, endometrium i prostaty. Na przykład niższa ekspresja UGT1A1 zmniejsza ryzyko wystąpienia raka endometrium, ponieważ w mniejszym stopniu wydalany jest 2-hydroksyestradiol, antyproliferacyjny metabolit estradiolu. Natomiast genotyp UGT1A1 o wysokiej aktywności wiąże się z niższym poziomem przeciwutleniającej bilirubiny w surowicy, co powoduje wzrost ryzyka zachorowalności na raka płaskonabłonkowego przełyku [Yang 2017]. Oprócz opisanych powyżej funkcji UGT, enzymy te są niezbędne do metabolizowania leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Dysfunkcja UGT odgrywa znaczącą rolę w przemianach metabolicznych leków i związana jest z toksycznością tych leków. Dotychczas zidentyfikowano dużą liczbę induktorów, jak i inhibitorów enzymów należących do UGT. Ich obecność w organizmie pacjenta może powodować interakcje typu lek-lek, którym często towarzyszy zmieniona ekspozycja na lek, jak i powiązana z nim toksyczność, a także występowanie skutków ubocznych. Przykłady indukcji i inhibicji wybranych izoenzymów UGT wraz z ich substratami zamieszczono na Rys II.18 i II.19.



Rys.II.18. Induktory i inhibitory wybranych izoform UGT1A i powiązanych z nimi substratów. [Yang 2017]



Rys.II.19. Induktory i inhibitory wybranych izoform UGT2B i powiązanych z nimi substratów. [Yang 2017]

Należy również nadmienić, że zmiany w aktywności UGT mogą mieć również pozytywny aspekt, ponieważ obniżenie aktywności niektórych izoenzymów z tej rodziny może spowodować

wzmocnienie efektu terapeutycznego leków lub opóźnić wydalanie niektórych antyoksydacyjnych substancji endogennych, jak i ksenobiotyków. Co ciekawe, w niektórych przypadkach obniżona aktywność UGT związana jest ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia niektórych nowotworów z powodu przedłużonej ekspozycji na leki terapeutyczne [Yang i in. 2017].

II.5.2.3. Hamowanie glukuronidacji aktywnego metabolitu Irinotekanu

Irinotekan (CPT-11) to półsyntetyczny analog kamptotecyny, który należy do inhibitorów topoizomerazy I, a zatem hamuje replikację i transkrypcję DNA. CPT-11 jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym, którego mechanizm działania i szlak metaboliczny jest bardzo dobrze poznany. Jest on prolekiem, dlatego też wymaga aktywacji przez karboksyesterazę do aktywnego metabolitu 7-etylo-10-hydroksykamptotecyny (SN-38). Aktywna forma SN-38 jest następnie dezaktywowana przez glukuronidację katalizowaną głównie przez izoenzym UGT1A1 do postaci nieaktywnej tj. glukuronidu SN-38 (SN-38G) [de Man i in. 2018]. W przypadku leczenia samym irinotekaniem lub w terapii kombinowanej odpowiednio 30-40% i 11-37% pacjentów wymaga hospitalizacji ze względu na wystąpienie ciężkiej biegunki, która może zagrażać życiu [Wang i in. 2017]. Przyjmuje się, że odpowiedzialna jest za to akumulacja SN-38, której przyczyną może być niewydajna glukuronidacja wynikająca z polimorfizmu izoenzymu UGT1A, hydrolizy SN-38G do aktywnej formy SN-38 przez bakteryjne β -glukuronidazy, a także z inhibicji UGT1A1 związanej z interakcjami lek-lek w terapiach kombinowanych [Katzung 2012, Guthrie i in. 2017]

II.5.2.4. Indukcja ekspresji UGT

Komórki nowotworowe wykształciły szereg mechanizmów oporności na leki stosowane w leczeniu chorób nowotworowych. Obserwuje się m. in. nadekspresję transporterów błonowych, a także celów molekularnych leków np. topoizomeraz DNA i enzymów metabolizujących leki. Nadekspresja enzymów odpowiedzialnych za detoksykację leków przeciwnowotworowych przyczynia się do spotęgowania procesu inaktywacji tych związków. Skutkiem tego jest zmniejszenie wrażliwości komórek nowotworowych na chemoterapię lub nawet nabycie przez nie lekooporności [Hu i in. 2015]. Wykazano, że aktywny metabolit irinotekanu tj. SN-38 indukuje ekspresję izoenzymu UGT1A1 w komórkach nowotworowych za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego PXR [Basseville i in. 2011]. Nadekspresja tego izoenzymu przyczynia się do zmniejszenia wrażliwości komórek nowotworowych na irinotekan. Podobne wyniki zaobserwowano również w przypadku innego leku przeciwnowotworowego, tamoksifenu, którego jedną z głównych ścieżek dezaktywacji jest glukuronidacja. Hydroksylowe aktywne pochodne tamoksifenu metabolizowane są głównie przez UGT2B7 i UGT2B15. Wykazano, że pochodne 4-OHTAM (ang. 4-hydroxy tamoxifen) oraz endoksifen indukują ekspresję izoenzymu UGT2B15 w komórkach nowotworowych piersi, co wiąże się z promowaniem ich inaktywacji. Rolę tego zjawiska w oporności nowotworów potwierdzają również badania profili ekspresji enzymów UGT w ksenoprzeszczepach. Wykazały one znacząco wyższą ekspresję mRNA UGT2B15 w nowotworach opornych niż w tych wrażliwych na terapię [Chanawong i in. 2017]. Ponadto

wykazano indukcję ekspresji UGT2B7 w komórkach HepG2 kontrolowane poprzez ścieżkę sygnałową p53 przez epirubicynę, powszechnie stosowany lek przeciwnowotworowy metabolizowany na drodze glukuronidacji. Co więcej, takie samo zjawisko zaobserwowano w przypadku innych leków przeciwnowotworowych niebędących substratami UGT2B7: trzech leków z grupy antracyklin (doxorubicyny, daunorubicyny, idarubicyny) oraz sześciu leków z innych grup (mitomycyny C, 5-fluorouracylu, kamptotecyny, SN-38, topotekanu i etopozydu). Zjawisko to może mieć więc kluczowe znaczenie w terapii kombinowanej, bowiem połączenie dwóch lub trzech leków spośród tych dziewięciu jest często stosowane w leczeniu różnych nowotworów. Jednym z przykładów jest zastosowanie epirubicyny i mitomycyny C w leczeniu zaawansowanego nowotworu wątrobowokomórkowego. W takim przypadku jeśli mitomycyna C spowoduje indukcję UGT2B7 *in-vivo* zwiększona glukuronidacja epirubicyny może skutkować obniżeniem efektywności terapii. Podobnie indukcja UGT2B7 przez jeden z leków cytotoksycznych może promować glukuronidację niecytotoksycznych leków będących substratami tego enzymu np. morfiny przyczyniając się do zmniejszenia ich działania terapeutycznego [Wilkinson 2005].

II.6. Metabolizm *in vitro*, rola w badaniach przedklinicznych

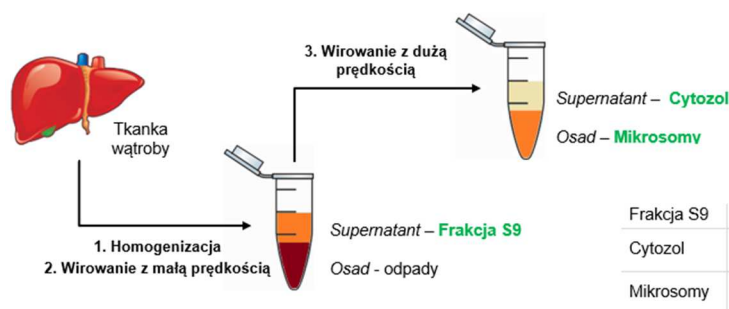
Proces opracowywania nowych leków obejmuje badania przedkliniczne i cztery fazy badań klinicznych. Badania przedkliniczne, do których zaliczane są badania *in vitro* oraz *in vivo* są prowadzone według różnych protokołów, które w większości są zgodne z przepisami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (ang. Good Laboratory Practice, GLP). Na wczesnym etapie rozwoju tych badań podejmuje się decyzję dotyczącą przyszłości dalszych losów potencjalnego leku. Kandydat na lek musi przejść kilka etapów jego wdrażania, takich jak: określenie dostępności leku (badania farmakokinetyki), wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji (ADME) oraz wstępne badania, które mają na celu zbadanie bezpieczeństwa jego stosowania poprzez określenie m. in. genotoksyczności, mutagenności i toksyczności ogólnej. Celem tych badań jest uzyskanie pierwszych i niezwykle cennych informacji, które są niezbędne do dalszych etapów wdrażania leku [Andrade i in. 2016].

Pierwszym etapem badań nad nowym lekiem są badania *in vitro*. Dzięki nim właściwości danej substancji można wykazać pozaustrojowo. Odbywa się to zazwyczaj na biochemicznych układach enzymatycznych, modelach hodowli komórkowych lub w tkankach wyizolowanych z organizmów przebadanych wcześniej zwierząt. Badania przedkliniczne na materiale wyizolowanym przydatne są w celu określenia stabilności metabolicznej potencjalnego leku [Shu i in. 2008]. Przemiany metaboliczne zachodzące w żywych organizmach są procesami determinującym farmakokinetyczny profil każdego leku, gdyż wiele spośród stosowanych w lecznictwie związków wymaga metabolicznej aktywacji. Procesy detoksykacyjne również odgrywają istotną rolę, bowiem wpływają na szybkość eliminacji aktywnych form leku z organizmu pacjenta, a zatem skracają czas działania terapeutyków. W niektórych przypadkach metabolizm może prowadzić do powstania dużo bardziej toksycznych produktów, które mogą być

odpowiedzialne za niepożądane i niebezpieczne efekty w organizmie. Dlatego też bardzo ważne jest głębokie poznanie procesów metabolicznych i detoksykacyjnych potencjalnych leków, w tym leków przeciwnowotworowych [Mróz i in. 2018, Bejrowska i in. 2018]. Wiedza ta pomaga przewidzieć wystąpienie oddziaływań pomiędzy stosowanymi jednocześnie kilkoma lekami w tzw. terapiach wielolekowych. Interakcje te mogą prowadzić do inhibicji lub indukcji szlaków innych leków, w tym nie tylko szlaków metabolicznych, ale również innych zaangażowanych w prawidłowe funkcjonowanie komórki [Kumar i in. 2001]. Zależności te są niezwykle istotne szczególnie z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej. Dlatego też ważnym jest, by w pogłębianiu wiedzy dotyczącej powyższych zagadnień, posługiwać się odpowiednimi modelami eksperymentalnymi. Istnieje kilka systemów *in vitro* stosowanych do badań nad metabolizmem leków i ich wpływem na ekspresję enzymów metabolizujących. Badania te prowadzone są zarówno w systemach bezkomórkowych, jak i komórkowych.

II.6.1. Badania metabolizmu w układach bezkomórkowych

Na tym etapie badań, w celu określenia podatności danego związku na przemiany metaboliczne w układach bezkomórkowych, inkubuje się go z frakcją enzymatyczną (zawierającą enzymy metabolizujące ksenobiotyki) wraz z dodatkiem ich kofaktorów np. NADPH, czy UDPGA, które odpowiedzialne są za aktywację danej grupy enzymów [Andrade i in. 2016]. Metody badania metabolizmu w układach bezkomórkowych pozwalają na testowanie dużych ilości związków w stosunkowo krótkim czasie, wykonanie wysokowydajnych badań przesiewowych oraz automatyzację procedur [Richardson i in. 2016]. Detekcję badanej substancji i jej metabolitów, po uprzednim kontakcie z aktywnymi enzymami umożliwiają techniki spektrometrii masowej (MS) i chromatografii cieczowej (LC) [Shu i in. 2008, Mróz i in. 2018]. Należy nadmienić, iż w metodach tych istnieje możliwość stosowania elementów ludzkich komórek, co znacznie zwiększa znaczenie tych badań w przypadku określania podatności potencjalnych leków na metabolizm u człowieka. W praktyce, jako źródło enzymów stosuje się m. in. enzymy mikrosomalne wyizolowane z ludzkiej wątroby (ang. human liver microsomes, HLM), frakcję cytozolową (ang. human liver cytosol, HLC), frakcję S9 ludzkiej wątroby (mieszaninę mikrosomów i cytozolu), a także izoenzymy rekombinantowe [Richardson i in. 2016]. Większość z nich dostępna jest komercyjnie. Dawniej wszystkie białka pozyskiwano z tkanek żywych organizmów (Rys.II.20). Jednak w przypadku enzymów rekombinantowych ze względu na nieustannie rosnące zapotrzebowanie, tego typu metody okazały się mało wydajne. Problem niedoboru rozwiązano dzięki rozwojowi biotechnologii. Zastosowanie technik rekombinacji DNA umożliwiło masową produkcję prowadzoną w specjalnych systemach komórkowych tj. w bakteriach, drożdżach, owadach, roślinach i zwierzętach, do których za pomocą odpowiednich wektorów wprowadza się namnożony transgen, czyli fragment genu kodującego pożądaną białko [Targovnik i in. 2016].



Rys.II.20. Schemat procedury otrzymywania frakcji enzymatycznych z wątroby [opracowanie na podstawie Richardson 2016]

II.6.1.1. Bakteryjny model komórkowy

Cały proces transfekcji komórek bakteryjnych, aż do momentu osiągnięcia stabilnej ekspresji wprowadzonego białka jest stosunkowo szybki i trwa około 3 miesięcy. W bakteryjnych systemach ekspresyjnych nadal dominuje system *Escherichia coli* i pozostaje układem preferowanym w badaniach laboratoryjnych [Chen 2012, Pawłowska 2014]. Innym modelem komórkowym, w którym otrzymano enzymy rekombinantowe cytochromu P450 jest szczep *Salmonella typhimurium* [Kamataki 2006]. Dzięki zastosowaniu tzw. bakteriofagów, czyli wirusów atakujących bakterie, w łatwy sposób wprowadza się różne rodzaje wektorów o silnych promotorach. Utrzymanie takiej hodowli komórkowej nie wymaga wysokich nakładów finansowych, bowiem komórki rosną szybko w standardowych mediach hodowlanych, w zawiesinie o dużej gęstości [Hanlon i in. 2007, Ferrer-Miralles i in. 2013, Pawłowska 2014]. Procedury takich hodowli komórek są proste i dobrze opracowane [Ferrer-Miralles i in. 2013]. Należy zachować m. in. odpowiednią temperaturę, wartość pH i stężenie tlenu (poniżej 1%). Bakterie służą przede wszystkim jako system ekspresyjny dla białek cytochromu P450 m. in. P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 i 3A4. Do katalitycznej aktywności białek cytochromu P450 niezbędny jest prekursor hemu, który należy dodawać do medium hodowlanego. Główną wadą tego systemu ekspresyjnego jest to, że potranslacyjna modyfikacja białek przebiega inaczej niż w komórkach ludzkich. W N-terminalnej sekwencji cDNA kodującej białko następuje modyfikacja, a dokładniej zwiększenie zawartości par AT, co zapobiega formowaniu się struktur drugorzędowych, a także zwiększa rozpuszczalność białek [Gillam, 2008, Pawłowska 2014].

II.6.1.2. Drożdżowy model komórkowy

Drożdże są doskonałymi gospodarzami do produkcji funkcjonalnych rekombinantowych białek przeznaczonych do zastosowań przemysłowych lub medycznych [Baghban i in. 2019]. Drożdżowy model komórkowy posiada więcej zalet niż system bakteryjny. Proces transfekcji przebiega tutaj również około 3 miesięcy, a hodowla komórek i izolacja rekombinantowego białka nie sprawia większych trudności. Ponadto synteza, fałdowanie i usytuowanie białka w błonie komórkowej przebiegają identycznie jak w komórkach ssaków [Cheng i in. 2006, Pawłowska 2014]

Baghban i in. 2019]. Modyfikacja N-terminalnej sekwencji kodującej białko nie jest wymagana. Główną wadą drożdżowego systemu ekspresyjnego jest to, że w komórkach drożdży ekspresja reduktazy cytochromu P450 i cytochromu b5 zachodzi na zbyt niskim poziomie, aby doszło do katalitycznej aktywności białek P450, dlatego też podobnie jak w systemie bakteryjnym, do komórek drożdży wprowadza się dodatkowy plazmid kodujący te białka [Cheng i in. 2006, Pawłowska 2014]. Do ekspresji rekombinantowych białek stosuje się komórki drożdżowe pochodzące m.in. z *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* i *Yarrowia lipolytica* [Baghban i in. 2019]. Jednak pomimo wielu zalet, drożdżowy model komórkowy w porównaniu z bakteryjnym jest rzadziej stosowany do ekspresji białek cytochromu P450, ponieważ nie tylko hodowla bakterii i ich transfekcja jest mniej skomplikowana, ale także bakterie nie mają endogennych enzymów cytochromu P450, a ekspresja rekombinantowych P450 zachodzi na wyższym poziomie niż w przypadku drożdży [Schroer i in. 2010, Pawłowska 2014]. W komórkach drożdży osiągnięto ekspresję m.in. następujących ludzkich białek P450 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1 i 3A4 [Hanioka i in. 2010, Yasuda i in. 2010, Pawłowska 2014]. Drożdżowy model komórkowy nie jest powszechnie stosowany do ekspresji innych białek metabolizujących.

II.6.1.3. Owadzi model komórkowy

Owadzi model komórkowy jest bardzo często stosowany do produkcji eukariotycznych białek rekombinantowych, choć nieco mniej powszechny jest on w badaniach laboratoryjnych. Do transfekcji najczęściej stosuje się komórki *Spodoptera frugiperda* (Sf9) lub *Trichoplusia ni* (Tni) [Tiwari i in. 2010, Pawłowska 2014]. Gen kodujący dane białko wprowadza się stosując bakulowirusa, a inkorporacja genu zachodzi we wnętrzu komórki gospodarza. Sama transfekcja trwa od 2 do 3 miesięcy. W komórkach owadzie ekspresja białka przebiega podobnie jak w komórkach ludzkich, nie jest zatem wymagana modyfikacja sekwencji cDNA [Lee i in. 1994, Tiwari i in. 2010, Pawłowska 2014]. Ponadto komórki owadzie są pozbawione endogennych białek cytochromu P450 [Hariparsad i in. 2006]. Podobnie jak w systemach opisywanych wcześniej tj. bakteryjnym i drożdżowym, główną wadą owadziego modelu komórkowego jest niski poziom endogennych enzymów transferu elektronów, w tym reduktazy cytochromu P450. Istnieje zatem potrzeba wprowadzenia do komórki owadzie drugiego wektora niosącego gen tego enzymu lub utworzenia jednego podwójnego wektora, zawierającego izoenzym i reduktazę cytochromu P450 [Crespi i in. 1997, Pawłowska 2014]. Do pożywki hodowlanej dodaje się również prekursor hemu, niestety mimo to, w części populacji komórek owadzie może brakować apoproteiny w strukturze hemu [Venkatakishnan i in. 2001]. Pierwsze owadzie modele komórkowe, w których otrzymano ekspresję ludzkich białek cytochromu P450 zostały opracowane przez zespół J.T. Battersa [Buters i in. 1994]. Opracowano również komórki owadzie, w których otrzymuje się ekspresję większości białek zaangażowanych w metabolizm związków endo- i egzogennych [Stiborová i in. 2017]. Są to tzw. Supersomes™ wykazujące bardzo wysoki poziom aktywności katalitycznej. Obecnie, m. in. w ofercie handlowej dostępnych jest ponad 40 różnych, zarówno ludzkich jak i zwierzęcych rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450,

a także monooksygenaz flawinowych (FMO), oksydaz monoaminowych (MAO), UDP-glukuroniltransferaz (UGT), N-acetylotransferaz (NAT), karboksyesterazy (CES)) i ludzka oksydaza aldehydowa (AO) [Product Catalog].

II.6.2. Badania metabolizmu w komórkach nowotworowych

W przypadku badań nad metabolizmem potencjalnych leków coraz szerszym stało się stosowanie stabilnych linii komórek nowotworowych [Kumar i in. 2001, Chanawong i in. 2017], w tym takich, w których w sposób sztuczny uzyskano nadekspresję wybranych enzymów metabolizujących leki np. cytochromu P450 lub UGT [Gomez-Lechón 2008]. Postęp nauki pozwalający na hodowlę różnych linii komórek nowotworowych w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) umożliwia bardziej wiarygodne przejście pomiędzy badaniami biochemicznymi a doświadczeniami na zwierzętach. Eksperymenty prowadzone w komórkach nowotworowych zachowują całokształt wpływu warunków metabolizmu komórkowego na badany proces przy jednoczesnym ograniczeniu oddziaływania czynników egzogennych. Pozwala to uzyskać fizjologiczny poziom stężenia m. in. enzymów, kofaktorów i związków niskocząsteczkowych, przez co warunki *in vivo* są imitowane znacznie lepiej niż w układach bezkomórkowych. Z drugiej strony, wyniki badań na liniach komórkowych charakteryzują się mniejszą powtarzalnością niż te, otrzymane w modelach bezkomórkowych. Hodowla komórek ssaczy jest bowiem narażona na liczne wahania związane z różną tolerancją komórek na zmiany pH, temperatury, a także różnym tempem wzrostu komórek. Ponadto tworzenie ssaczy systemów ekspresyjnych białek metabolizujących jest zdecydowanie najtrudniejszą metodą spośród wszystkich opisanych wyżej modeli. Cały proces transfekcji trwa około 6 miesięcy. Wadą tego systemu niewątpliwie są wysokie koszty utrzymania (wysoka cena podłoża hodowlanych i odczynników do podtrzymania nadekspresji) [Hariparsad i in. 2006], a także zdecydowanie niższy poziom ekspresji białek metabolizujących niż w systemach bakteryjnych, drożdżowych, czy owadzych.

W tabeli II.7 przedstawiono przykłady ludzkich linii komórkowych, w których otrzymano nadekspresję enzymów zaangażowanych w I i II fazę metabolizmu leków. Zastosowanie hodowli komórkowych w biofarmacji ma przede wszystkim na celu poznanie mechanizmów wnikania i wychwytu substancji chemicznych przez komórki. Umożliwia to wytypowanie, z licznej niekiedy grupy takich związków, których właściwości są najkorzystniejsze pod względem biofarmaceutycznym. Zatem wprowadzona technologia hodowli komórek pozwoliła na gwałtowny postęp nauk biomedycznych ponieważ stanowi tańszą i etycznie dopuszczalną alternatywę wielu badań na zwierzętach [Kumar i in. 2001, Pawłowska 2014].

Tabela II.7. Przykłady ludzkich linii komórkowych z nadekspresją enzymów I i II fazy metabolizmu [Pawłowska i in. 2011]

Linia komórkowa	Enzymy I fazy metabolizmu	Enzymy II fazy metabolizmu
AHH-1 TK+/-	P450: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C6, 2C9, 2D6, 2E1. 3A4	

Linia komórkowa	Enzymy I fazy metabolizmu	Enzymy II fazy metabolizmu
Caco-2	P450: 2A6, 3A4	
HEK293 (AD-293)	P450: 1A1, 1A2, 2C8, 2C9	UGT: 1A1, 1A3, 1A4, 1A8, 1A10, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28
HeLa		UGT1A9
HepG2	P450: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2E1, 3A4	
MCF-7	P450: 1A1, 2A6, 2D6, 3A4	GST: Alpha 2, Mu SULT1A1

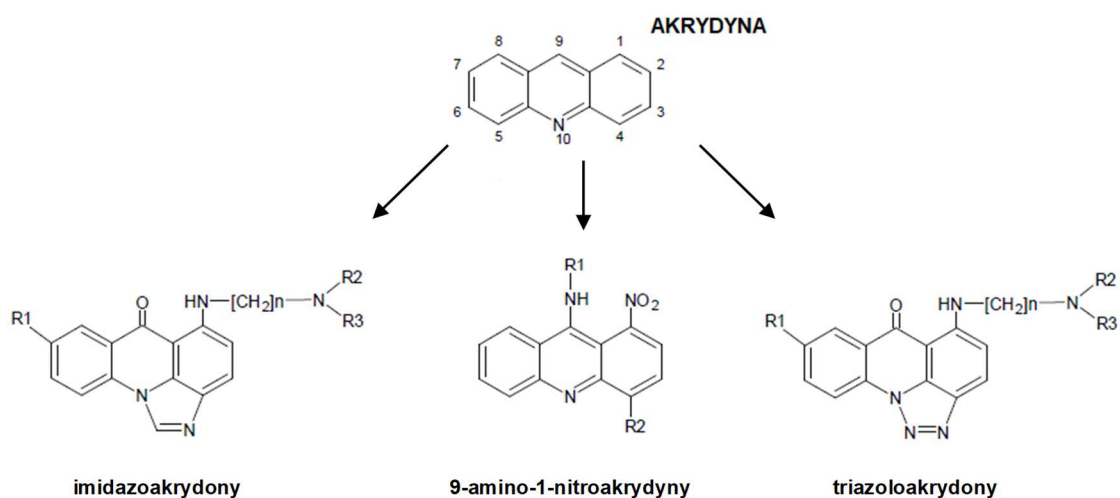
Wybór typu komórek do prowadzonej hodowli uzależniony jest od charakteru planowanych eksperymentów. Do badań przemian metabolicznych najczęściej stosowane są komórki wątroby – hepatocyty. Wykazują one aktywność wielu czynników transkrypcyjnych, w tym receptorów jądrowych oraz enzymów metabolizujących i transporterów błonowych. Posiadają liczne funkcje warunkujące homeostazę organizmu, a także najwierniej odtwarzają reakcje indukcji ekspresji genów obserwowane *in vivo*. Z uwagi na reprodukcjonalność i łatwość hodowli, duże znaczenie mają komórki unieśmiertelnione linii HepG2 i BC2. [Fahmi i in. 2010, Ren i in. 2018]. Stosuje się również wiele innych typów komórek, w tym komórki raka jelita np. HT-29 oraz piersi np. MCF-7 [Dates i in. 2015, Mróz i in. 2018, Bejrowska i in. 2018], które wykazują wysoką aktywność metaboliczną. Należy jednak mieć na uwadze, że poszczególne komórki wykazują różną ekspresję genów kodujących enzymy metaboliczne [Dates i in. 2015]. Dlatego badania takie wymagają starannego wyboru układu modelowego w zależności od m.in. rodzaju enzymów i celu, jaki zamierzamy osiągnąć.

Jednak trzeba wziąć pod uwagę, że badania *in vitro* nie mogą stanowić jedyne dowodu na skuteczność terapeutyczną danej substancji. Korzystne działanie potencjalnego leku może zostać potwierdzone jak również całkowicie wykluczone podczas kolejnej fazy badań tj. badań *in vivo* (na żywych organizmach). W pierwszym etapie przeprowadzane są one na zwierzętach, zwykle szczurach lub myszach. W niektórych przypadkach konieczne jest przeprowadzenie badań na psach, kotach lub małpach [Andrade i in. 2016]. Zdaniem wielu osób badania na zwierzętach są nieetyczne, jednak wydaje się, iż jest to niezbędna procedura do potwierdzenia bezpieczeństwa stosowania potencjalnego leku w ustroju oraz potwierdzenia jego skuteczności przed zastosowaniem u człowieka. Jednak na podstawie badań *in vitro* nie możliwe jest wiarygodne stwierdzenie, iż dana substancja będzie w 100% skuteczna u ludzi [Richardson i in. 2016].

II.7. Pochodne bisakrydyny

Już od wielu lat w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej prowadzone są prace badawcze dotyczące przemian metabolicznych związków

przeciwnowotworowych z grupy pochodnych akrydyny tj. imidazoakrydonów (np. C1311), 9-amino-1-nitroakrydyn (np. C-1748), triazoloakrydonów (np. C1305) oraz od niedawna niesymetrycznych bisakrydyn (Rys.II.21. i II.32).



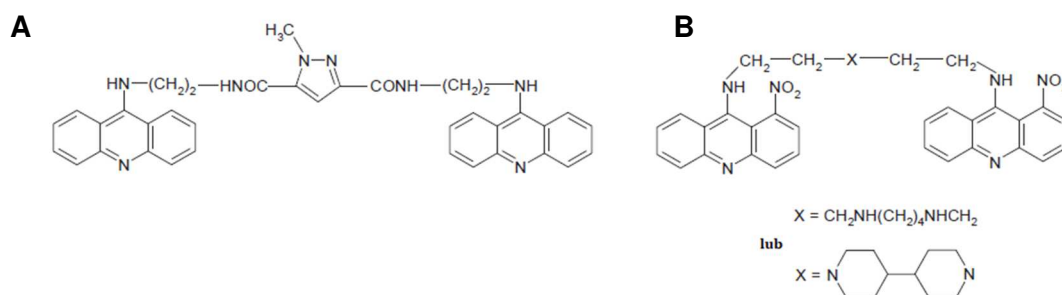
Rys. II.21. Monomeryczne pochodne akrydyny

Akrydyny to heterocykliczne związki o szerokim zakresie właściwości biologicznych i farmaceutycznych. Dotychczas opublikowano szereg prac na temat pochodnych akrydyny [Gabriel 2020, Nowak 2017]. Większość z nich poświęcona jest wysokiej aktywności przeciwnowotworowej tych związków, choć wykazują one również działanie grzybobójcze, przeciw pasożytnicze, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwbólowe i przeciwzapalne. Aktywność przeciwnowotworowa akrydyn zależy od ich zdolności do interkalacji do kwasów nukleinowych: (i) poprzez interkalację pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA i m. in. inhibicję enzymu, topoisomerazy II DNA lub (ii) poprzez stabilizację alternatywnych czteroniciowych struktur DNA tzw. kwadrupleksów G [Sondhi i in. 2013].

Wykazano, że monomeryczne pochodne z grupy akrydonów o symbolach C-1311 i C-1305 interkalują do DNA, jednak fizykochemiczne wiązanie DNA nie jest kluczowe dla wykazywanej przez te związki aktywności przeciwnowotworowej. Właściwości przeciwnowotworowe tych związków związane są natomiast ze zdolnością hamowania aktywności topoisomerazy II oraz oddziaływania z DNA w sposób kowalencyjny, a także tworzenia międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA po wcześniejszej metabolicznej aktywacji [Fedejko-Kap i in. 2012]. Monomeryczne pochodne 1-nitroakrydyny posiadają słabszą zdolność do interkalacji, ale tworzą silne wiązania kowalencyjne z DNA. Wykazano, że właśnie obecność wiązań kowalencyjnych determinuje efekt cytotoksyczny tych związków. Związane jest to obecnością grupy nitrowej w pozycji 1 pierścienia akrydyny, ponieważ w odróżnieniu od innych pochodnych akrydyny struktura trójpierścieniowego układu 1-nitroakrydyny tego związku nie jest płaska, przez co interkalacja do DNA jest utrudniona [Pawlak i in. 1984]. 1-nitroakrydyny nie są natomiast inhibitorami topoisomerazy II [Woynarowski i in. 1989].

Badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością wśród cytotoksycznych związków interkalujących do DNA, które działały jako inhibitory topoisomerazy sugerowały dodatnią korelację między wzrostem cytotoksyczności a siłą odwracalnego wiązania do DNA [Garg i in. 2000]. Wykazano również, że dimeryzacja różnych interkalujących ugrupowań może prowadzić do silnego wzrostu zdolności do wiązania z DNA [Cholody i in. 1995]. Doprowadziło to do pomysłu, aby zaprojektować związki o strukturze dimerów, które mogłyby wykazywać podwójną interkalację do DNA. Otrzymano w ten sposób nowe pochodne, związki z rodziny bisakrydyn [Garg i in. 2000].

Aktywność przeciwnowotworowa bisakrydyn znana jest od lat 80 XX wieku. Z powodu działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe niektóre bisakrydyny rozważa się jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Większość z nich to symetryczne pochodne, w których dwie cząsteczki np. 9-aminoakrydyny (Rys. II.22A) lub 9-amino-1-nitroakrydyny (Rys. II.22B) zostały połączone poprzez grupę aminową różnymi łańcuchami łączącymi, tzw. linkerami. Dowiedziono również, że w zależności od długości linkerów bisakrydyny wykazywały różnice zarówno w powinowactwie do wiązania z DNA, jak i w aktywności przeciwnowotworowej [Nowak i in. 2017]. Niektóre z nich wykazują również silnie działanie przeciwzapalne oraz aktywność przeciwprionową [Sondhi i in. 2013].

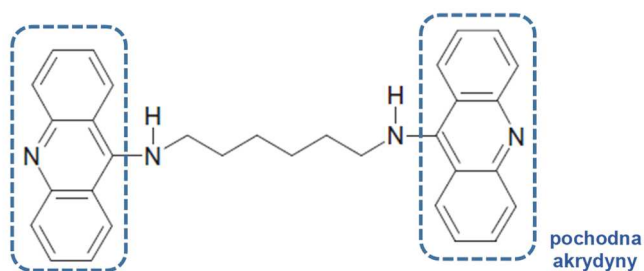


Rys. II.22. Struktura **A** - bis-9-aminoakrydyny (BAPY) **B** – bis-9-amino-1-nitroakrydyny

II.7.1. Symetryczne bisakrydyny jako potencjalne leki

II.7.1.1. Diakrydyny – proste symetryczne bisakrydyny

Jedną z prostszych symetrycznych bisakrydyn, która została uwzględniona w badaniach klinicznych była N,N-di-9-akrydynylo-1,6-heksanodiamina, NSC 219733 (Rys.II.23). Niestety badania te zakończyły się niepowodzeniem, ponieważ związek ten wykazał zbyt dużą toksyczność [Nowak i in. 2017]. Zaprojektowano i zbadano również serię innych diakrydyn o różnych długościach i właściwościach łańcucha łączącego. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że związki posiadające w swojej strukturze mały, sztywny, polarny, neutralny łącznik tj. łańcuch dikarbamoilopirazolowy wykazują znaczące właściwości przeciwnowotworowe. Najaktywniejszym z nich okazał się związek o symbolu BAPY (Rys. II.22A) [Denny i in. 1985].

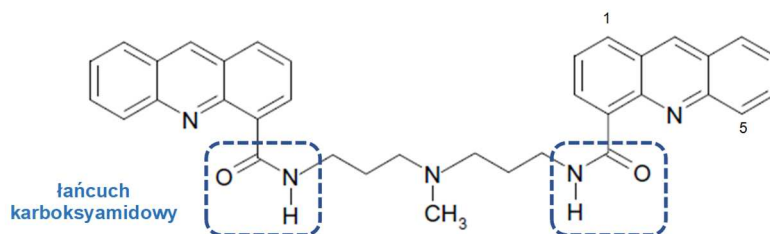


Rys. II.23. Struktura N,N-di-9-akrydynylo-1,6-heksanodiaminy, NSC 219733 [Nowak i in. 2017]

Przeprowadzono również badania symetrycznych bisakrydyn posiadających w swojej strukturze dwie 9-amino-1-nitroakrydyny. Na tej podstawie dowiedziono, że obecność grupy nitrowej w pozycji C1 pierścienia akrydyny jest niezwykle ważna dla aktywności przeciwnowotworowej tych związków. Skuteczna dawka medialna (ang. median effective dose, ED₅₀) dla bisakrydyn przedstawionych na Rysunku II.22B była około dziesięciokrotnie niższa niż dla ich analogów nieposiadających grupy NO₂ [Pastwa i in. 1993].

II.7.1.2. Symetryczne bisakrydyno-karboksyamidy

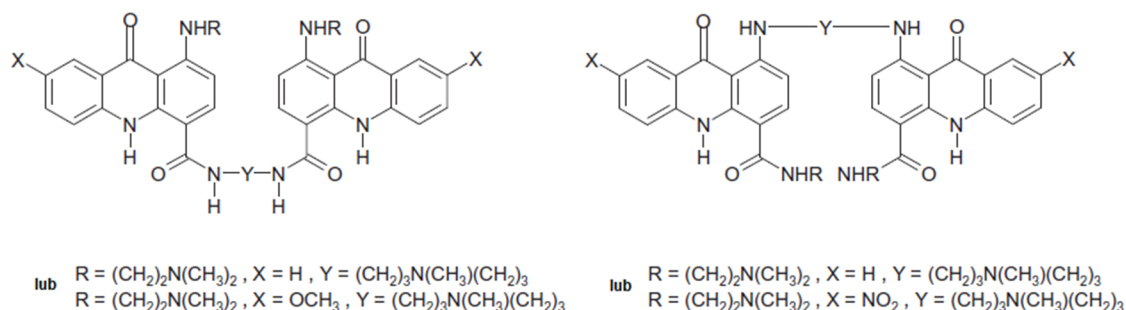
Innym przykładem symetrycznych bisakrydyn są ich pochodne karboksamidowe. Jedną z nich jest związek zwany bis(DACA), w którym dwie podstawione cząsteczki akrydyno-4-karboksyamidu zostały połączone poprzez łańcuch aminoalkilowy Rys.II.24). Związek ten w porównaniu z monomerem DACA wykazał pięciokrotnie i sześciokrotnie niższe IC₅₀ (ang. half maximal inhibitory concentration) odpowiednio w komórkach ludzkiej limfoblastycznej białaczki Jurkat i raka płuc Lewisa [Garg i in. 2000, Nowak i in. 2017].



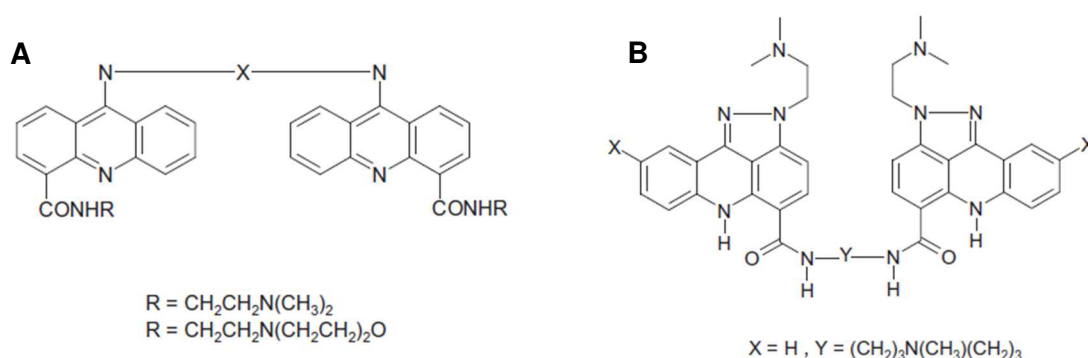
Rys. II.24. Struktura bis(akrydyno-4-karboksyamidu), bis(DACA) [Nowak 2017]

Analogi bis(DACA) zawierające małe podstawniki np. CH₃, Cl w pozycji 5 pierścienia akrydyny wykazywały wyższą cytotoksyczność od niepodstawionego związku. Natomiast większe podstawniki w dowolnej pozycji powodowały spadek cytotoksyczności, prawdopodobnie z powodu obniżenia powinowactwa tych związków do DNA. Seria analogów najsilniej działającego związku bis(5-metyloDACA) z dodatkowymi podstawnikami CH₃ i Cl w pozycji 1 lub 8 pierścienia akrydyny nie wykazywała znaczących różnic w działaniu w porównaniu ze związkiem 5-metylo. Wskazuje to zatem na fakt, że podstawniki w pozycji 1 i 8 pierścienia akrydyny w niewielkim stopniu zwiększają efekt grupy metylowej w pozycji 5 [Gamage i in. 1999, Garg i in. 2000]. Na przestrzeni lat zsyntetyzowano również szereg innych bisakrydyn, w których chromofory połączone są nie tylko w pozycji C4, ale też C1 pierścienia akrydyny (Rys.II.25),

a także bis-(pirymidoakrydyny), jak i bis-(pirazoloakrydynokarboksamidy) i bis-(9-aminoakrydyno-4-karboksamidy) (Rys.II.26), które badane były pod kątem cytotoksyczności i podatności na interkalację do DNA [Wakelin i in. 2003, Antonini i in. 2003 i 2004].



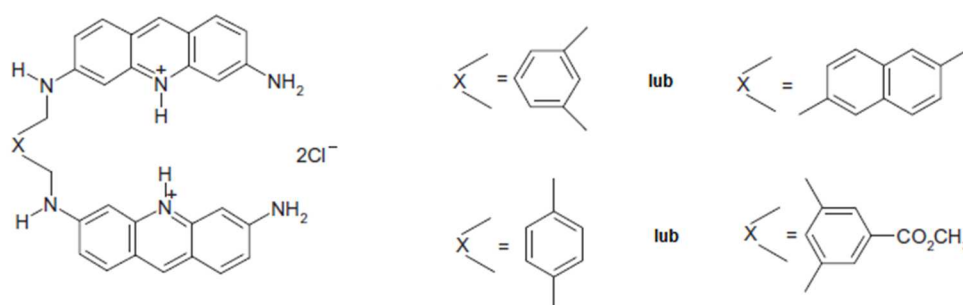
Rys. II.25. Przykłady bis(akrydyno-4-karboksamidów) [Nowak i in. 2017]



Rys. II.26 Przykładowe struktury **A**- bis(9-aminoakrydyno-4-karboksamidu)
B- bis(pyrazolo-9-iminoakrydono-4-karboksamidu) [Nowak i in. 2017]

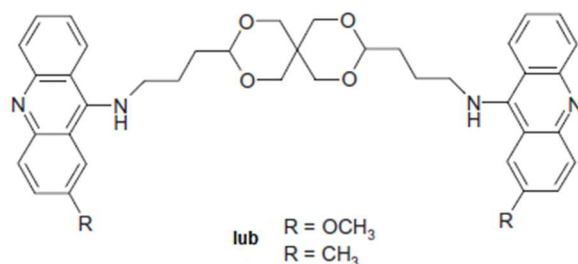
II.7.1.3. Symetryczne bisakrydyny z aromatycznymi lub cyklicznymi pierścieniami w łączniku

Do grupy symetrycznych bisakrydyn zalicza się również takie, które posiadają aromatyczny pierścień w łączniku [Nowak i in. 2017]. Ich przykłady przedstawiono na Rys.II.27. Związki te badano zarówno pod kątem cytotoksyczności jak i zdolności do wiązania z dwuniciowym DNA poprzez interkalację aromatycznego chromoforu pomiędzy pary zasad [Lorente i in. 2004].



Rys. II.27 Przykładowe struktury bisakrydyny z aromatycznym pierścieniem w łączniku [Nowak i in. 2017]

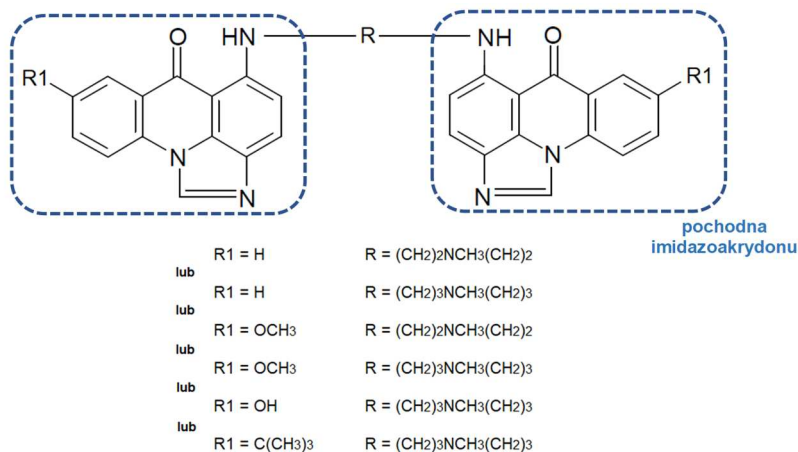
Przykłady bisakrydyn z łącznikiem zawierającym cykliczny pierścień przedstawiono na Rys. II.28. Związki te przebadano pod kątem cytotoksyczności wobec linii komórek nowotworowych tj. raka płuc (NCI H-522), jajnika (PA1), piersi (T47D), okrężnicy (HCT-15) i wątroby (HepG2). Analiza otrzymanych wyników wykazała, że związek z grupą metoksyową wykazywał dobrą aktywność przeciwnowotworową wobec wszystkich linii komórek nowotworowych za wyjątkiem linii HepG2. Ponadto związek z ugrupowaniem metylowym wykazywał lepsze działanie przeciwzapalne w porównaniu z ibuprofenem, najczęściej stosowanym, standardowym lekiem przeciwzapalnym [Sondhi i in. 2013].



Rys. II.28 Przykładowe struktury bisakrydiny z cyklicznym pierścieniem w łączniku [Sondhi i in. 2013]

II.7.1.4. Symetryczne bisimidzoakrydony

Kolejnym przykładem symetrycznych bisakrydyn są bisimidzoakrydony, gdzie tetracykliczne układy pierścieniowe zostały połączone przez N²-metylodietylenotriaminę lub 3,3'-diamino-N-metylodipropylaminowy łącznik (Rys.II.29.). Niektóre z tych związków wykazywały niezwykle wysoką aktywność i selektywność w przypadku raka jelita grubego. Efekt przeciwnowotworowy był również widoczny w testach na komórkach linii HCT116 oraz *in vivo* obejmujących heteroprzeszczepy guza pochodzącego z HCT116 u nagich myszy. Ponadto wykazywały one stosunkowo niską toksyczność ostrą i były dobrze tolerowane przez leczone zwierzęta. Bisimidzoakrydony oddziałują z kwasami nukleinowymi *in vitro*, jednakże wstępne dane eksperymentalne wskazują, iż nie są one bisinterkalatorami [Cholody i in. 1995].



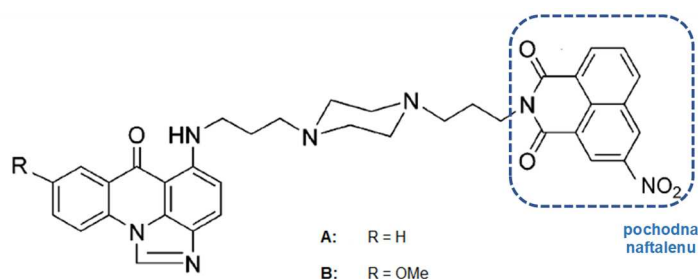
Rys. II.29 Przykładowe struktury bisimidzoakrydonów [Cholody i in. 1995]

II.7.2. Niesymetryczne, dwufunkcyjne pochodne akrydyny

W literaturze można również znaleźć wzmianki o związkach, które w swojej strukturze posiadają dwa różne ugrupowania posiadające zdolność wiązania do DNA, z czego jedno z nich to imidazoakrydon. Drugim monomerem może być np. pochodna naftalimidu [Hariprasha i in. 2007] lub triazoloakrydonu [Cholody i in. 1995].

II.7.2.1. Naftalimid-imidazoakrydony

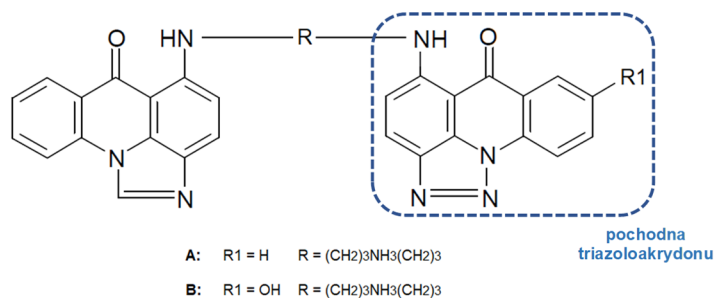
Przykładem niesymetrycznego związku będącego połączeniem imidazoakrydonu z pochodną naftalimidu za pomocą łącznika diaminoalkilowego jest związek o symbolu WMC79 (Rys.II.30A). Wykazywał on właściwości przeciwnowotworowe, jednakże dalsze badania pozwoliły na zoptymalizowanie jego struktury, co doprowadziło do zsyntetyzowania metoksypochodnej o selektywnej aktywności przeciwnowotworowej (Rys.II.30B). Związek ten hamował wzrost wielu linii komórek nowotworowych oraz powodował szybką apoptozę. W odróżnieniu od związku macierzystego (WMC79) był toksyczny zarówno dla komórek nowotworowych posiadających, jak i nie posiadających funkcjonalnego genu *p53*. Wykazywał również silne działanie *in vivo* wobec heteroprzeszczepów ludzkich guzów okrężnicy i trzustki u myszy pozbawionych grasicy. Ponadto dowiedziono, iż nawet niewielkie zmiany w strukturze tych związków prowadziły do znaczących zmian ich właściwości biologicznych [Hariprasha i in. 2007].



Rys. II.30 Struktura naftalimid-imidazoakrydonów **A** – związku WMC79 i **B** - jego metoksyłowej pochodnej [Hariprasha i in. 2007]

II.7.2.2. Imidazoakrydon-triazoloakrydony

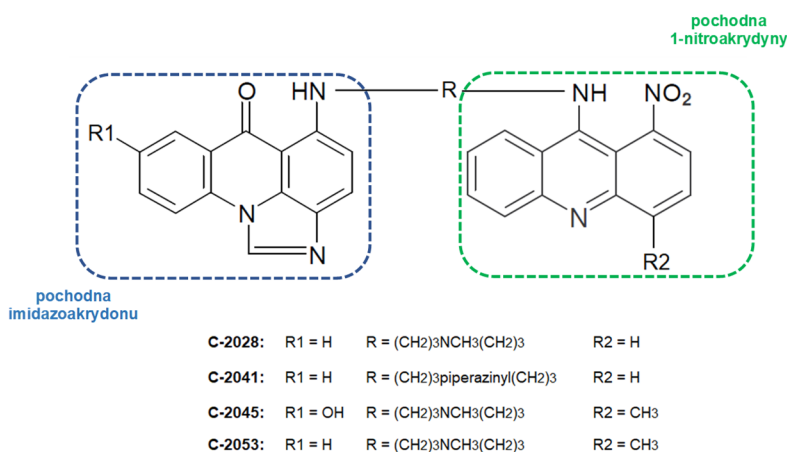
Przykładem niesymetrycznych, dwufunkcyjnych pochodnych akrydyny są związki które posiadają w swojej strukturze pochodną imidazoakrydonu i triazoloakrydonu. Również w przypadku tej grupy związków dowiedziono, iż nawet niewielkie zmiany w strukturze prowadziły do radykalnych zmian w selektywności i aktywności przeciwnowotworowej. Zatem zasugerowano, że podatność na bisinterkalację nie wpływa na zdolność działania tych związków jako środki cytotoksyczne. Ponadto w 48 godzinnym teście wykazano, że związek A (Rys.II.31) posiadał właściwości cytostatyczne, a nie cytotoksyczne. Natomiast oba związki A i B były dobrze tolerowane przez zwierzęta leczone przy dawce nawet do 200mg/kg podawanej przez trzy dni [Cholody i in. 1995].



Rys. II.31 Przykładowe struktury imidazoakrydon-triazoloakrydonów [Cholody i in. 1995]

II.7.3. Niesymetryczne bisakrydyny – krótka charakterystyka

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej zsyntetyzowano nową grupę związków, niesymetryczne bisakrydyny (ang. Unsymmetrical bisAcridines, UAs), których krótką charakterystykę przedstawiono w niniejszym podrozdziale.



Rys. II.30. Struktury chemiczne badanych niesymetrycznych bisakrydyn [Konopa i in. 2017]

Niesymetryczne bisakrydyny to dimeryczne pochodne, w których dwa różne monomery np. pochodna imidazoakrydonu i 1-nitroakrydyny połączone są łańcuchem aminoalkilowym (Rys.II.32.). W laboratorium Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych zostało zsyntetyzowanych kilka grup niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny. Dotychczas opublikowano syntezę 36 związków należących do trzech grup. Powstały one w wyniku połączenia pochodnych 4-nitro lub 4-metyloakrydonów, imidazoakrydonów i triazoloakrydonów z pochodnymi 1-nitroakrydyny [Paluszkiewicz i in. 2020].

Reprezentantami jednej z nich są związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 będące przedmiotem niniejszej pracy. Dotychczas wykazały one aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wielu linii w tym pochodzących z nowotworów prostaty, jelita, piersi oraz trzustki. Hamowały również wzrost ludzkich nowotworów przeszczepionych na tzw. nagie myszy [Konopa i in. 2017 i 2019, Paluszkiewicz i in. 2020]. Ponadto wykazują one ograniczony wpływ na komórki linii prawidłowych [Pilch i in. 2020]. Obecnie trwają również prace mające na celu

zbadanie odpowiedzi komórkowej indukowanej przez niesymetryczne bisakrydyny w komórkach ludzkich nowotworów okrężnicy i płuc, a także badania mające określić charakter oddziaływań tych związków z DNA, ponieważ w przeciwieństwie do wcześniej badanych, monomerycznych pochodnych akrydyny, związki te oddziałują, lecz nie interkalacją do podwójnej nici DNA [Paluszkiewicz i in. 2020].

II.7.4. Metabolizm monomerów badanych niesymetrycznych bisakrydyn

Dotychczas w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wiele uwagi poświęcono na zbadanie szlaków metabolicznych wcześniej badanych monomerycznych pochodnych akrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej [Wiśniewska i in. 2012, Fedejko-Kap i in. 2012, Bejrowska i in. 2018, Mróz i in. 2018]. W tym celu jako środowisko metabolizmu stosowano m.in. białka enzymatyczne w mikrosomach szczurzych i ludzkich, enzymy rekombinantowe, jak i ludzkie komórki nowotworowe np. HepG2 w badaniach *in vitro*.

II.7.4.1. Monomery imidazoakrydonu

Najważniejszym z przedstawicieli imidazoakrydonów, zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, a tym samym jednym z monomerów badanych bisakrydyn jest związek o symbolu C-1311 (Symadex), a dokładniej 5-dietylaminoetyloamino-8-hydroksimidazoakrydon. Otrzymane na przestrzeni lat wyniki wskazują, że związek ten nie jest substratem dla izoenzymów cytochromu P450: P450 1A2, P450 2C9, P450 2C19, P450 2D6 i P450 3A4. Z drugiej strony, pochodna imidazoakrydonu okazała się inhibitorem izoenzymów P450 1A2 i P450 3A4. Jest to inhibicja typu „mechanism-based” [Potęga i in. 2016a i 2016b]. W komórkach HepG2 traktowanych C1311 zaobserwowano osłabienie aktywności izoenzymu P450 3A4 [Bejrowska i in. 2018]. Zarówno inkubacja szczurzych enzymów mikrosomalnych, jak i ludzkich komórek wątroby HepG2 ze związkiem C-1311 dowiodła, iż związek ten ulega metabolizmowi wobec izoenzymów FMO1 i FMO3 dając jako produkt jego N-tlenkową pochodną [Potęga i in. 2011]. Natomiast prowadzone badania nad II fazą metabolizmu wykazały, że C-1311 jest też substratem dla UDP-glukuronilotransferaz (UGT). Najbardziej aktywnym, biorącym udział w przyłączaniu kwasu glukuronowego okazał się izoenzym UGT1A10. W znacznie mniejszym stopniu w glukuronidacji brały udział izoenzymy UGT1A3, UGT1A4, UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A9. Nie zaobserwowano natomiast, aby jakkolwiek UGT z podrodziny B2 katalizował przemianę związku C-1311 do glukuronidu [Fedejko-Kap i in. 2012]. Ponadto C-1311 powodował wzrost aktywności enzymów UGT w komórkach HepG2 i HCT116-UGT1A10 oraz miał niewielki wpływ na aktywność UGT w komórkach HT-29 [Bejrowska i in. 2018].

II.7.4.2. Monomery 1-nitroakrydyny

Pochodne 1-nitroakrydyny C-857 i C-1748, które należą do monomerów badanych pochodnych bisakrydyny są przede wszystkim wydajnie metabolizowane przez reduktazę

cytochromu P450 oraz cytochromy P450 [Wiśniewska i in. 2008 i 2012]. Wykazano, że związek C-1748 jest mniej podatny na metabolizm z udziałem ludzkich i szczurzych enzymów mikrosomalnych wątroby niż C-857. Ponadto oba związki ulegały przemianom metabolicznym wobec trzech izoenzymów P450 1A2, P450 2C19, P450 3A4. W przypadku C-857 produktami metabolizmu wobec wszystkich izoenzymów był prawdopodobnie związek z dodatkowym 6-członowym pierścieniem oraz 1-amino-9-akrydon. Wobec P450 3A4 powstawał 1-nitro-9-akrydon. Związek C-1748 charakteryzował się znacznie niższą podatnością na metabolizm z udziałem P450 niż C-857. Wszystkie izoenzymy metabolizowały go do głównego produktu z 6-członowym pierścieniem. Ponadto prowadzone badania wykazały, że związek C-1748 wywiera wpływ na aktywność i ekspresję DME. W obecności niskich stężeń C-1748 (0,0001-0,1 μ M) zaobserwowano wzrost aktywności enzymatycznej P450 2C9 oraz P450 3A4 w stosunku do standardowych substratów [Niemira i in. 2013]. Pochodna C-1748 jest podatna również na metabolizm II fazy z udziałem UGT. Produkt metabolizmu obserwowany wobec mikrosomalnych frakcji został zidentyfikowany jako glukuronid, dla którego proponowanym miejscem przyłączenia kwasu glukuronowego jest grupa hydroksylowa w łańcuchu aminoalkilowym. Spośród 10 przetestowanych ludzkich rekombinantowych izoenzymów UGT, jedynie UGT2B7 i 2B17 wykazały aktywność wobec C-1748. Związek C-1748 wykazał również zdolność do modulacji aktywności UGT w układach bezkomórkowych i komórkowych. Silną inhibicję zaobserwowano dla rekombinantowych izoenzymów UGT1A9 i UGT2B7 oraz izoenzymów UGT obecnych w komórkach HT-29. Inhibicja rekombinantowego UGT1A9 miała charakter inhibicji mieszanej, natomiast hamowanie aktywności homogenatu komórek HT-29 inhibicji niekompetycyjnej [Mróz i in. 2018].

II.8. Podsumowanie

W świetle przedstawionych doniesień literaturowych istotne jest poznanie szlaków przemian metabolicznych potencjalnych leków, jak również określenie ich zdolności do modulacji aktywności enzymów metabolizujących leki (DME). Niezbędne jest poznanie odpowiedzi na pytanie, czy związek lub jego pochodne, które w przyszłości mają szansę zostać lekami przeciwnowotworowymi podlegają biochemicznym modyfikacjom wobec enzymów z rodziny cytochromu P450, UDP-glukuronylotransferaz, czy monooksygenaz flawinowych. Ponadto należy określić, czy związki te mogą oddziaływać z białkiem enzymatycznym powodując jego inhibicję lub rzadziej aktywację [Fedejko-Kap i in. 2012, Mróz i in. 2018, Yang i in. 2017], co w przyszłości może wywołać u pacjentów istotną zmianę efektywności terapii. Są to niezbędne elementy badań przedklinicznych, które zmierzają do określenia m.in. efektywności detoksyfikacji, ryzyka wystąpienia oporności na zastosowaną terapię, jak również możliwości wywołania niepożądanych interakcji między lekami w terapii wielolekowej. Ponadto należy podkreślić, iż niesymetryczne bisakrydyny to zupełnie nowa, dotąd niezbadana farmakologicznie grupa pochodnych akrydyny, wykazująca wysoką aktywność cytotoksyczną, jak i przeciwnowotworową w układach modelowych i na zwierzętach.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

III.1. Materiały

III.1.1. Związki przeciwnowotworowe

- Bisakrydyny (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) - niesymetryczne, dimeryczne pochodne akrydyny, gdzie dwa monomery: pochodna imidzoakrydonu i 1-nitroakrydyny połączone są łańcuchem aminoalkilowym. Otrzymane w postaci chlorowodorków i metanosulfonianów. Związki te są przedmiotem badań niniejszej pracy.
- C-1212, 5-dimetyloaminopropyloamino-imidzoakrydon, związek cytotoksyczny, stosowany w celach porównawczych, zsyntetyzowany w postaci jednowodnego dichlorowodorku,
- C-1311, 5-dietyloaminoetyloamino-8-hydroksyimidzoakrydon, związek cytotoksyczny, stosowany w celach porównawczych, zsyntetyzowany w postaci jednowodnego dichlorowodorku (Symadex™),
- C-857, 9-(2'-hydroksyetyloamino)-1-nitroakrydyna, związek cytotoksyczny, stosowany w celach porównawczych, zsyntetyzowany w postaci monochlorowodorku (Capridine α),
- C-1748, 9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna, związek cytotoksyczny, stosowany w celach porównawczych, zsyntetyzowany w postaci monochlorowodorku (Capridine β), stosowany w celach porównawczych,
- 1-nitro-9-akrydon, syntetyczny metabolit związku C-857, stosowany w celach porównawczych,
- 1-nitro-4-metylo-9-akrydon, syntetyczny metabolit związku C-1748, stosowany w celach porównawczych.

Związki zostały zsyntetyzowane i oczyszczone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Nowe porcje związków oraz syntetyczne metabolity zostały otrzymane przez dr inż. Ewę Paluszkiewicz.

III.1.2. Odczynniki chemiczne

- Merck (Darmstadt, Niemcy) daw. Sigma-Aldrich: 7-etoksykumaryna (C₁₁H₁₀O₃, 99%), 7-etylo-10-hydroksykamptotecyna (SN-38, min. 98%), 7-hydroksy-4-(trifluorometylo)kumaryna (TFK, 98%), alametycyna, *Trichoderma viride* (5 mg/ml w DMSO, min. 98%), acetonitryl (czystość do HPLC), alkohol etylowy (C₂H₅OH, czystość do HPLC), alkohol metylowy (CH₃OH, czystość do HPLC), bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5difenylotetrazoliowy (MTT, 98%), chloroform (CHCl₃) chlorek magnezu sześciowodny (MgCl₂ x 6H₂O, 98%), chlorowodorek epirubicyny (EPI, min. 90%), czterosodowa sól β-fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (β-NADPHx4Na, 98%)

dichlorowodorek trifluoperazyny (TFP, min. 99%), dodecylosiarczan sodu (SDS, 98%), dwuwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4 , min. 98%), fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF, min. 98,5%), HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, min. 99%), Igepal CA-630, imipramina (kwas borowy (V) (H_3BO_3 , min. 99%), kwas octowy (CH_3COOH , min. 99%), kwas mrówkowy (HCOOH , 98%), kwas fosforowy (V) (H_3PO_4), kwas solny stężony (HCl), pożywka Mc'Coy 5A, pożywka MEM, sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), standard BSA (*Bovine Serum Albumin*, min. 96%), testosteron, tri-(hydroksymetylo)aminometan (tris-zasada, Tris-base), trisodowa sól kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego (UDPGA, 98-100%), trypsyna-EDTA, wodorofosforan (V) potasu (K_2HPO_4 , min. 98%),

- POCH S.A. (Gliwice, Polska): chlorek potasu (KCl, 99,5%), chlorek sodu (NaCl, cz.d.a.), dwuwodny diwodorofosforan (V) sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, cz.d.a.), fluorek sodu (NaF, cz.d.a.), izoprolanol (czystość do LC-MS), sulfotlenek dimetylu (DMSO, min. 99%), wodorotlenek sodu (NaOH, 98,8%).
- Fisher Scientific (Wielka Brytania): mrówczan amonu (HCOONH_4 , czystość do HPLC),
- Bio-Rad (Hercules, CA, USA): zestaw DC do oznaczania białka (odczynnik A i odczynnik B),

III.1.3. Bufory

- Bufor Brittona – Robinsona, 0,04 M, zakres pH 2-12 (0,04 M H_3BO_3 , 0,04 M H_3PO_4 , 0,04 M CH_3COOH) – przygotowany samodzielnie,
- Bufor fosforanowo-potasowy, 0,1 M, pH 7,4 (0,1 M KH_2PO_4 , 0,1 M K_2HPO_4 w stosunku 1:1) – przygotowany samodzielnie,
- Bufor HEPES/P450, 0,1 M, pH 7,4 (2,38 g HEPES/100 ml H_2O) – przygotowany samodzielnie,
- Bufor HEPES/UGT, (0,1 M, pH 7,4 HEPES, 40 mM MgCl_2 , 0,125 mg/ml alametycyna) – przygotowany samodzielnie,
- Bufor HEPES/FMO, (0,1 M, pH 8,5 HEPES) – przygotowany samodzielnie,
- RIPA – bufor lizujący (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 1% Igepal CA-630, 0,5% deoksycholalan sodu, 0,1% SDS)
- Bufor TRIS-zasada - 0,15 M pH 7,4 (1,93 g Tris-zasada/100 ml H_2O) – przygotowany samodzielnie
- Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS, phosphate-buffered saline), 1x stężony, pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 , stabilizowany stężonym HCl)

- Izoton (0,135 M NaCl, 0,013 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 5 mM KCl, 5 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 7 mM NaF)

III.1.4. Enzymy

- Fracja enzymów mikrosomalnych komórek wątroby: szczura (RLM) i człowieka aktywowanych dexametazonem (Dex), 3 – metylocholanrenem (3MC) fenobarbitem (PB), Tebu-bio, Francja,
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450: P450 2C19 i P450 3A4 z koekspresją reduktazy cytochromu P450 (CPR), otrzymane w komórkach *Escherichia coli* (Bactosomes), Cypex Ltd, Dundee, Wielka Brytania, za pośrednictwem Tebu-bio, Francja,
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy monoooksygenazy flawinowej: FMO1, FMO3 i FMO5, otrzymane w komórkach owadzych Sf9 przy zastosowaniu wektorów rekombinowanego bakulowirusa (Supersomes™), Caning, USA, za pośrednictwem DIAG-MED,
- Rekombinantowe ludzkie izoenzymy UDP-glukuronylotransferazy: UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15, UGT2B17, otrzymane w komórkach owadzych Sf9 przy zastosowaniu wektorów rekombinowanego bakulowirusa (Supersomes™), Caning, USA, za pośrednictwem DIAG-MED,

III.1.5. Linie komórkowe ludzkich nowotworów jelita i wątroby

- HCT116 - nowotwór jelita grubego pochodzenia ludzkiego, wyizolowany od dorosłego pacjenta, ATCC, USA
- HCT116-UGT1A10 - subklon linii nowotworu jelita grubego pochodzenia ludzkiego HCT116 transfekowanej stabilnie wektorem plazmidowym z sekwencją genu kodującego izoenzym UGT1A10, otrzymany w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przez dr inż. Monikę Pawłowską [Pawłowska 2020]
- HepG2 – ludzki nowotwór wątroby, wyizolowany od 15-letniego pacjenta pochodzenia kaukaskiego, ATCC, USA
- HT-29 - gruczolakorak jelita grubego pochodzenia ludzkiego, wyizolowany od 44-letniego pacjenta pochodzenia kaukaskiego, ATCC, USA

III.1.6. Odczynniki stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej

- Antybiotyki – penicylina G (62,3 mg/l pożywki) i streptomycyna (100 mg/l pożywki), Merck Darmstadt, Niemcy
- Płodowa surowica bydlęca (FBS, *Fetal Bovine Serum*) inaktywowana termicznie, Merck Darmstadt, Niemcy

- Pożywki: McCoy's 5A Modified Medium dla komórek HCT116 i ich subklonu oraz HT-29, MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) dla komórek HepG2, Merck Darmstadt, Niemcy
- Trypsyna-EDTA 2,5 %, rozcieńczona 10-krotnie roztworem PBS 1x stężonym, Merck Darmstadt, Niemcy
- Wodorowęglan sodowy (NaHCO₃), Merck Darmstadt, Niemcy

III.2. Stosowana aparatura i sprzęt laboratoryjny

III.2.1. Aparatura chromatograficzna

- Chromatograf HPLC Millenium: detektor UV-Vis wielodiodowy PDA (Photodiode Array) 2996, system kontrolny 600E, system pomp 600, inżektor Rheodyne 7725i, oprogramowanie Millenium 32, Waters Co., USA,
- Chromatograf HPLC Shimadzu: detektor UV-Vis typu PDA, Nexera-i, LC - 2040C, 3D, oprogramowanie LabSolution, Shimadzu, Japonia
- Chromatograf HPLC Waters: detektor UV-Vis typu PDA 2996, system pomp 1525, autosampler 717 plus, inżektor Rheodyne 7725i, oprogramowanie Empower 3, Waters Co., USA
- Kolumny chromatograficzne: kolumna analityczna C18, Supelcosil Suplex pKb-100 (25 cm x 4,6 mm, 5µm), prekolumna Supelcosil Suplex pKb-100 Supelguard Cartridge (2 cm x 4 mm, 5µm), Supelco, USA
- System LC/MS Agilent: detektor UV-Vis typu DAD (*Dual Absorbance Detector*), 1290 Infinity II LC, połączony ze spektrometrem mas 6470B z potrójnym kwadrupolem, oprogramowanie OpenLab, Agilent, USA
- System LC/MS Shimadzu: detektor UV-Vis typu PDA, Nexera - i, LC - 2040C, 3D, połączony ze spektrometrem mas LCMS-2020 z pojedynczym kwadrupolem, oprogramowanie LabSobution, Shimadzu, Japonia

III.2.2. Pozostały sprzęt laboratoryjny

- Czytnik płytek, iMarkTM Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
- Homogenizator, ręczny 1 ml, Wheaton Science products, Millville, USA
- Inkubator z atmosferą CO₂ do hodowli komórkowych NuAire IR Autoflow CO₂ Water-Jacked NU-8700, NuAire Inc., USA
- Komora z przepływem laminarnym, Nuair Biological Safety Cabinets, NU-425-400E, NuAire, Inc., USA
- Licznik komórek, Z1 Coulter[®] Particle Counter, Beckam, Fullerton, CA, USA
- Łażnia wodna, Fisherbrand, typ PRL TA14 - Fisher Scientific, Wielka Brytania

- Łażnia ultradźwiękowa, Elmasonic S30H, Elma, Polska
- Palnik z elektronicznym sterowaniem Fireboy Plus, Integra Biosciences, Szwajcaria
- pH-metr, ORION, model 710A - Thermo Orion, USA
- Spektrofotometr dwuwiązkowy UV-Vis CARY 300 Bio - Varian Inc., Australia
- System do oczyszczania wody MiliQ, Integral3 Water Purification System, Merc, Millipore, USA
- Waga analityczna, WA 35, typ PRL TA14, Zakłady Mechaniki Precyzyjnej „MERA-WAG”, Gdańsk, Polska
- Waga techniczna, KERN EG220-3NM - Kern & Sohn GmbH, Niemcy
- Wirówki: Centrifuge 5810R, Centrifuge 5417R, MiniSpin, Eppendorf, Westbury, NY, SA
- Wytwornica lodu, ZBE150, Ziegra Eismaschinen, Niemcy
- Vorteks, Yellow Line TTS2 - IKA, Staufen, Niemcy
- Zamrażarka, Ultra-Low Temperature Freezer MDF-DU500VH-PE, -80°C, Panasonic, Japonia

III.3. Metody doświadczalne

III.3.1. Rozpuszczalność bisakrydyn

Badanie rozpuszczalności prowadzono w temperaturze pokojowej. Do przeprowadzenia prób rozpuszczalności przygotowano próbki typu Eppendorf, do których naważono po 0,5 mg badanej bisakrydyny (C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053). Substancje stałe w miarę możliwości maksymalnie rozdrobniono, gdyż duże kryształy rozpuszczają się powoli, co może być mylnie ocenione jako brak ich rozpuszczalności. Następnie do każdej próbki dodano wodę redestylowaną, 50% alkohol etylowy, DMSO lub 0,05 M bufor mrówczanowy o pH ok. 3,4 w objętości odpowiadającej otrzymaniu 10 mM roztworów, po czym próbki dokładnie wytrząsano i obserwowano efekt. Następnie, gdy otrzymano klarowne roztwory wodne oraz w DMSO rozcieńczono je w stosunku objętościowym 1:10 i 1:100 za pomocą powszechnie stosowanych buforów o pH 7,4 tj. 0,1 M buforze fosforanowo-potasowym, 0,05 M buforze Tris-zasada oraz 0,1 M buforze HEPES. Próbki dokładnie wytrząsano i obserwowano pod kątem wypadania osadu z roztworu. Otrzymanie roztworu klarownego świadczyło o rozpuszczalności bisakrydyny w danym rozpuszczalniku.

III.3.2. Badanie czystości i stabilności bisakrydyn

III.3.2.1. Roztwór H_2O

Przygotowano 0,05 mM wodny roztwór badanego związku (C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053), a następnie go inkubowano po dłuższych czasach w temperaturze pokojowej i w 37°C (Tabela.III.1.) Otrzymane próbki poddano analizie metodą RP – HPLC według punktu III.3.14.

III.3.2.2. Roztwór DMSO/ H₂O

Przygotowano 0,05 mM roztwór wodny badanego związku (C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053) przez rozcieńczenie 10 mM roztworu tego związku w DMSO sporządzonego na świeżo i po przechowywaniu w temperaturze 4°C przez określony czas (Tabela.III.1.). Otrzymane próbki poddano analizie RP – HPLC według punktu III.3.14.

III.3.2.3. Roztwór DMSO/ bufor HEPES

Przygotowano 0,05 mM roztwór badanego związku (C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053) przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO. Inkubację prowadzono w temperaturze 4°C przez czas podany w Tabeli III.3.1. Otrzymane próbki poddano analizie RP – HPLC według punktu III.3.14.

Tabela III.1. Badanie czystości i stabilności bisakrydyn w różnych warunkach – zestawienie stężenia badanego związku, składu mieszaniny analizowanej chromatograficznie, temperatury i czasu inkubacji.

Bisakrydyna	Skład mieszaniny inkubowanej	Temperatura inkubacji	Czas inkubacji
0,05 mM	H ₂ O, bisakrydyna	pokojowa	0, 40, 80 min
	H ₂ O, bisakrydyna (chlorowodorek)	37°C	0, 80 min; 6 godz. 1 dzień
	H ₂ O, bisakrydyna (metanosulfonian)		0, 3 godz.; 1,2 dni
	DMSO, H ₂ O, bisakrydyna	4°C	0, 80 min.; 1, 2, 5 dni
	DMSO, bisakrydyna		1, 2, 5 dni
	DMSO, HEPES, bisakrydyna		0, 80 min; 1 dzień

III.3.3. Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej

III.3.3.1. Określenie pH fazy ruchomej

Dla każdego badanego związku (C-2028, C-2041, C-2045) przygotowano po 21 roztworów o stężeniu 0,1mM w buforze Brittona – Robinsona w zakresie pH od 2 do 12, co 0,5 jednostki. Następnie przeprowadzono ich analizę spektrofotometryczną i zarejestrowano widma UV – Vis.

III.3.3.1. Wpływ pH buforu HEPES na podział chromatograficzny

Analizie poddano roztwory związku C-2045 otrzymane przez jego rozpuszczenie w buforze HEPES o następujących wartościach pH : 2; 3,5; 6,5; 7,4. Na kolumnę dozowano po 50 ul każdego z roztworów. Warunki analizy chromatograficznej przedstawiono w punkcie III.3.14.

III.3.4. Metabolizm bisakrydyn wobec enzymów mikrosomalnych

Wszystkie doświadczenia, które wymagały przeprowadzenia reakcji enzymatycznej wobec mikrosomów szczurzych lub ludzkich, wykonywano według jednej procedury. Pierwszym etapem było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej składającej się z badanego związku (7-etoksykumaryna, C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053), frakcji mikrosomalnej wątroby szczura

lub człowieka, buforu $MgCl_2$. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 70 μ l. Próbkę mieszało się za pomocą vortexu, a następnie preinkubowało w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 2 min. Po tym czasie dodawano kofaktor - NADPH w celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej ($t = 0$ min.). Próbkę ponownie dokładnie mieszało się przy użyciu vortexu, następnie inkubowało w tej samej temperaturze przez określony czas. Reakcję zatrzymywano przez dodatek HCl (8,75 μ l/70 μ l mieszaniny reakcyjnej) lub MeOH w stosunku objętościowym 1:1. Następnie próbki umieszczano na 10 min w lodzie, po czym je wirowano (10 min., 13400 rpm). Otrzymany supernatant poddawano analizie metodą RP – HPLC.

III.3.4.1. Dobór właściwego środowiska reakcji enzymatycznej

Przygotowano mieszaniny zawierające 7-etoksykumarynę, frakcję mikrosomalną komórek wątroby szczura, $MgCl_2$ i określony bufor (Tabela III.2.). Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodatek metanolu w stosunku objętościowym 1:1. Analizę chromatograficzną przeprowadzono według procedury III.3.14.

Tabela III.2. Dobór buforu do reakcji enzymatycznej – zestawienie składu mieszanin reakcyjnych.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
7-etoksykumaryna	2 mM*	0,05 mM
NADPH	10 mM**	1 mM
RLM	20 mg/ml	2 mg/ml
$MgCl_2$	10 mM	2 mM
Reakcja 1	FP	-
Reakcja 2	HEPES/P450	-
Reakcja 3	Tris-zasada	-

*2 mM roztwór 7-etoksykumaryny otrzymano przez rozcieńczenie wodą redestylowaną 20 mM roztworu tego związku w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej

III.3.4.2. Wpływ stężenia związku na przebieg reakcji enzymatycznej

Sporządzono mieszaniny reakcyjne zawierające związek C-2045 o stężeniu 0,02 mM lub 0,05 mM, frakcję mikrosomalną, HEPES oraz $MgCl_2$ (Tabela III.3.). Inkubacje prowadzono przez 0 i 30 min. Reakcję zatrzymywano przez dodatek metanolu w stosunku objętościowym 1:1.

Tabela III.3. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych - badanie wpływu stężenia związku na przebieg reakcji enzymatycznej

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-2045	1 mM*	0,02/0,05 mM
NADPH	10 mM**	1,2 mM
Frakcja mikrosomalna	20 mg/ml	2 mg/ml
$MgCl_2$	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*1 mM roztwór związku C-2045 otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.4.3. Opracowanie warunków zatrzymania reakcji enzymatycznej

Dla każdego związku (C-2045, C-1748) sporządzono po dwie mieszaniny reakcyjne, których skład przedstawiono poniżej (Tabela III.4.). Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min. Jedną z reakcji zatrzymano dodaniem kwasu solnego (8,75µl/ 70 µl mieszaniny reakcyjnej), a drugą metanolem w stosunku objętościowym 1:1.

Tabela III.4. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych zastosowanych dla opracowania procedury zatrzymywania reakcji enzymatycznej.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-1748 / C-2045	1 mM*	0,05 mM
NADPH	10 mM**	1 mM
Fracja mikrosomalna	20 mg/ml	2 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*1 mM roztwór związku C-1748/C-2045 otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.4.4. Wpływ stężenia NADPH na przebieg reakcji enzymatycznej

Przygotowano mieszaniny reakcyjne, których skład został przedstawiony w Tabeli III.5. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano NADPH o stężeniu końcowym 1,2 mM lub 2 mM. Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min. Reakcję zatrzymywano przez dodatek HCl. Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min.

Tabela III.5. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych - badanie wpływu stężenia NADPH na przebieg reakcji enzymatycznej

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-1311/C-1748/C-2045	1 mM*	0,05 mM
NADPH	10 mM**	1,2 / 2 mM
Fracja mikrosomalna	20 mg/ml	2 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*1 mM roztwór związku C-1311/C-1748/C-2045 otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.4.5. Metabolizm bisakrydyn wobec frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura

Mieszaniny reakcyjne sporządzono według danych zawartych w Tabeli III.6. Doświadczenia prowadzono zarówno wobec nieaktywowanych enzymów frakcji mikrosomalnej, jak i aktywowanych, czyli o podwyższonej ekspresji izoenzymów P450 1A, P450-2B lub P4503A. Inkubację prowadzono po czasach 0, 30 min lub 0, 2, 5, 10 min. Reakcję zatrzymywano przez dodatek kwasu solnego.

Tabela III.6. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych - badanie metabolizmu bisakrydyn wobec enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,05 mM
NADPH	10 mM**	2 mM
RLM./Dex/3MC/PB	20 mg/ml	2 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*1 mM roztwór związku C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.5. Metabolizm bisakrydyn wobec enzymów rekombinantowych

Wszystkie doświadczenia, które wymagały przeprowadzenia reakcji enzymatycznej wobec ludzkich izoenzymów rekombinantowych, wykonywano według jednej procedury. Pierwszym etapem było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej składającej się z badanego związku (C-2028/C-2041/C-2045/C-2053), odpowiedniego izoenzymu, buforu HEPES i MgCl₂ (w przypadku P450). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 70 µl. Próbkę mieszano za pomocą vortexu, a następnie preinkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 2 min. Po tym czasie dodawano kofaktor w celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej (t = 0 min.). Próbkę ponownie dokładnie mieszano przy użyciu vortexu, następnie inkubowano w tej samej temperaturze przez określony czas. Reakcję zatrzymywano przez dodatek HCl (8,75µl/70µl mieszaniny reakcyjnej). Następnie próbki umieszczano na 10 min w lodzie, po czym je wirowano (10 min., 13400 rpm). Otrzymany supernatant poddawano analizie metodą RP – HPLC.

III.3.5.1. Badanie metabolizmu wobec rekombinantowych P4502C19 i P4503A4

Przygotowano mieszaniny zawierające badany związek (C-2028/C-2041/C-2045/C-2053), izoenzym P4502C19 lub 3A4, MgCl₂ i bufor HEPES/P450 (Tabela III.7.). W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano NADPH o stężeniu końcowym 2 mM. Inkubację prowadzono przez 0,30 min. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodatek HCl (8,75µl/70µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzano według procedury III.3.14. i III.3.15.1.

Tabela III.7. Zestawienie składników mieszaniny reakcyjnej.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,05 mM
NADPH	10 mM**	2 mM
P450 2C19/3A4	13,5/20,1 mg/ml	0,5 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM

Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-
--------------------------	--------	---

*1 mM roztwór C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, **10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.5.2. Badanie metabolizmu wobec rekombinantowych FMO1, FMO3 i FMO5

Przygotowano mieszaniny zawierające badany związek (C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053), izoenzym FMO1/3/5 i bufor HEPES o pH 8,5 (Tabela III.8.). W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano NADPH o stężeniu końcowym 0,3 mM. Inkubację prowadzono przez 0, 90 i/lub 120 min. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodatek HCl (8,75ul/70ul mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzano według procedury III.3.14. i III.3.5.1 lub III.3.5.2.

Tabela III.8. Zestawienie składników mieszaniny reakcyjnej.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,02/0,05 mM
NADPH	5 mM**	0,3 mM
FMO1/3/5	20 mg/ml	0,5 mg/ml
Bufor HEPES/FMO, pH 8,5	100 mM	-

*1 mM roztwór C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, **5 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.5.3. Badanie reakcji glukuronidacji wobec rekombinantowych UGT

Podatność bisakrydyn na metabolizm wobec UGT zbadano wobec ludzkich izoenzymów rekombinantowych UGT (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15, 2B17). Dla każdego związku (C-2028, C-2041, C-2045, C-2053) sporządzono po mieszaniny reakcyjne, których skład przedstawiono poniżej (Tabela III.9.). W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor UDPGA o stężeniu 5 mM. Inkubację prowadzono przez 0, 30, 60, 90 i/lub 120 min. Reakcję zatrzymano dodaniem kwasu solnego (8,75µl/ 70 µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzano według procedury III.3.14. i III.3.15.1.

Tabela III.9. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,05 mM
UDPGA	20 mM**	5 mM
UGT	5 mg/ml	0,5 mg/ml
Bufor HEPES/UGT	100 mM	-

*1 mM roztwór związku C-2028/C-2045/C-2053 otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, **20 mM roztwór UDPGA otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.6. Badanie wpływu bisakrydyn na aktywność enzymów w układach bezkomórkowych

Badania wpływu bisakrydyn na aktywność katalityczną wybranych enzymów P450 i UGT zbadano wobec ludzkich izoenzymów rekombinantowych P4502C19 i 3A4 oraz UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15, 2B17.

III.3.6.1. Wpływ bisakrydyn na aktywność izoenzymów P4502C19 i P4503A4

Reakcje metabolizmu standardowych substratów przeprowadzono przy braku lub w obecności C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 o różnym stężeniu. Jako substraty standardowe dla P450 stosowano: imipraminę (P4502C19) i testosteron (P4503A4). Mieszanki reakcyjne sporządzono według Tabeli III.10. Następnie postępowano zgodnie z procedurą III.3.4. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor NADPH o stężeniu 2 mM. Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min. Reakcję zatrzymano dodatkiem kwasu solnego (8,75µl/ 70 µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzono według procedury III.3.14.

Tabela III.10. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
Substrat standardowy	1 mM*	0,1 mM
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,002/0,005/0,01/0,02/0,05 mM
NADPH	10 mM**	2 mM
P450 2C19/3A4	13,5/20,1 mg/ml	0,5 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*1 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, **10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.6.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność izoenzymów UGT

Reakcje glukuronidacji standardowych substratów przeprowadzono przy braku lub w obecności C-2028/C-2045/C-2053 o różnym stężeniu. Jako substraty standardowe stosowano: SN-38 (UGT1A1), TFP (UGT1A4), EPI (UGT2B7), a dla pozostałych TFK. Mieszanki reakcyjne sporządzono według Tabela III.11. Następnie postępowano zgodnie z procedurą III.3.4. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor UDPGA o stężeniu 5 mM. Inkubację prowadzono przez 0 i 45 min. Reakcję zatrzymano dodaniem kwasu solnego (8,75µl/ 70 µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzono według procedury III.3.14.

Tabela III.11. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
Substrat standardowy	1 mM*	0,05 mM
C-2028/C-2041/C-2045/C-2053	1 mM*	0,01/0,02/0,05 mM
UDPGA	20 mM **	5 mM

UGT	20 mg/ml	0,5 mg/ml
Bufor HEPES/UGT	100 mM	-

*1 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.7. Określanie parametrów kinetycznych zmian aktywności wybranych izoenzymów P450 3A4 i wybranych UGT wobec bisakrydyn

III.3.7.1. Wpływ na aktywność izoenzymów P450 3A4 w układach bezkomórkowych

Reakcje metabolizmu standardowego substratu (testosteronu) przeprowadzono przy braku lub w obecności C-2045/C-2053 o różnym stężeniu. Mieszanki reakcyjne sporządzono według Tabeli III.12. Następnie postępowano zgodnie z procedurą III.3.4. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor NADPH o stężeniu 2 mM. Inkubację prowadzono przez 0 i 30 min. Reakcję zatrzymano dodatkiem kwasu solnego (6,25µl/ 50 µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzano według procedury III.3.14.

Tabela III.12. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych dla układów bezkomórkowych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
testosteron	0,5 mM*	0,02/0,05/0,1/0,2/0,5 mM
C-2045/C-2053	0,5 mM*	0,005/ 0,01 lub 0,001 mM
NADPH	10 mM**	2 mM
P450 3A4	37 nmol/mg	222 pmol/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*0,5 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, **10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.7.2. Badania aktywności homogenatów HepG2 wobec standardowego substratu dla P450 3A4

Wykonano również badanie podatności na metabolizm standardowego substratu dla P450 3A4 tj. testosteronu w celu określenia aktywności homogenatów HepG2. Mieszanki reakcyjne sporządzono według Tabeli III.13. Następnie postępowano zgodnie z procedurą III.3.4. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor NADPH o stężeniu 2 mM. Inkubację prowadzono przez 0 i 2 godz. Reakcję zatrzymano dodatkiem kwasu solnego (6,25µl/ 50 µl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzano według procedury III.3.14.

Tabela III.13. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych dla układów z homogenatami komórek HepG2

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
testosteron	0,5 mM*	0,02/0,05/0,1/0,2/0,5 mM
NADPH	10 mM**	2 mM

homogenat HepG2	18 mg/ml	1/2,5 mg/ml
MgCl ₂	10 mM	2 mM
Bufor HEPES/P450, pH 7,4	100 mM	-

*0,5 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związku w DMSO, **10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.7.3. Wpływ na aktywność izoenzymów UGT w układach bezkomórkowych i homogenatach komórek linii HepG2

Reakcje glukuronidacji standardowego substratu dla UGT przeprowadzono przy braku lub w obecności C-2028/C-2045/C-2053 o różnym stężeniu. Jako substrat standardowy stosowano TFK. Mieszanki reakcyjne sporządzono według Tabela III.14 lub III.15. Następnie postępowano zgodnie z procedurą III.3.4. W celu zapoczątkowania reakcji enzymatycznej do badanych próbek dodawano kofaktor UDPGA o stężeniu 5 mM. Inkubację prowadzono przez 0, 45 min dla układów bezkomórkowych i 0, 60 min dla układów z homogenatami HepG2. Reakcję zatrzymano dodaniem kwasu solnego (6,25 μl/ 50 μl mieszaniny reakcyjnej). Analizę chromatograficzną przeprowadzono według procedury III.3.14.

Tabela III.14. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych dla układów bezkomórkowych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
TFK	0,5 mM*	0,02/0,05/0,1/0,2/0,5 mM
C-2028/C-2045/C-2053	0,5 mM*	0,005/0,01 mM
UDPGA	20 mM **	5 mM
UGT1A1/UGT2B7	20 mg/ml	0,5 mg/ml
Bufor HEPES/UGT	100 mM	-

*0,5 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

Tabela III.15. Zestawienie składu mieszanin reakcyjnych dla układów bezkomórkowych

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
TFK	0,5 mM*	0,02/0,05/0,1/0,2/0,5 mM
C-2028/C-2045/C-2053	0,5 mM*	0/0,005/0,02 mM
UDPGA	20 mM**	1/2,5/5 mM
homogenat HepG2	18 mg/ml	0,5 mg/ml
Bufor HEPES/UGT	100 mM	-

*0,5 mM roztwór związku otrzymano przez rozcieńczenie buforem HEPES 10 mM roztworu tego związków w DMSO, ** 10 mM roztwór NADPH otrzymano przez rozpuszczenie w wodzie redestylowanej.

III.3.7.4. Opracowanie wyników otrzymanych podczas doświadczeń III.3.7.1-3.

Z uwagi na brak syntetycznego 6-β-hydroksyttestosteronu i glukuronidu TFK ilość powstającego produktu obliczono na podstawie sygnału pochodzącego od substratu. Szybkość reakcji enzymatycznej obliczono korzystając ze wzorów W1 i W2, po uprzednim sporządzeniu krzywej wzorcowej zależności powierzchni pod pikiem od stężenia substratu. Przyjęto, że liczba moli powstającego produktu jest równa ubytkowi moli substratu w mieszaninie reakcyjnej

i wyznaczono ją podstawiając do wzoru W1 współczynnik kierunkowy krzywej wzorcowej (a) wynoszący dla 6-β-hydroksyttestosteronu 0,3096 i glukuronidu TFK 0,1107.

$$n = \frac{P_0 - P_t}{a} \quad [\text{pmol}] \quad (\text{W1})$$

$$v = \frac{n}{c \cdot V \cdot t} \quad [\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}] \quad (\text{W2})$$

gdzie,

a – współczynnik kierunkowy krzywej wzorcowej zależności powierzchni pod pikiem od stężenia substratu

c – stężenia białka enzymatycznego [mg/ml]

n – liczba moli produktu [pmol]

P₀ – powierzchnia pod pikiem pochodzącym od substratu po zerowym czasie inkubacji

P_t – powierzchnia pod pikiem pochodzącym od substratu po określonym czasie inkubacji

V – objętość mieszaniny reakcyjnej (0,05 ml)

v – szybkość reakcji enzymatycznej [pmol/min/mg]

III.3.8. Warunki prowadzenia hodowli komórkowej

Hodowlę komórkową prowadzono w inkubatorze zapewniającym kontrolowane warunki środowiska tj. temperaturę 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Wszystkie linie komórkowe stosowane w niniejszej pracy: HCT116, HCT116-1A10, HepG2 i HT-29 rosły w postaci monowarstwy. Do każdej pożywki, odpowiedniej dla danej linii (Tabela.III.16.) dodano mieszaninę antybiotyków penicyliny G i streptomycyny (III.1.6 Odczynniki stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej) oraz surowicę bydlęcą (FBS) inaktywowaną termicznie (56 °C przez 30 min) w stężeniu 10%.

Tabela III.16. Zestawienie stosowanych linii komórkowych, przybliżonych ich czasów podziału oraz rodzajów pożywek hodowlanych

Linia komórkowa	Czas podziału	Rodzaj pożywki
HCT116	16 godz.	McCoy's 5A Modified Medium
HCT116-1A10	16 godz.	
HT-29	20 godz.	
HepG2	48 godz.	MEM

III.3.8.1. Wysiewanie komórek

W pierwszej kolejności odsączono pożywkę z nad monowarstwy komórek, po czym komórki odklejono od powierzchni naczynia hodowlanego za pomocą 0,25% roztworu trypsyny-EDTA stosując 5 lub 10 minutową inkubację w temperaturze 37°C. Następnie dodano do komórek świeżej pożywki, ogrzanej wcześniej do 37 °C, po czym komórki rozpipetowano. 0,5 ml

otrzymanej zawiesiny przeniesiono do 9,5 ml izotonu a następnie obliczono gęstość komórek za pomocą licznika komórek. Komórki w odpowiedniej ilości przenoszono na 60 mm płytki Petriego lub do świeżych naczyń hodowlanych i uzupełniano pożywką do 3 ml (płytki Petriego) lub 20 ml (naczynia hodowlane).

III.3.9. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT

Do oznaczenia aktywności cytotoksycznej każdej z badanych bisakrydyn wobec komórek ludzkiego nowotworu jelita HT-29 zastosowano metodę z użyciem barwnika bromku 3-[4,5-dimetylo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazolu, MTT. W metodzie tej przyjmuje się, iż tylko w komórkach żywych, w wyniku działania mitochondrialnej dehydrogenazy dochodzi do redukcji żółtego, rozpuszczalnego barwnika MTT do purpurowego produktu (formazanu). Ilość żywych komórek jest proporcjonalna do ilości wytworzonych kryształów formazanu. Absorbancję roztworów oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm.

W płytkach 96-dołkowych zostały umieszczone komórki nowotworowe będące w logarytmicznej fazie wzrostu w ilości 600 tys./200 μ l pożywki na dołek. Po 24 godzinnej inkubacji w 37°C i 5% CO₂, do komórek kontrolnych dodano po 2 μ l rozpuszczalnika (50% alkohol etylowy), a do pozostałych po 2 μ l związku C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 w dziesięciu różnych stężeniach, począwszy od najniższego. Każdy roztwór związku został dodany do czterech różnych studzienek. Końcowe stężenia badanego związku były następujące: 0,0001; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μ M. Roztwory wyjściowe były stukrotnie stężone w stosunku do załączonych stężeń, ponieważ dodawane były w objętości 2 μ l/ 200 μ l pożywki |w dołku. W celu ujawnienia cytotoksycznego działania badanego związku w komórkach inkubowano płytkę przez 72 godziny (37 °C, 5% CO₂). Po tym czasie, do każdej ze studzienek dodano po 20 μ l roztworu barwnika MTT o stężeniu 4 mg/ml i ponownie inkubowano płytkę przez 3 godziny w tych samych warunkach. Następnie delikatnie odessano pod próżnią płyn znad kryształów formazanu i dodano do każdej studzienki po 200 μ l DMSO w celu rozpuszczenia formazanu. Po dokładnym wymieszaniu zawartości studzienek mierzono absorbancję roztworów przy długości fali 540 nm. Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji uzyskano zależność ilości żywych komórek od stężenia związku, co pozwoliło wyznaczyć wartość EC₅₀, czyli stężenie związku przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych odpowiednio w 50%.

III.3.10. Homogenizacja komórek HepG2

Komórki HepG2 w będące w logarytmicznej fazie wzrostu odklejono od podłoża naczynia hodowlanego przy pomocy 0,25% roztworu trypsyny-EDTA w PBS stosując ok. 5 min inkubację w 37°C. Otrzymaną zawiesinę komórek poddano wirowaniu (5 min, 1000 rpm, 4°C), po czym uzyskany osad przemyto dwukrotnie zimnym roztworem PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Następnie supernatant usunięto, a komórki zawieszono w 200 μ l PBS i przeniesiono do homogenizatora ręcznego wcześniej umieszczonego w lodzie. Komórki ucierano przez 5 min. Poszczególne partie homogenatów połączono i zmierzono stężenia białka

stosując procedurę *DC Protein Assay* (III.3.11. *Oznaczenie stężenia białka - DC Protein Assay (BIO-RAD)*). Otrzymane homogenaty rozporcjowano i przechowywano w zamrażarce w -80 °C.

III.3.11. *Oznaczenie stężenia białka - DC Protein Assay (BIO-RAD)*

W celu zbadania stężenia białka do studzienek płytki 96-dołkowej dodano po 3 µl przygotowanych standardów BSA (krzywa kalibracyjna) lub badanej próbki. Następnie do każdej studzienki dodano po 25 µl odczynnika A i 200 µl odczynnika B. Należy nadmienić, iż w procedurze tej kolejność dodawanych składników jest niezwykle istotna. Zawartość studzienek delikatnie wymieszano i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej (według producenta tak przygotowane próbki zachowują stabilność do 1 godz.). Po tym czasie zmierzono absorbancję przy 750 nm. Stężenie białka obliczono ze wzoru W3 uzyskanego na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej BSA.

$$c = \frac{A}{a} [\text{mg/ml}] \quad (\text{W3})$$

gdzie,

A – średnia wartość absorbancji roztworu białka mierzona metodą DC Protein Assay przy 750 nm

a = współczynnik krzywej kalibracyjnej BSA wynoszący 0,067 dla $c < 1$ mg/ml lub 0,0455 dla $c > 1$ mg/ml

III.3.12. *Metabolizm bisakrydyn w komórkach ludzkich nowotworów jelita*

Izolację metabolitów przeprowadzono z komórek trzech linii: HCT116, HCT116-1A10 i HT-29. Z konfluentnej hodowli komórek wysiano w ilości 3×10^6 komórek na płytki Petriego (60x15 mm), a następnie uzupełniono pożywką (z 10% dodatkiem FBS, inaktywowanej termicznie) do 3 ml. Po 24 godzinnej preinkubacji, mającej na celu przyklejenie komórek do podłoża pojemnika hodowlanego, przygotowano 10 mM roztwory każdej bisakrydyny w 50% alkoholu etylowym i w odpowiedniej ilości dodawano do komórek (Tabela III.17.).

Tabela III.17. Ilość dodawanej bisakrydyny do komórek ludzkich nowotworów jelita

Stężenie wyjściowe związku	Stężenie związku w komórkach	Ilość 10 mM roztworu związku dodana do komórek
5 mM	5 µM	3 µl
10 mM	25 µM	7,5 µl
	50 µM	15 µl

Następnie komórki inkubowano ze związkiem przez określony czas. Kontrolę stanowiły komórki nie traktowane związkiem dla czasu inkubacji: 24 godz. Po określonym czasie pobrano po 1,5 ml pożywki znad warstwy komórek, po czym 0,2 ml pożywki dodano do takiej samej objętości acetonitrylu. Tak przygotowaną próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 min, zwirowano dwukrotnie (6 min, 13400 rpm), a następnie poddano analizie RP-HPLC

(pożywka pohodowlana). Komórki na płytce zdrapano skrobaczką (z ang. cell scraper) i przeniesiono do probówek typu falkon o objętości 15 ml. Pozostałość na płytce przemyto 1 ml PBSx1 i połączono z zawartością probówki. Całość zwirowano (5 min., 1000 rpm, 4°C), odrzucono supernatant, a osad przemyto 5 ml PBSx1 i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Po odrzuceniu supernatantu, osad zawieszono w 50 µl chloroformu, po czym sonifikowano w łaźni ultradźwiękowej przez 15 min., a następnie inkubowano w lodzie przez 1 godz. Po tym czasie całość zwirowano (20 min., 13000 rpm, 4°C), osad odrzucono, odparowano chloroform i dodano 50 µl 60% alkoholu metylowego, a otrzymany supernatant poddano analizie metodą RP-HPLC (ekstrakt komórkowy).

III.3.13. Wpływ bisakrydyn na aktywność enzymów UGT w komórkach linii HT-29

Komórki linii HT-29 przeniesiono na 60 mm płytki Petriego w ilości 3×10^6 komórek w sposób opisywany wcześniej (III.3.8.1. *Wysiewanie komórek*). Następnie po 24-godzinnej inkubacji do każdej z płytek dodano po 30 µl świeżo przygotowanych roztworów bisakrydyny (0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 µM) otrzymanych na drodze seryjnego rozcieńczenia 50% alkoholem etylowym 5 mM roztworów w tym samym rozpuszczalniku. Do komórek kontrolnych dodano 30 µl 50% etanolu. Następnie płytki umieszczono w 37°C na kolejne 24 godziny w celu inkubacji komórek ze związkiem. Po tym czasie przygotowano 20 mM roztwór standardowego substratu TFK w DMSO, który następnie rozcieńczono 50 % alkoholem etylowym do uzyskania roztworu 2 mM. Pożywkę z nad warstwy komórek wymieniono na świeżą i do każdej z płytek dodano po 30 µl rozcieńczonego roztworu TFK w celu uzyskania 20 µM stężenia w pożywce. Następnie płytki inkubowano przez 1 godz. w 37°C w celu przeprowadzenia glukuronidacji TFK wobec komórek HT-29 traktowanych bądź nie traktowanych bisakrydyną.

Otrzymane pożywki pohodowlane przygotowano do analizy RP-HPLC w taki sam sposób jak w III.3.12. Nastrzyk na kolumnę wynosił 50 µl. Komórki po inkubacji z standardowym substratem zdrapano skrobaczką i zawieszono w roztworze PBSx1, a następnie poddano wirowaniu (5 min, 1000 rpm, 4°C). Usunięto supernatant i do osadu dodano 3 ml roztworu PBSx1, po czym ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Ponownie supernatant odsączono i czynność powtórzono. Następnie otrzymany osad zawieszono w 70 µl buforu lizującego RIPA, do którego uprzednio dodano PMSF o końcowym stężeniu 1 mM. Tak sporządzone próbki inkubowano przez 20 min w lodzie, mieszając je co 5 min na wytrząsarce typu vorteks. Po zakończonej lizie komórki poddano wirowaniu (15 min, 14000 rpm, 4°C). Otrzymany supernatant przeniesiono do czystych probówek typu Eppendorf. Absorbancję białka zawartego w lizatach komórkowych zmierzono metodą opisaną już wcześniej (III.3.11. *Oznaczanie stężenia białka - DC Protein Assay (BIO-RAD)*).

Aktywność enzymów UGT wyrażono jako udział procentowy powierzchni pod pikiem glukuronidu TFK względem sumy powierzchni pod pikami pochodzącymi od substratu i glukuronidu. Aktywność przeliczono na liczbę żywych komórek, przyjmując, że miarą liczebności żywych komórek jest stężenie białka zawartego w lizacie komórkowym, a stężenie to jest proporcjonalne do absorbancji (W4). W obliczeniach uwzględniono również ewentualne różnice



w objętości otrzymanych lizatów komórkowych. Wydajność reakcji przy różnych stężeniach bisakrydyny wyrażono jako procent wydajności kontrolnej (przy braku inhibitora).

$$X = \frac{A_K \cdot P_p}{A_X \cdot (P_s + P_p)} \cdot 100\% \quad [\%] \quad (W4)$$

gdzie,

A_K – wartość absorbancji białka w próbce komórek kontrolnych

A_X – wartość absorbancji białka w próbce komórek po ekspozycji na bisakrydynę

P_p – pole powierzchni pod pikiem pochodzącym od produktu

P_s – pole powierzchni pod pikiem pochodzącym od substratu

X – aktywność enzymu po ekspozycji komórek na bisakrydynę

III.3.14. Analiza RP-HPLC

Analizę składu każdej z mieszanin reakcyjnych dokonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (ang. reversed phase high-performance liquid chromatography - RP-HPLC). Stosowano następujące fazy ruchome:

- **A:** bufor mrowczanowy - mrowczan amonu o stężeniu 0,05 M, pH~3,4, z 5% dodatkiem metanolu o czystości HPLC,
- **B:** metanol o czystości HPLC z 5% dodatkiem H₂O,
- **C:** woda redestylowana z 15% dodatkiem acetonitrylu o czystości HPLC,
- **D:** acetonitryl o czystości HPLC.

Jako optymalny schemat zmiany składu fazy ruchomej wybrano ten przedstawiony w Tabeli III.18

Tabela III.18 Zmiany składu fazy ruchomej zastosowane w analizach RP-HPLC

Czas [min]	Przepływ [ml/min]	Skład fazy ruchomej [%]	
		A	B
-	1	85	15
25	1	20	80
28	1	0	100
29	1	0	100
30	1	85	15
40	1	85	15

Fazy ruchome C i D były stosowane do przepłukiwania aparatu chromatograficznego pomiędzy analizami. Do sporządzenia wszystkich roztworów buforowych i faz ruchomych stosowano wodę redestylowaną ($R > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). Na kolumnę dozowano 50 μl mieszaniny

reakcyjnej. Wszystkie zaprezentowane w niniejszej pracy eksperymenty jak i analizy RP-HPLC zostały wykonane przynajmniej dwukrotnie.

III.3.15. Analiza LC-MS

III.3.15.1. Analiza HPLC-ESI-MS

Analizy HPLC-ESI-MS wykonano za pomocą aparatu chromatograficznego LC-2040C sprzężonego ze spektrometrem mas LCMS-2020 (Shimadzu) lub 1290 Infinity II LC połączonego ze spektrometrem mas 6470B z potrójnym kwadrupolem (Agilent) w trybie scan w zakresie m/z 200 -1200 lub 200 - 1000 przy przepływie 0,5 ml/min lub 1 ml/min. Pozwoliło to na otrzymanie widm MS oraz wartości jonów masowych dla każdego pików chromatograficznego.

III.3.15.2. Analiza HPLC-ESI-MS/MS

Analizę LC-MS/MS wykonano za pomocą chromatografu 1290 Infinity II LC połączonego ze spektrometrem mas 6470B z potrójnym kwadrupolem w trybie scan-product ions dla każdego pików prekursorowego przy przepływie 1 ml/min. Otrzymane fragmenty pozwoliły na ujawnienie aspektów struktury chemicznej jonów prekursorowych, czyli metabolitów badanych bisakrydyn.

III.3.16. Analiza statystyczna

Wszystkie zaprezentowane w niniejszej pracy doświadczenia zostały wykonane przynajmniej dwukrotnie. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średniej i odchylenia standardowego (SD). Do oceny statystycznej wyników oraz dopasowania modeli posłużył program GraphPad Prism 5.0. Dla oceny różnic między dwiema niezależnymi grupami zastosowano test t-Studenta. Dla porównania średnich w wielu populacjach wykonano test jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA). Porównania wielokrotne pomiędzy analizowanymi grupami przeprowadzono testem Bonferroniego. Przyjęto, że różnice statystyczne przy wartościach: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ są istotne.

IV. WYNIKI

Przedmiotem niniejszej pracy, jak przedstawiono to w celu pracy (s. 17) jest określenie zdolności do przemian metabolicznych po wprowadzeniu do organizmu wybranych do badań nowych pochodnych bisakrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Jako nowe związki wymagały one na początku analizy podstawowych właściwości fizykochemicznych takich jak rozpuszczalność i stabilność oraz optymalizacji warunków kontroli przemian metabolicznych poprzez analizę HPLC. Związki wybrane do badań stanowią grupę pochodnych bisakrydyny zawierających w swojej strukturze dwa pierścienie: imidzoakrydonu i 1-nitroakrydyny połączone łańcuchem aminoalkilowym.

IV.1. Rozpuszczalność badanych bisakrydyn

Pierwszym etapem analizy właściwości fizykochemicznych było określenie rozpuszczalności badanych pochodnych bisakrydyny (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) w wybranych rozpuszczalnikach, tj. wodzie redestylowanej, 50% etanolu, DMSO i buforach zastosowanych w niniejszej pracy: (i) do analizy HPLC, 0,05 M bufor mrówczanowy z 5% dodatkiem metanolu o pH 3,4 oraz (ii) jako medium reakcji enzymatycznych. Roztwory zastosowane dla prowadzenia reakcji enzymatycznych to: (a) 0,1 M bufor fosforanowo-potasowy o pH 7,4; (b) 50mM bufor TRIS-zasada o pH 7,4 oraz (c) 0,1 M bufor HEPES o pH 7,4. Sporządzono 10 mM roztwory badanych związków w H₂O, 50 % etanolu, DMSO i w/w buforze mrówczanowym - jednym z eluentów stosowanych do analizy chromatograficznej (Tab.IV.1a). Następnie roztwory wodne i w DMSO rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:10 i 1:100 (Tab.IV.1b.).

Tabela IV.1a Rozpuszczalność badanych związków – C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w wodzie redestylowanej, 50% etanolu, DMSO i 0,05 M buforze mrówczanowym o pH 3,4; Stężenie – 10mM. Znak + oznacza całkowitą rozpuszczalność.

	H ₂ O	EtOH 50%	DMSO	0,05 M bufor mrówczanowy pH 3.4 (i)
C-2028	+	+	+	+
C-2041	+	+	+	+
C-2045	+	+	+	+
C-2053	+	+	+	+

Tabela IV.1b Rozpuszczalność badanych związków – C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w wybranych buforach (ii), stężenia – 1mM i 0,1 mM. Znak + oznacza całkowitą rozpuszczalność.

H ₂ O	0,1 M fosf-potas pH 7.4 (a)		50 mM Tris-zasada, pH 7.4 (b)		HEPES 0,1 M pH 7.4 (c)		
	10 mM	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
C-2028		OSAD	OSAD	OSAD	+	OSAD	+
C-2041		OSAD	OSAD	OSAD	OSAD	OSAD	+
C-2045		OSAD	OSAD	OSAD	OSAD	+	+
C-2053		OSAD	OSAD	OSAD	OSAD	OSAD	+

DMSO	0,1 M fosf-potas pH 7.4 (a)		50 mM Tris-zasada, pH 7.4 (b)		HEPES 0,1 M pH 7.4 (c)	
10 mM	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
C-2028	OSAD	OSAD	OSAD	+	+	+
C-2041	OSAD	OSAD	OSAD	+	+	+
C-2045	OSAD	+	OSAD	+	+	+
C-2053	OSAD	OSAD	OSAD	+	+	+

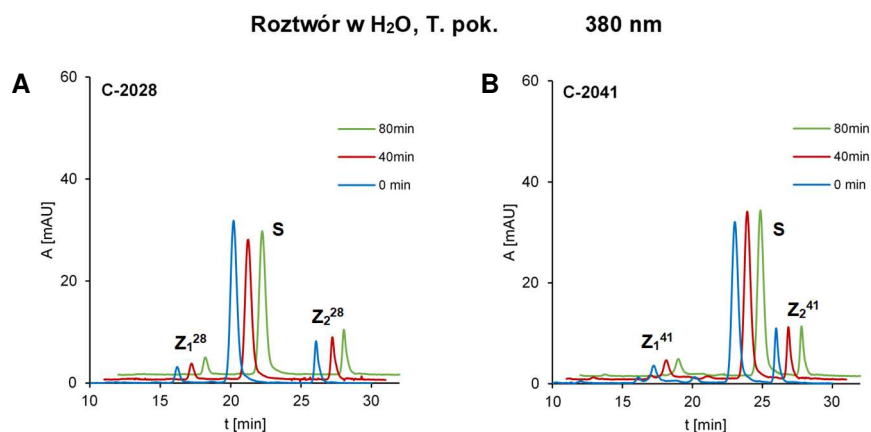
Analizując otrzymane wyniki, można stwierdzić, iż związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 nie wypadają w formie osadu czyli dobrze rozpuszczają się w wodzie redestylowanej, 50% etanolu i DMSO w stężeniach do 10 mM. Czyli rozpuszczalniki te mogą być stosowane jako medium do sporządzania wyjściowych roztworów związków. Ponadto są rozpuszczalne w buforze mrówczanowym stosowanym jako główny, obok metanolu eluent w analizie chromatograficznej. Zatem związki te nie będą osadzać się na stosowanej kolumnie. Najlepsze wyniki rozpuszczalności badanych bisakrydyn w buforach stosowanych jako środowisko reakcji enzymatycznych otrzymano w wyniku rozpuszczenia ich w małej ilości DMSO, a następnie rozcieńczenia buforem HEPES do stężenia 1 mM i 0,1 mM. Zatem w eksperymentach niniejszej pracy wymagających przeprowadzenia reakcji enzymatycznej, jako środowisko reakcji wybrano 0,1 M bufor HEPES o pH 7,4.

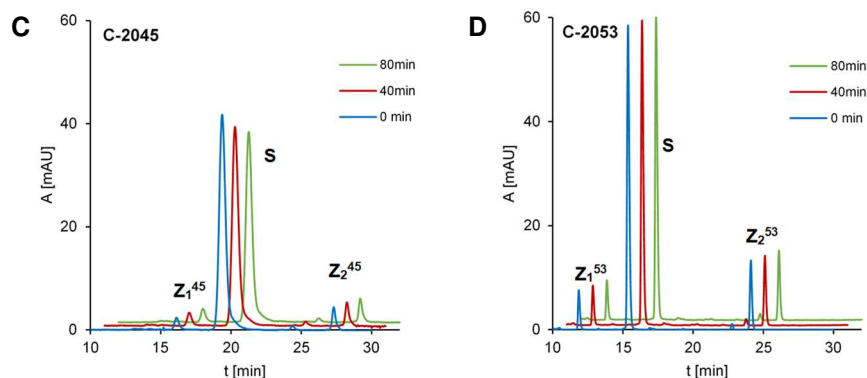
IV.2. Trwałość i czystość badanych pochodnych bisakrydyny

IV.2.1. Trwałość i czystość pochodnych bisakrydy w roztworach wodnych

IV.2.1.1 Chlorowodorki bisakrydyn

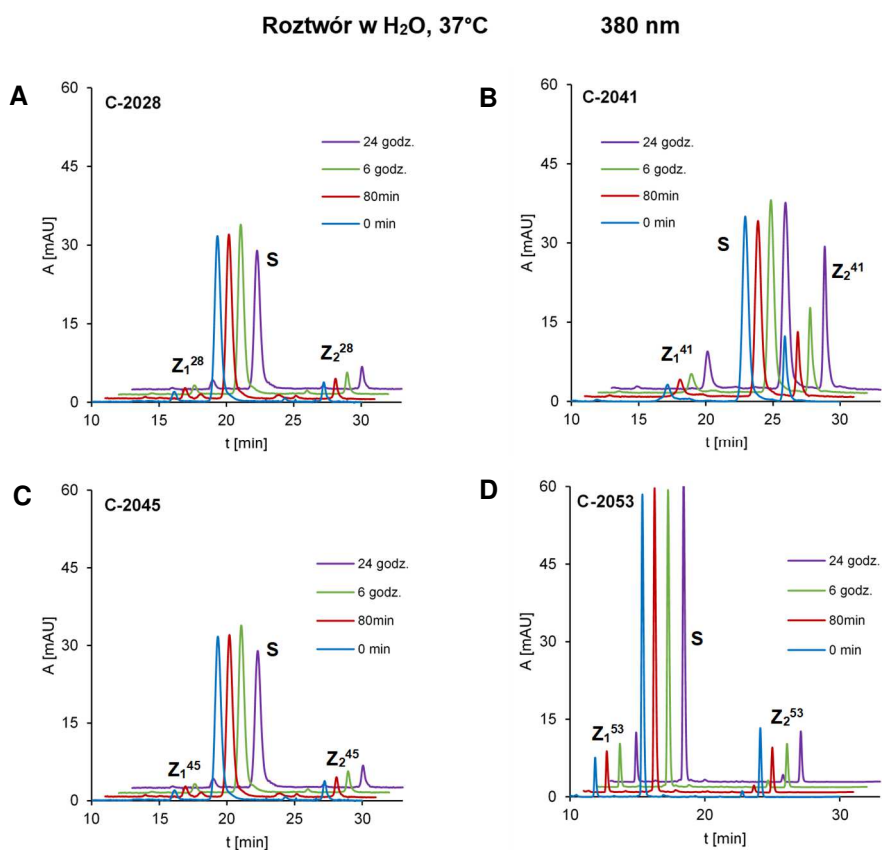
Trwałość i czystość badanych bisakrydyn w postaci chlorowodorków (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) sprawdzono w pierwszej kolejności w roztworach wodnych. W tym celu sporządzono 0,05 mM roztwory badanych związków w wodzie redestylowanej, a następnie inkubowano je przez 0, 40 i 80 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie skład próbek analizowano metodą RP-HPLC przy długości fali 380 nm. Otrzymane chromatogramy liniowe zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.1.). Obecność dodatkowych pików, zaznaczono na chromatogramach jako Z₁ i Z₂.





Rys. IV.1. Obrazy chromatograficzne 0,05 mM wodnych roztworów A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045, D – C-2053 inkubowanych w temperaturze pokojowej przez 0, 40 i 80 min. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (A,B,C – Milenium, D - Waters) przy 380 nm.

Następnym krokiem było sprawdzenie trwałości 0,05 mM wodnych roztworów badanych bisakrydyn inkubowanych w 37°C przez dłuższy czas tj. 80 min, 6 godz. i 1 dzień. Wyniki analizy chromatograficznej zestawiono i przedstawiono poniżej (Rys.IV.2a.).

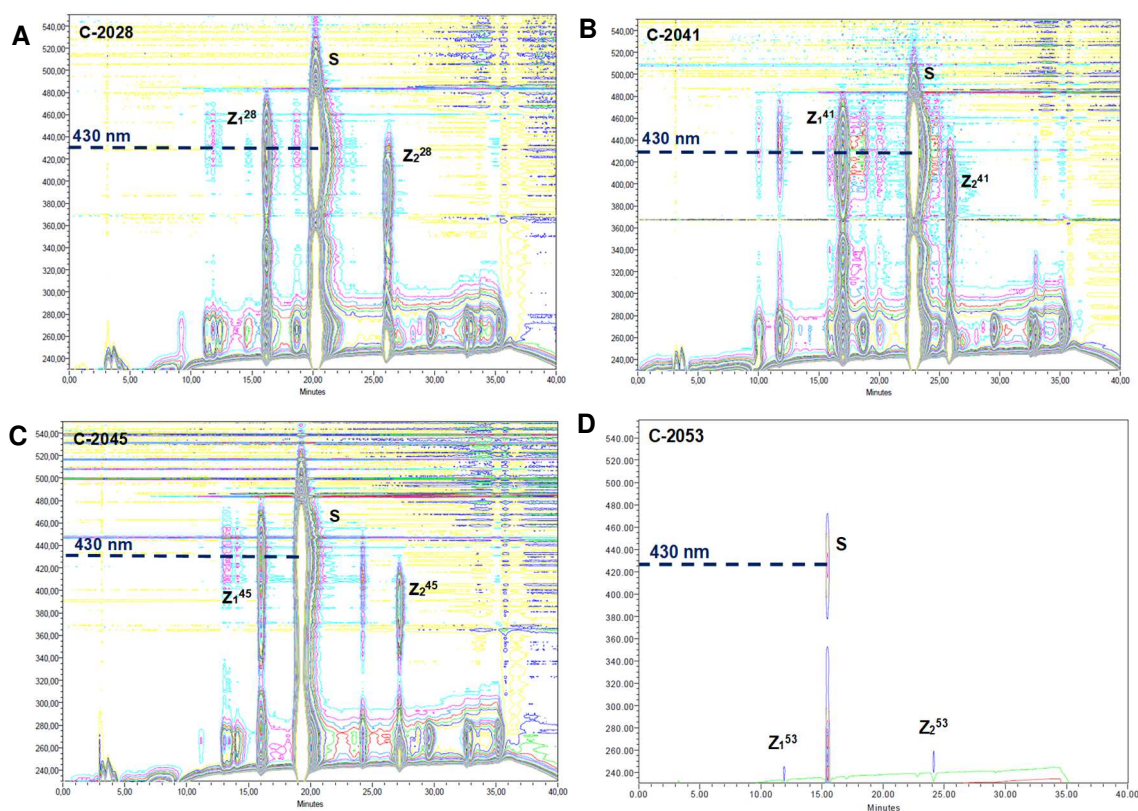


Rys. IV.2a. Obrazy chromatograficzne wodnych roztworów A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 i D – C-2053 inkubowanych w temperaturze 37°C przez 0, 80 min, 6 i 24 godz. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (A,B, C – Milenium, D - Waters) przy 380 nm.

Analizując powyższe chromatogramy liniowe (Rys. IV.1. i Rys. IV.2.) można stwierdzić, iż wraz z wydłużeniem czasu inkubacji do 6 godzin nie obserwuje się znaczących zmian w intensywności pików pochodzących od badanych związków w postaci chlorowodorków

(C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053). Tylko w przypadku C-2028 i C-2045 po 24 godzinach intensywność pików nieznacznie spada. Na stabilność nie miał również istotnego wpływu wzrost temperatury inkubacji. Zatem można uznać, że związki te wykazują stabilność w roztworze wodnym w temperaturze pokojowej przez kilka godzin. Jednakże zarówno dla C-2028, C-2041, jak i C-2045 oraz C-2053 już przy czasie 0 min obserwuje się obecność dodatkowych pików, zaznaczonych na chromatogramach jako Z₁ i Z₂. Obecność ich świadczy o zanieczyszczeniu badanych związków. Prawdopodobnie są to produkty rozpadu, a właściwie hydrolizy badanych bisakrydyn.

Podczas analiz chromatograficznych zebrano również chromatogramy poziomicowe (Rys.IV.2b.), na podstawie których zdecydowano, aby w kolejnych etapach analizy stosować inną długość fali tj. 430 nm odpowiadającą maksimum absorpcji wszystkich badanych bisakrydyn. Dzięki temu w kolejnych etapach niniejszej pracy dostrzeżenie potencjalnych metabolitów było zdecydowanie prostsze.

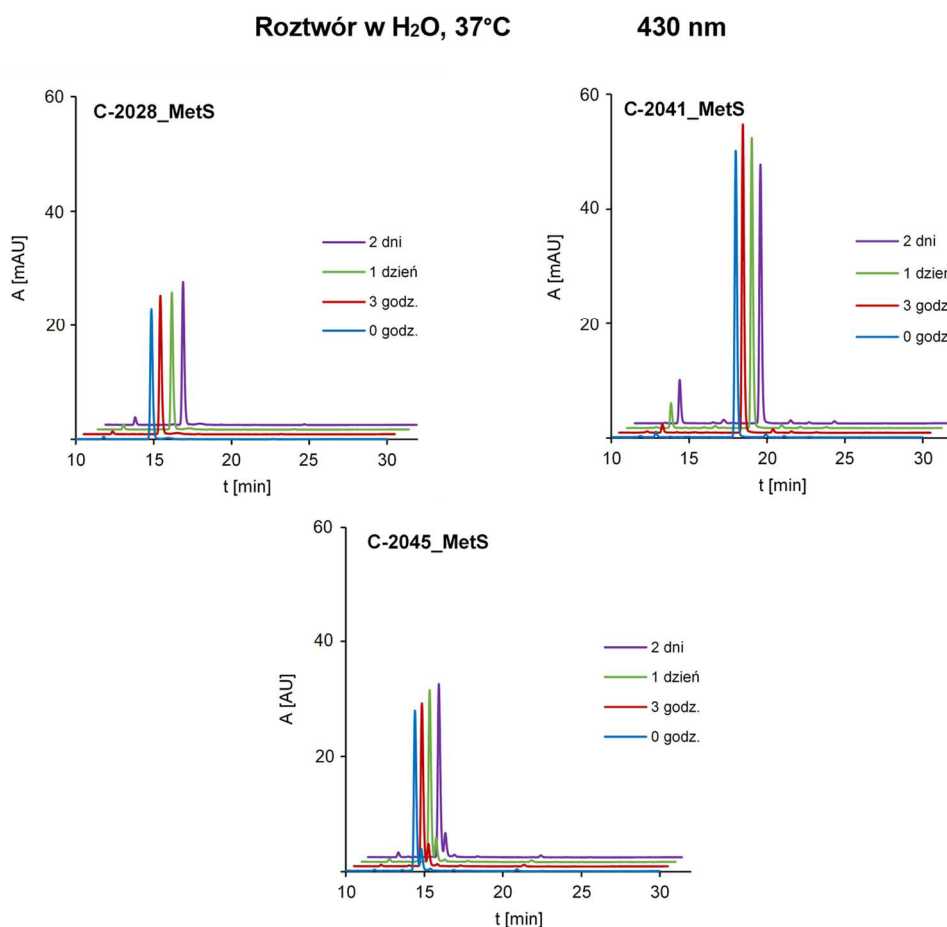


Rys. IV.2b. Chromatogramy poziomicowe dla wodnych roztworów bisakrydyn inkubowanych w temperaturze 37°C przez 24 godz. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (A,B, C – Milenium, D - Waters).

IV.2.1.2 Metanosulfoniary bisakrydyn

Trzy spośród badanych bisakrydyn tj. C-2028, C-2041 i C-2045 otrzymano również w postaci trwałych metanosulfonianów. Sole te wykazały lepszą rozpuszczalność w wodzie w porównaniu z chlorowodorkami tych związków. Trwałość metanosulfonianów bisakrydyn również została zbadana. W tym celu sporządzono 0,05 mM roztwory

metanosulfonianu C-2028, C-2041 oraz C-2045 i inkubowano w 37°C przez dłuższy czas tj. 3 godz., 24 godz. i 2 dni. Wyniki analizy chromatograficznej przy długości fali 430 nm zestawiono i przedstawiono poniżej (Rys.IV.3.).



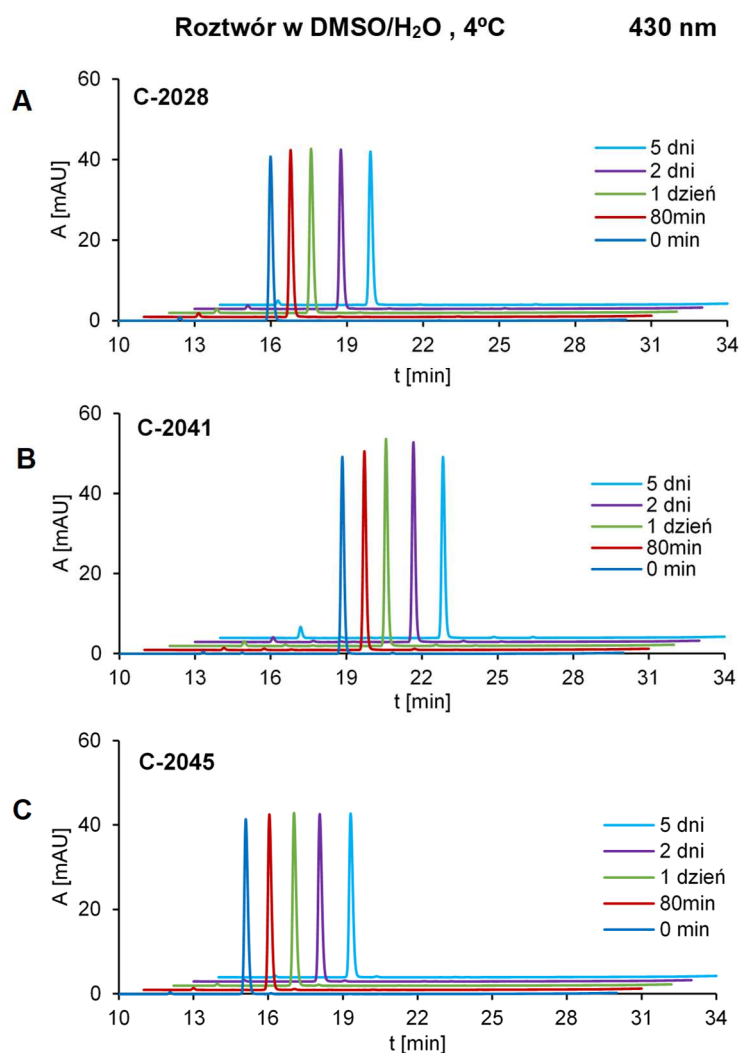
Rys. IV.3. Obrazy chromatograficzne 0,05 mM wodnych roztworów A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 inkubowanych w temperaturze 37°C przez 0, 3, 24 i 48 godz. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Waters) przy 430 nm.

Analizując otrzymane wyniki (Rys. IV.3) można stwierdzić, iż metanosulfoniany bisakrydyn inkubowane w 37°C zachowują trwałość w roztworach wodnych do 24 godzin. W przypadku C-2041 po 24 godzinach intensywność pików nieznacznie spada i obserwuje się przyrost produktów ubocznych, świadczących o rozpadzie związku. Wydaje się zatem, że metanosulfoniany wykazują nie tylko lepszą rozpuszczalność, ale pozostają dłużej stabilne w badanych roztworach wodnych w porównaniu z ich chlorowodorkami. Dlatego do dalszych etapów badań stosowano metanosulfoniany związków C-2028, C-2041 i C-2045.

IV.2.2. Trwałość pochodnych bisakrydyny w roztworach DMSO/H₂O

Kolejny etap badań polegał na sprawdzeniu stabilności trzech badanych związków (C-2028, C-2041 i C-2045) w mieszaninie DMSO i wody redestylowanej, gdyż DMSO jest zwykle pierwszym rozpuszczalnikiem związków badanych w układach enzymatycznych i komórkowych. W tym celu przygotowano 10 mM roztwory badanych bisakrydyn w DMSO, a następnie

rozcieńczono je wodą redestylowaną do 0,05 mM. Inkubacji w 4°C poddano zarówno roztwory tylko w DMSO, jak i te po rozcieńczeniu H₂O. Analizę składu poszczególnych próbek dokonano metodą RP-HPLC, a wyniki zestawiono i przedstawiono na załączonych chromatogramach (Rys.IV.4. i Rys.IV.5.).

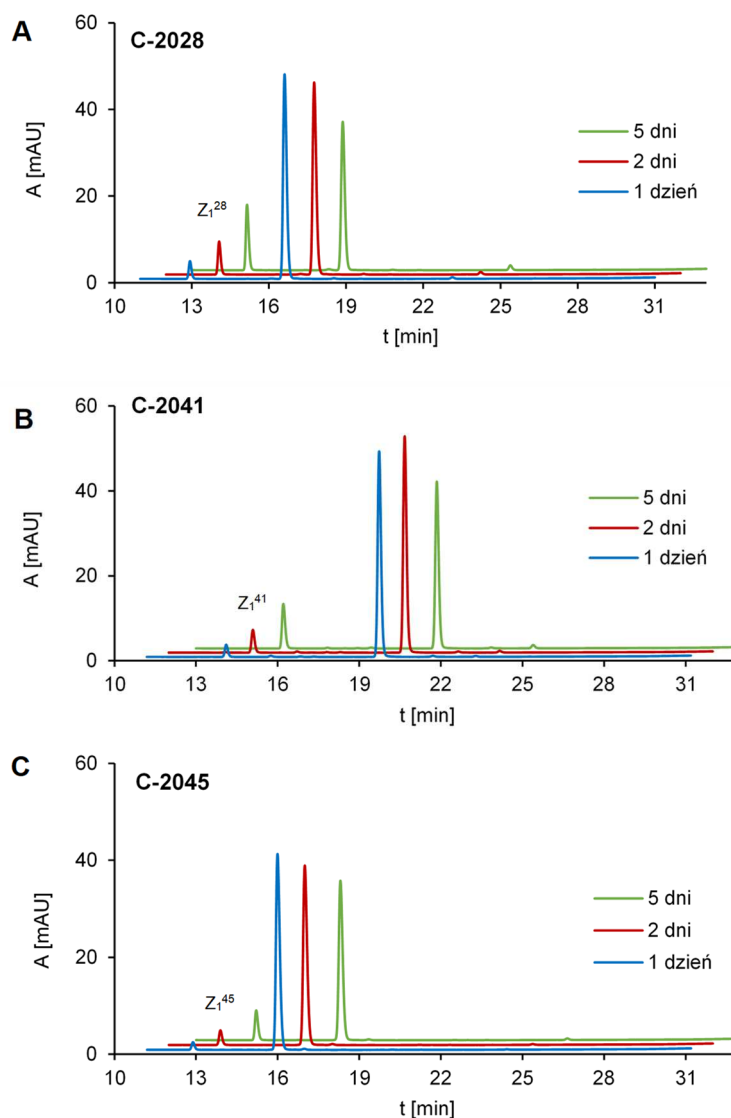


Rys. IV.4. Chromatogramy 0,05 mM roztworów związku A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 w mieszaninie DMSO i wody redestylowanej inkubowanych w 4°C przez 0, 80 min, 1, 2, 5 dni. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu) przy 430 nm.

Analizując otrzymane chromatogramy można stwierdzić, że zarówno związek C-2028, C-2041, jak i C-2045 wykazuje stabilność w mieszaninie DMSO i wody redestylowanej. Pomimo inkubacji badanych roztworów przez długi okres czasu (do 5 dni) w 4°C, nie zaobserwowano dodatkowych pików, które świadczyłyby o rozpadzie związku.

Dla porównania przeprowadzono również w takich samych warunkach (4°C) inkubację 10 mM roztworów badanych związków w czystym DMSO przez 1, 2 i 5 dni. Po tym czasie roztwory te rozcieńczono do 0,1 mM wodą redestylowaną, a następnie poddano je analizie RP-HPLC. Otrzymane wyniki zestawiono i przedstawiono poniżej (Rys.IV.5.).

Roztwór w DMSO, 4°C, rozc. H₂O 430 nm

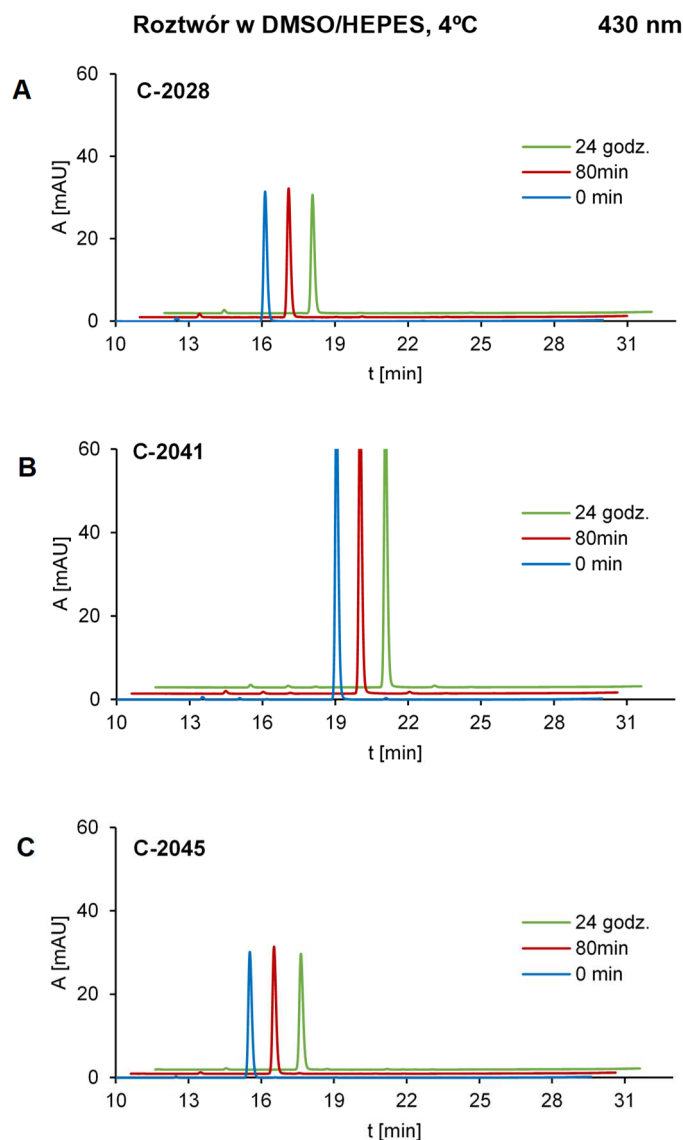


Rys. IV.5. Chromatogramy analizowanych 0,05 mM roztworów związku A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 powstałych w wyniku rozcieńczenia wodą redestylowaną 10 mM roztworów badanych bisakrydyn w DMSO, inkubowanych w 4°C przez 1, 2, 5 dni. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu) przy 430 nm.

Analiza powyższych obrazów chromatograficznych wskazała iż nie należy przechowywać roztworów badanych bisakrydyn (C-2028, C-2041 i C-2045) w DMSO, lecz za każdym razem sporządzać je na świeżo. Już po jednym dniu inkubacji roztworów tych związków w DMSO w 4°C obserwuje się zmiany w ich składzie. Analiza RP-HPLC wykazała obecność dodatkowego piku (ok. 13 min), produktu rozpadu związku (Z₁). Należy dodać, iż wraz ze wzrostem czasu inkubacji intensywność tego piku rosła wprost proporcjonalnie do spadku intensywności piku pochodzącego od związku pierwotnego. Natomiast roztwór związku sporządzony najpierw w DMSO, a potem 100-200 razy rozcieńczony wodą jest trwały.

IV.2.3. Trwałość pochodnych bisakrydyny w roztworach DMSO/HEPES

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie stabilności badanych bisakrydyn w buforze HEPES inkubowanych w 4°C. W tym celu sporządzono 0,05 mM roztwory związków C-2028, C-2041 i C-2045 poprzez rozcieńczenie buforem HEPES sporządzonych na świeżo 10 mM roztworów w DMSO. Roztwory te inkubowano przez 0, 80 min i 24 godz., a następnie przeprowadzono ich analizę za pomocą RP-HPLC. Otrzymane wyniki zestawiono i przedstawiono na poniższych chromatogramach (Rys.IV.6.).



Rys. IV.6. Chromatogramy analizowanych 0,05 mM roztworów związku A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 powstałych w wyniku rozcieńczenia buforem HEPES 10 mM roztworów badanych bisakrydyn w DMSO i inkubowanych w 4°C przez 0, 80 min i 24 godz.. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu) przy 430 nm.

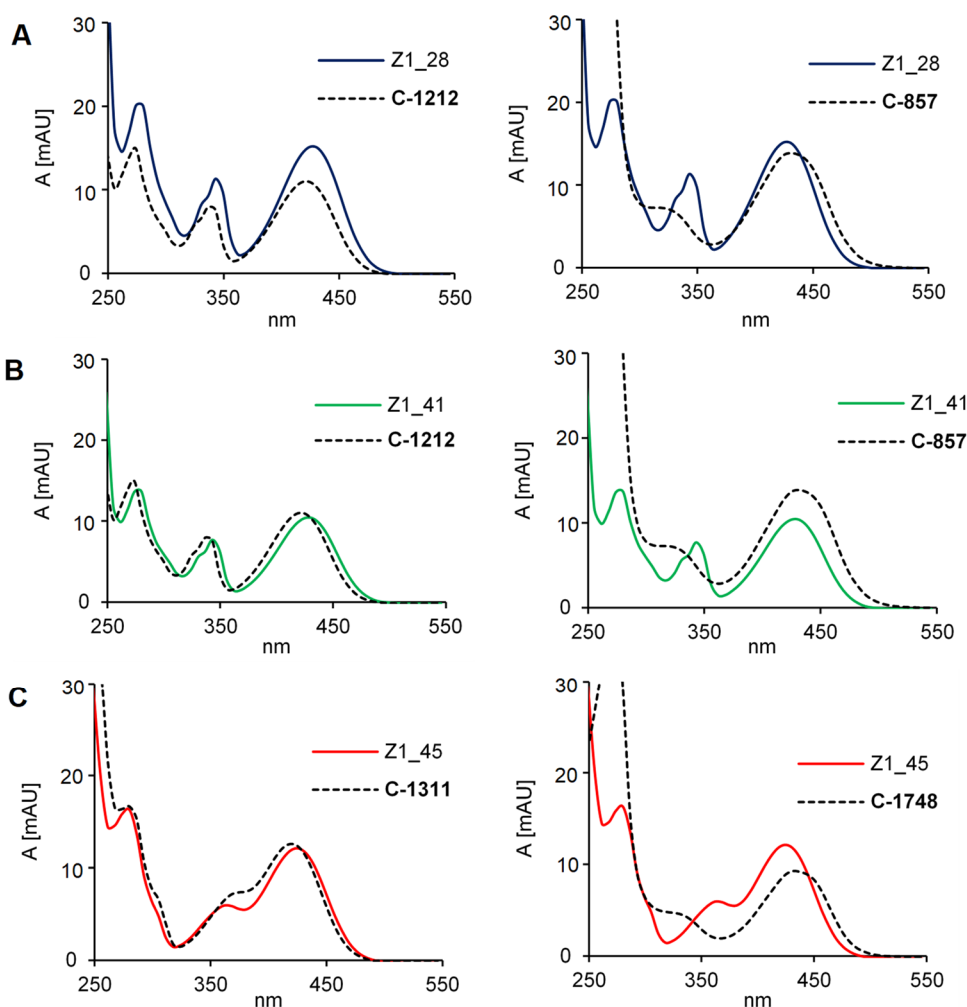
Na podstawie powyższych chromatogramów można stwierdzić, iż badane związki wykazują stabilność w badanym buforze (0,1 M HEPES, pH 7,4). Otrzymane piki pochodzące od pochodnych bisakrydyny, są wyraźne, ostre i w miarę wydłużenia czasu inkubacji ich

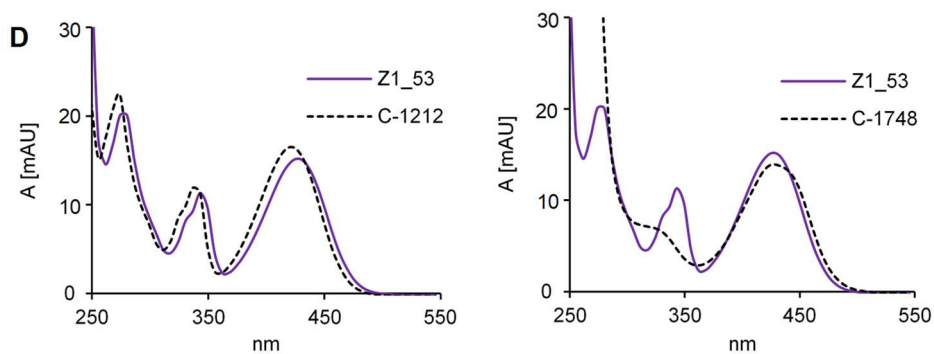
intensywność zmienia się nieznacznie. Ponadto nie obserwuje się dodatkowych pików, które świadczyć by mogły o rozpadzie któregośkolwiek z badanych związków. Należy jednak zauważyć, że w niektórych przypadkach (C-2028 i C-2045) po 24 godzinnej inkubacji roztworów w 4°C intensywność pików nieznacznie spada, zatem aby zapewnić dokładność i powtarzalność wyników, roztworów tych nie należy przechowywać, lecz za każdym razem sporządzać bezpośrednio przed przystąpieniem do badań.

IV.2.4. Identyfikacja produktów rozpadu badanych pochodnych bisakrydyn

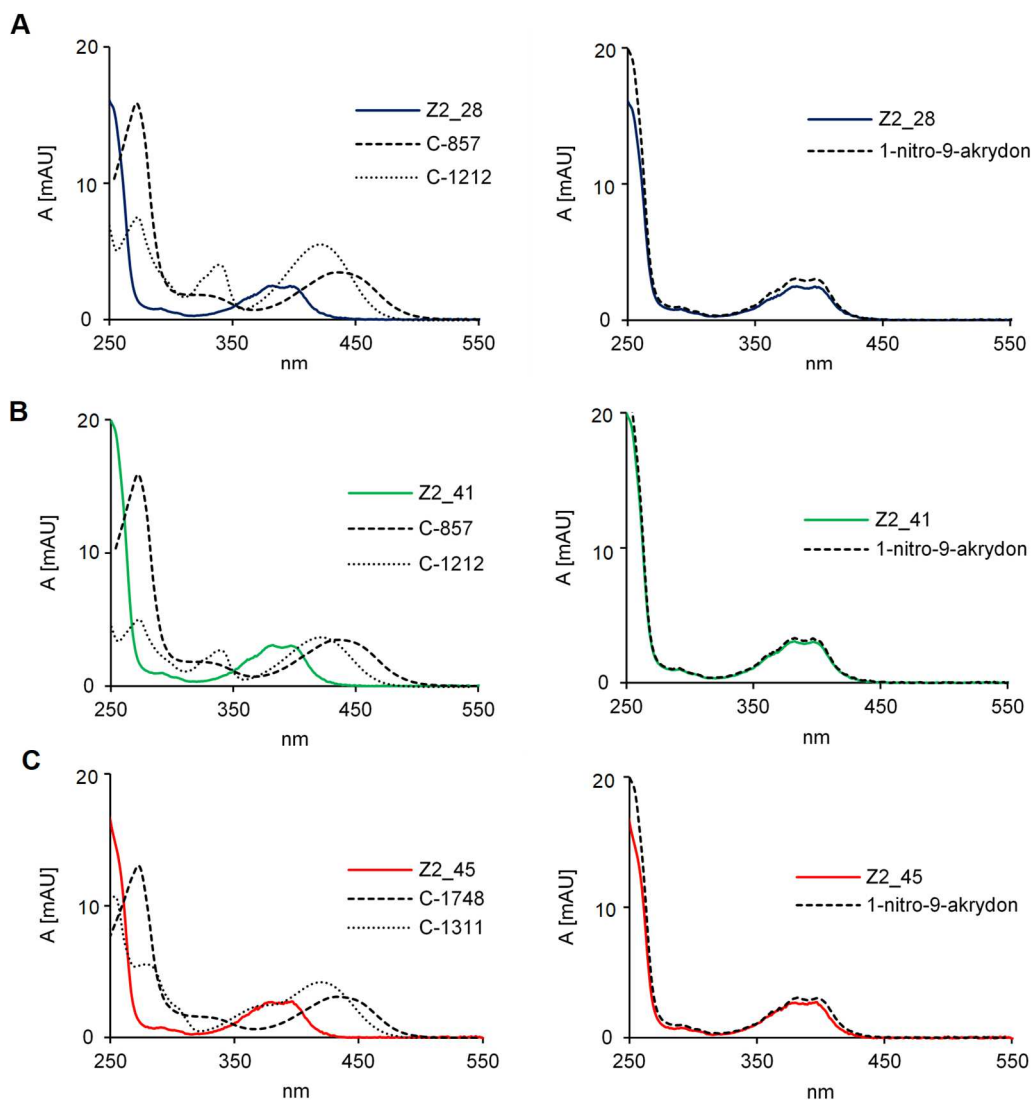
IV.2.4.1. Analiza porównawcza widm UV-vis

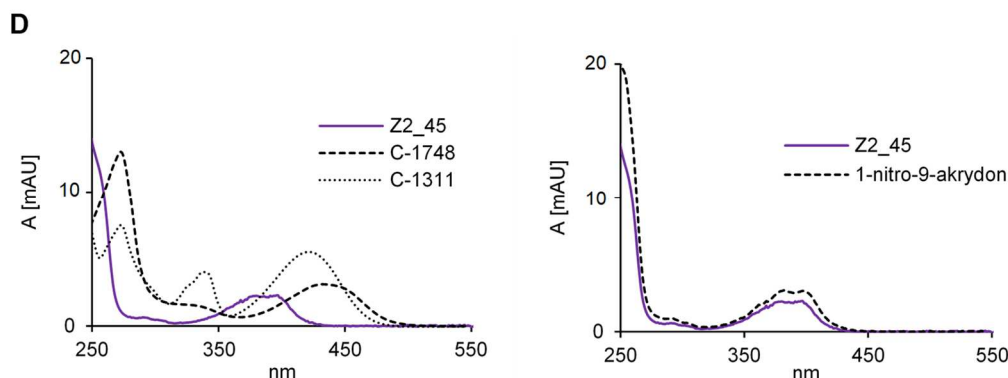
Jak wykazano wcześniej nieodpowiednie przechowywanie bisakrydyn w roztworze wodnym lub DMSO sprawia, że związki w niewielkim stopniu ulegają rozpadowi do dwóch produktów Z₁ i Z₂. Podczas przeprowadzonych analiz chromatograficznych zebrano widma UV-vis tych produktów i zestawiono je z widmami monomerów imidazo (C-1212/C-1311) i 1-nitro (C-857/C-1748), czyli tych z których bisakrydyny zostały syntetyzowane (Rys IV.7 i Rys IV.8.).





Rys. IV.7. Porównanie widm *Uv-vis* produktu Z₁ powstałego w wyniku nieenzymatycznego rozpadu bisakrydyny A - C-2028, B – C-2041, C – C-2045, D – C-2053 w wyniku inkubacji w czystym DMSO i monomerów badanych bisakrydym. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).



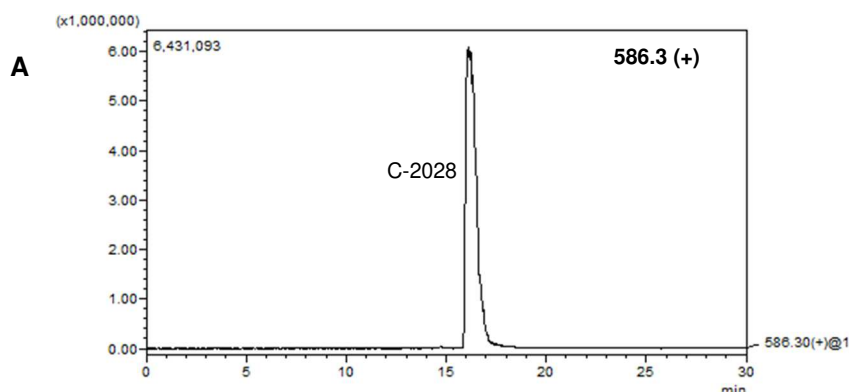


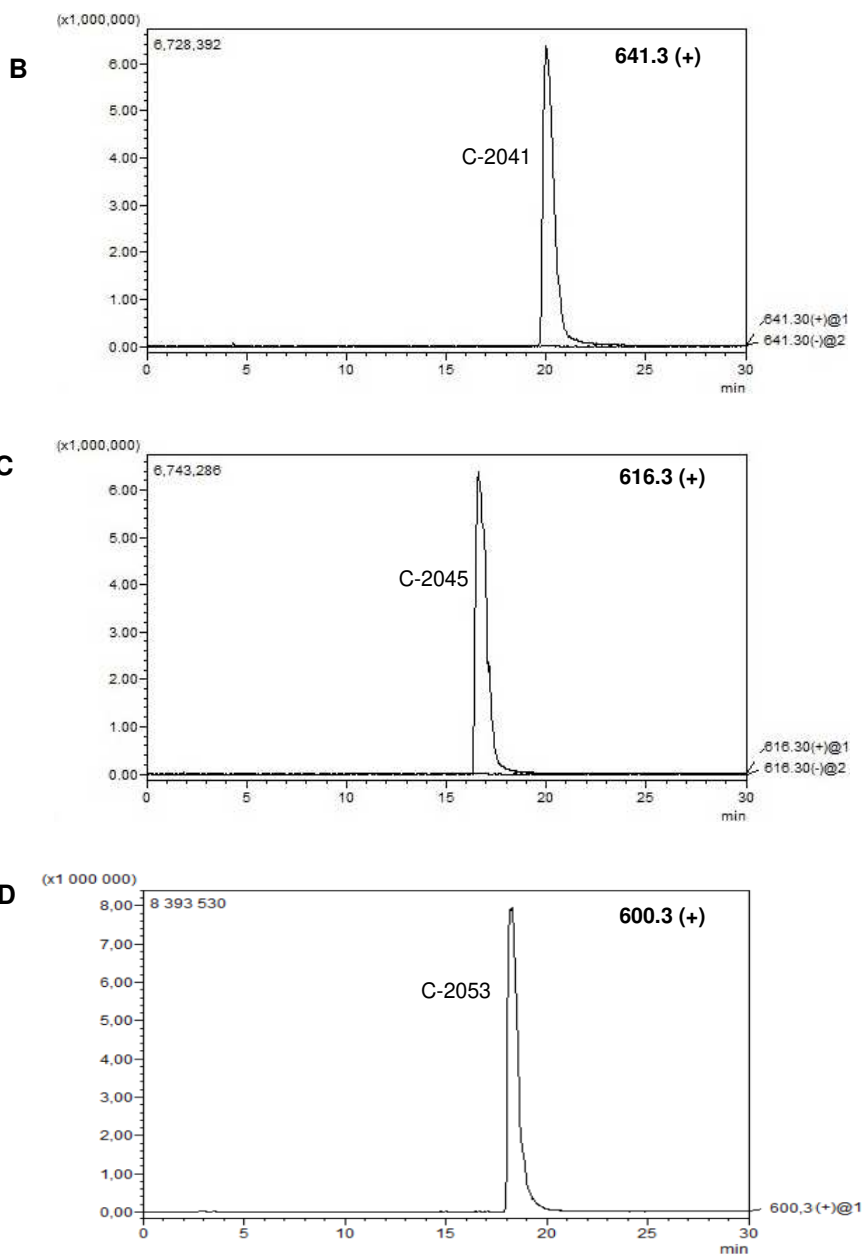
Rys. IV.8. Porównanie widm *UV-vis* produktu Z_2 powstałego w wyniku nieenzymatycznego rozpadu bisakrydyny A - C-2028, B – C-2041, C – C-2045, C – C-2053, ich monomerów oraz 1-nitroakrydonu. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimatzu).

Na podstawie porównania przebiegu otrzymanych widm absorpcyjnych oraz charakterystycznych maksimów absorpcji stwierdzono, że produkty Z_1^{28} i Z_1^{41} posiadają chromofor silnie zbliżony do chromoforu monomeru imidazoakrydonu o symbolu C-1212, natomiast widmo *UV-vis* Z_1^{45} przypomina widmo monomeru C-1311, analogu z dodatkową grupą hydroksylową w pierścieniu imidazoakrydonu. Należy zatem uznać, że otrzymane produkty rozpadu Z_1 należą do grupy imidazoakrydonów. Natomiast widma *UV-vis* produktów Z_2 nie wykazują podobieństwa do widm monomerów imidazoakrydonu, ani 1-nitroakrydyn (C-857 i C-1748), lecz do produktu przemiany monomerów 1-nitroakrydyny do 1-nitroakrydonu (Rys.IV.8.) [Mróz i in. 2018, Wiśniewska i in. 2012].

IV.2.4.2. Analiza ESI-MS

W celu przybliżenia struktury produktów Z_1 i Z_2 i wykluczenia rozpadu badanych związków do monomerów, z których zostały zsyntetyzowane, przeprowadzono analizę HPLC-ESI-MS badanych pochodnych bisakrydyny (Rys.IV.9) i ich produktów Z_1 i Z_2 . Otrzymane wyniki wartości m/z poszczególnych pików porównano z jonami masowymi pochodnych monomerów imidazoakrydonu jak i 1-nitroakrydonu (Tabela IV.2a-b.).

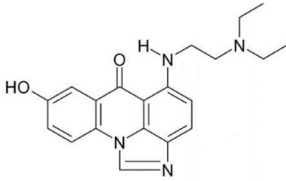
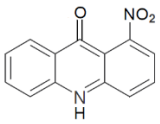
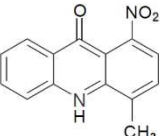




Rys. IV.9. Chromatogramy MS dla 0,05mM wodnych roztworów A – C-2028, m/z = 586.3, B – C-2041, m/z = 641.3, C – C-2045, m/z = 616.3, D – C-2053, m/z = 600.3. Analiza prowadzona HPLC-ESI-MS (Shimadzu).

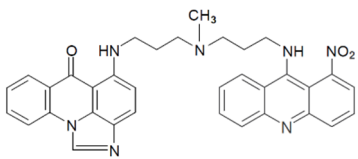
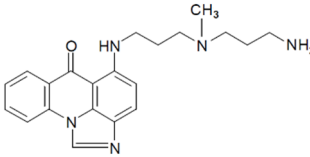
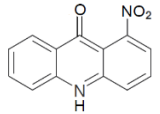
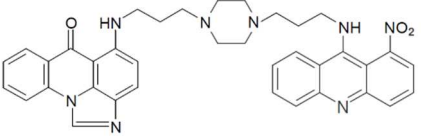
Tabela IV.2a. Zestawienie jonów masowych wraz z strukturą pochodnych monomerów imidzoakrydonu i 1-nitroakrydonu. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC i ESI-MS (Shimadzu).

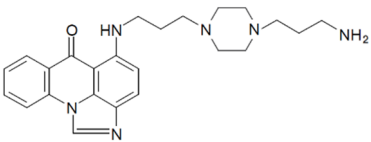
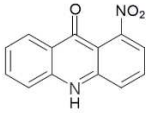
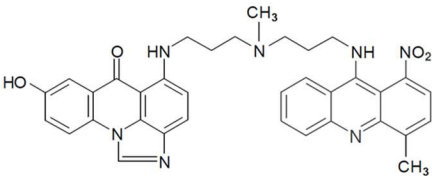
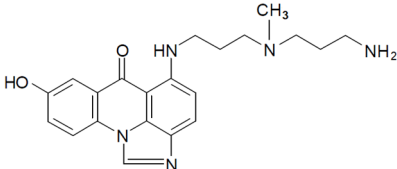
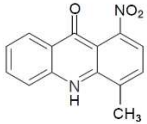
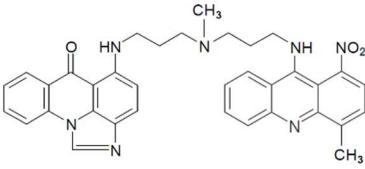
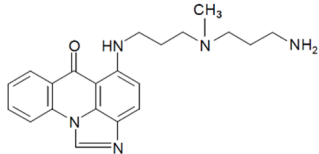
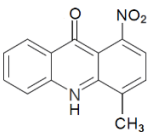
Związek	ESI-MS m/z	Struktura
C-1212	321.15	

C-1311	351.15	
1-nitro-9-akrydon	241.1	
1-nitro-4-metylo-9-akrydon	255.1	

Przedstawione powyżej dane pozwoliły zaproponować struktury powstających zanieczyszczeń na podstawie porównań wartości jonów ESI-MS. Wyniki analiz przedstawiono w Tabeli IV.2b.

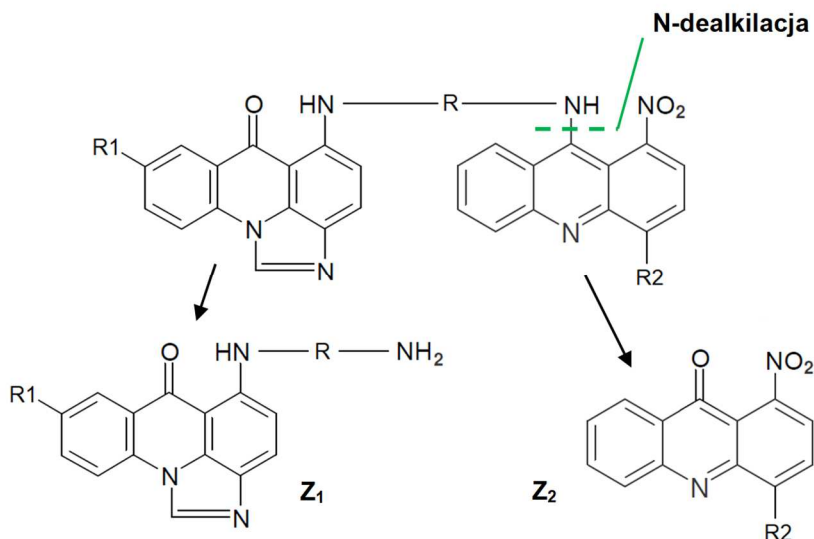
Tabela IV.2b. Zestawienie jonów masowych badanych pochodnych bisakrydiny wraz ze strukturą oraz jonów masowych produktów rozpadu tych związków w roztworach wodnych wraz z proponowanymi strukturami. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC i ESI-MS (Shimadzu).

Związek	ESI-MS m/z	Struktura
C-2028	586.25	
Z ₁ ²⁸	364.15	
Z ₂ ²⁸	241.15	
C-2041	641.25	

Z ₁ ⁴¹	419.15	
Z ₂ ⁴¹	241.1	
C-2045	616.25	
Z ₁ ⁴⁵	380.15	
Z ₂ ⁴⁵	255.1	
C-2053	600.25	
Z ₁ ⁵³	364.15	
Z ₂ ⁵³	255.15	

Analiza wartości otrzymanych jonów masowych wskazuje, że obserwowane produkty nie są związkami C-1212, C-1311, chociaż posiadają element pierścienia imidzoakrydonu. Natomiast nie ma wśród produktów rozpadu pochodnych 9-amino-1-nitro akrydyny, jak związki C-1748, ani C-857, a jako Z₂ powstały analogi 1-nitroakrydonu, bez grupy aminowej w pozycji 9. Czyli na podstawie analizy ESI-MS wywnioskowano, że badane związki w roztworach wodnych

ulegają hydrolizie, w wyniku której następuje zerwanie wiązania C9-N w strukturze 9-amino-1-nitroakrydyny, a w efekcie N-dealkilacja. (Rys.IV.10). Podsumowując, powstałe produkty Z₁ należą do grupy imidzoakrydonów, których proponowane struktury zostały przedstawione w Tabeli IV.2.b, natomiast produkt Z₂ w przypadku C-2028 i C-2041 okazał się być 1-nitro-9-akrydonem, a w wyniku przemiany C-2045 i C-2053 otrzymano 1-nitro-4-metylo-9-akrydon.



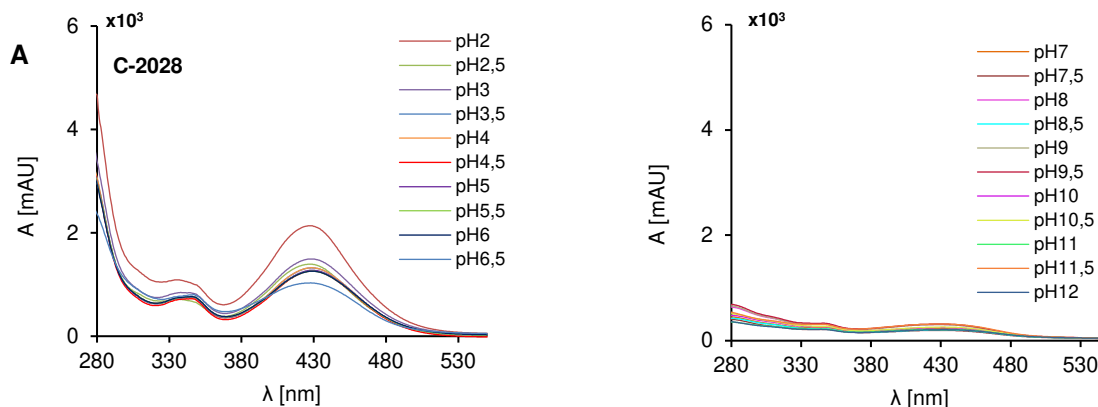
Rys.IV.10. Ogólny schemat przemiany pochodnych bisakrydyny w roztworze wodnym.

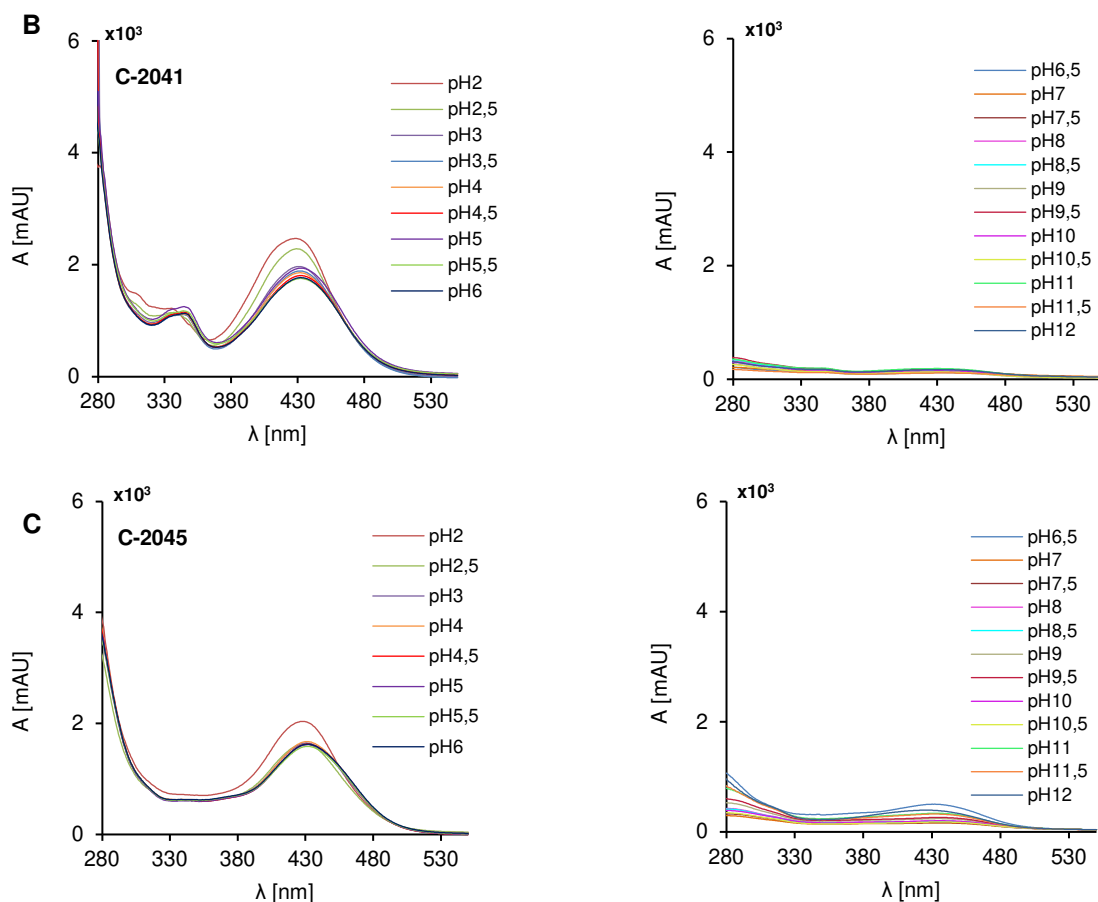
IV.3. Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej

IV.3.1. Określenie optymalnej wartości pH fazy ruchomej

W ramach kolejnego etapu badań przeprowadzono optymalizację warunków analizy chromatograficznej, tj. dobrano wartość pH buforu, jednego z eluentów stosowanych do fazy ruchomej. W tym celu dla trzech badanych związków (C-2028, C-2041 i C-2045), różniących się rozpuszczalnością, sporządzono 0,1 mM roztwory w buforze Brittona-Robinsona w zakresie pH od 2 do 12 co pół jednostki, a następnie zarejestrowano ich widma (Rys.IV.11.).

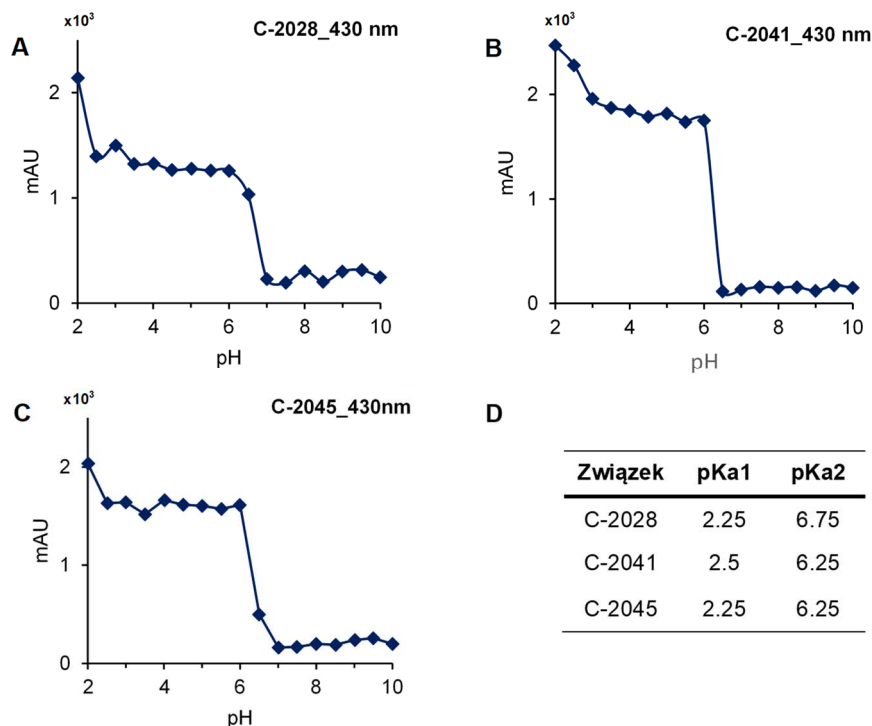
Widmo UV-vis w zależności od pH roztworu





Rys. IV.11. Analiza absorpcji UV-vis 0,1 mM roztworów A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 w buforze Brittona-Robinsona w zakresie pH od 2 do 12.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż w zależności od zastosowanego pH buforu otrzymuje się różne widma absorpcyjne badanych pochodnych bisakrydyny. Świadczy to o występowaniu badanych związków w różnych formach jonizacji. Fakt ten ma istotne znaczenie, gdyż warunki chromatograficzne muszą być opracowane tak, żeby badany związek występował w jednej formie zjonizowania. Ponadto analiza otrzymanych wartości pKa pozwala na ocenę zachowania się (z powodu różnych właściwości) związków w różnych przedziałach pH, w tym w pH fizjologicznym. W tym celu dla każdego badanego związku sporządzono krzywe miareczkowania spektrofotometrycznego, czyli wykres zależności pH od absorpcji przy długości fali odpowiadającej w przybliżeniu maksimum wszystkich form, czyli 430 nm (Rys.IV.12.). Stałe dysocjacji pKa oszacowano graficznie jako wartości pKa, które odnoszą się do połowy punktów fali miareczkowania. Biorąc pod uwagę otrzymane dane, zasugerowano, że w zakresie badanego pH badane związki mogą występować w przynajmniej trzech formach sprotonowania: w postaci podwójnie sprotonowanej (do pKa1), monokationu (do pKa2) i wolnej zasady (> pKa2). Wcześniejsze badania na monomerach [Cąkała i in. 1999] wykazały, że sprotonowaniu może ulegać alifatyczny atom azotu oraz drugi w pozycji 2 pierścienia imidazoakrydonu.

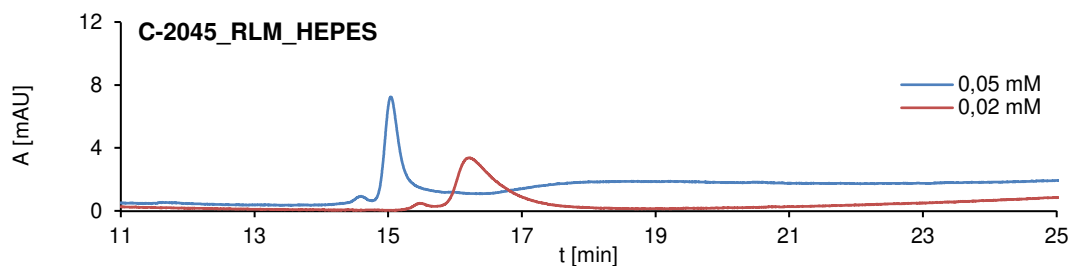


Rys. IV.12. Wykresy zależności pH od absorbancji 0,1 mM roztworów związków A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045 w buforze Britona-Robinsona w zakresie pH 2-12 przy długości fali 430 nm, D – wyznaczone wartości pKa dla badanych bisakrydyn.

Na podstawie otrzymanych wykresów można stwierdzić, że przy długości fali 430 nm najwyższą absorbancję badanych związków obserwuje się przy zastosowaniu kwaśnego pH. Świadczy to, iż zasadowe bisakrydyny (C-2028, C-2041, C-2045) występują w tych warunkach w formie sprotonowanej, czyli w postaci soli. Forma ta jest lepiej rozpuszczalna w fazie ruchomej, co zapewnia lepszą powtarzalność analizy HPLC prowadzonej w kwaśnym pH. Przy wyższych wartościach pH badane związki wykazują znacznie gorszą rozpuszczalność, zatem zastosowanie pH bardziej zasadowego wiązałoby się z osadzaniem badanych bisakrydyn na kolumnie chromatograficznej. Najbardziej rozpuszczalna forma dla wszystkich trzech związków występuje przy pH 2 do 2,5, jednakże stosowana do analizy chromatograficznej kolumna ma zakres pracy powyżej 2,5 pH. Wobec powyższego, do analizy chromatograficznej postanowiono stosować bufor mrówczanowy o pH 3,4, przy którym badane związki zawierają jeszcze około 10% formy podwójnie zjonizowanej.

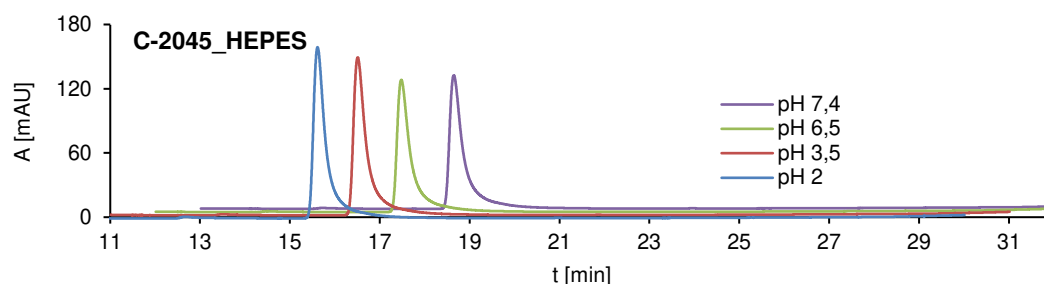
IV.3.2. Wybór wartości pH próbki przeznaczony do analizy HPLC

Pierwszy wynik analizy po naniesieniu na kolumnę chromatograficzną mieszaniny reakcyjnej (związku i źródła enzymów metabolizujących np. RLM), sporządzonej dla dwóch stężeń związku C-2045 (0,02 mM i 0,05 mM) w buforze HEPES o pH 7,4 zaprezentowano na Rys.IV.13.



Rys. IV.13. Wynik analizy chromatograficznej mieszaniny reakcyjnej dla dwóch stężeń związku C-2045 (0,02 mM i 0,05 mM) sporządzonych w buforze HEPES o pH 7,4. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Jak widać na załączonych chromatogramach zamiast ostrego, pojedynczego pików na obu pojawiają się co najmniej dwa sygnały o nieregularnym kształcie. W przypadku stężenia 0,05 mM C-2045 po 16 min dodatkowo widać ciągnący się „ogon” pików. Zastosowanie niższego stężenia substratu również prowadzi do otrzymania mało ostrych pików o znacznie mniejszej intensywności. Analiza widm UV-vis pozwoliła ustalić, iż wszystkie pików pochodzą od badanego związku C-2045. Jak wykazałam powyżej, związek w zależności od zastosowanego pH występuje w różnych formach zjonizowania, dlatego też aby na chromatogramie uzyskać tylko jedną formę nie wystarczy niskie pH fazy ruchomej. Konieczne jest uzyskanie warunków kwaśnych próbki bezpośrednio przed analizą HPLC. Aby potwierdzić ten wniosek przygotowano 0,1 mM roztwory związku C-2045 w buforze HEPES o pH 2; 3, 5; 6,5 i 7,4, a następnie poddano je analizie chromatograficznej. Otrzymane wyniki przedstawiono poniżej (Rys. IV.14.)



Rys. IV.14. Zestawienie analiz chromatograficznych 0,1 mM roztworów związku C-2045 w buforze HEPES o pH 2; 3,5; 6,5 i 7. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, iż im niższe pH nanoszonej na kolumnę próbki tym intensywność pików pochodzącego od badanego związku C-2045 jest większa. Na wszystkich uzyskanych chromatogramach w okolicach 16 minuty widać pojedynczy, ostry pik pochodzący od badanej bisakrydiny. Najwyższą intensywność pików otrzymano przy pH 2, zaś najniższą przy pH 7,4. Wydaje się, że spadek intensywności pików pochodzącego od związku C-2045 może wiązać się ze wzrostem jego hydrofobowości, a w konsekwencji spadkiem powinowactwa do fazy ruchomej. Zatem, aby temu zapobiec postanowiono, że do zatrzymania reakcji enzymatycznej zamiast metanolu stosować się będzie 1 M kwas solny (8,75ul/70ul mieszaniny reakcyjnej). W ten sposób pH próbki nanoszonej na kolumnę obniżono do ok. pH 2.

IV.4. Metabolizm pochodnych bisakrydyny wobec enzymów mikrosomalnych

Na tym etapie badań w pierwszej kolejności przeprowadzono doświadczenia mające na celu zoptymalizowanie procedury pod kątem określenia:

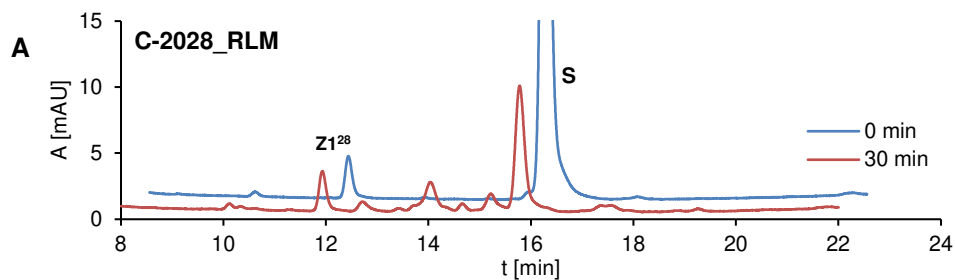
- końcowego stężenia bisakrydyny w mieszaninie reakcyjnej,
- końcowego stężenia NADPH w mieszaninie reakcyjnej,
- środowiska reakcji enzymatycznej (rodzaj buforu o pH 7,4)
- warunków zatrzymywania reakcji enzymatycznej,
- czasu inkubacji.

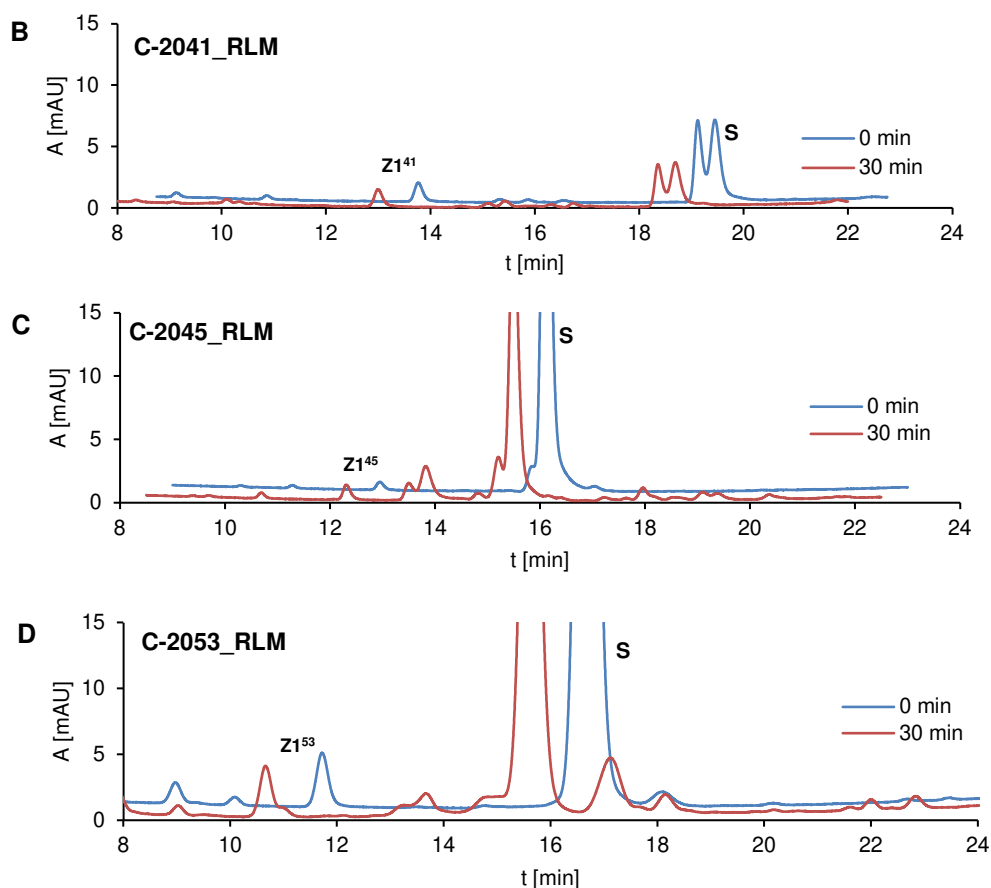
Ze względu na to, iż przyjęte do badań pochodne w porównaniu do ich monomerycznych substratów wykazują odmienne właściwości fizykochemiczne, takie jak rozpuszczalność, właściwości kwasowo-zasadowe oraz charakter widm UV-vis, optymalizacja warunków prowadzenia reakcji enzymatycznej okazała się procesem bardzo czasochłonnym. W efekcie wielu serii eksperymentów określono najkorzystniejsze warunki dla przebiegu badanych reakcji enzymatycznych jako:

- 0,05 mM bisakrydyny,
- 2mM NADPH,
- bufor HEPES o pH 7,4,
- zatrzymanie enzymów mikrosomalnych poprzez dodatek 1 M kwasu solnego.

IV.4.1. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec nieaktywowanych enzymów mikrosomalnych wątroby szczura

Prace nad metabolizmem bisakrydyn rozpoczęto od analizy podatności badanych związków (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) na utlenianie (I faza biotransformacji), wobec nieaktywowanych frakcji enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura. W tym celu przygotowano mieszaniny reakcyjne zawierające: 0,05 mM związek C-2028/C-2041/C-2045/C-2053, frakcję mikrosomalną RLM (2mg/ml), 2mM kofaktor NADPH, 2 mM MgCl₂ w buforze HEPES o pH 7,4, po czym inkubowano je przez 30 min w 37°C. Analizy RP-HPLC badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono zarówno przed jak i po inkubacji. Otrzymano chromatogramy, które zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.15.).



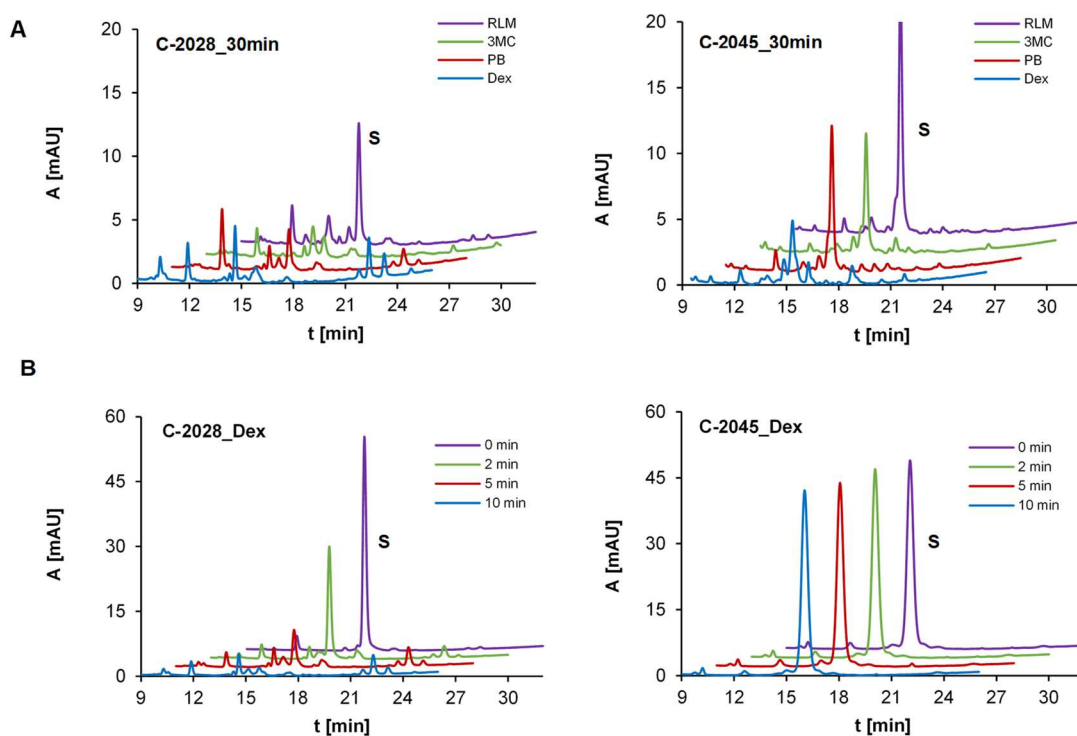


Rys. IV.15. Zestawienie analiz chromatograficznych mieszanin reakcyjnych zawierających 0,05mM związek A – C-2028, B – C-2041, C – C-2045, D – C-2053, 2mM NADPH, 2 mg/ml RLM i bufor HEPES o pH 7.4, inkubowanych przez 0 i 30 min w 37°C. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Analizując powyższe chromatogramy można dostrzec, że badane związki ulegają, choć w różnym stopniu, metabolizmowi wobec nieaktywowanych enzymów mikrosomalnych wątroby szczura. Najefektywniej przemiany metaboliczne zachodzą w przypadku związku C-2028, C-2045 i C-2053 dając co najmniej 4 główne produkty. Natomiast związek C-2041 wykazał najniższą podatność na metabolizm wobec RLM. Ponadto jako jedyny nie pojawia się w formie jednego, ostrego piku, lecz dwóch. C-2041 wykazuje znacznie mniejszą rozpuszczalność w roztworach wodnych w porównaniu do pozostałych trzech związków (C-2028, C-2045 i C-2053). Zatem obraz ten może wynikać z faktu, iż związek C-2041 występuje w roztworze podlegającym podziałowi w dwóch formach. Mogą one być różnymi, pozostającymi w równowadze, formami zjonizowania związku. Ponadto związek ten wykazuje słabsze właściwości hydrofilowe i trudniej ulega podziałowi na kolumnie chromatograficznej, co obserwuje się jako wyższy czas retencji (ok. 19 min). Przyczyna tych różnic może być związana z obecnością w strukturze związku C-2041 dodatkowego pierścienia piperazynowego. Należy również dodać, iż wydłużenie czasu inkubacji do 60 min nie powodowało przyrostu stężenia powstałych metabolitów.

IV.4.2. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2045 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych

Pierwszym etapem badań było zbadanie przemian metabolicznych dwóch pochodnych wobec nieaktywowanych, szczurzych enzymów mikrosomalnych oraz ludzkich aktywowanych deksametazonem (Dex), fenobarbitalem (PB) i 3-metylocholanrenem (3MC), czyli o podwyższonej aktywności izoenzymów P450, odpowiednio z podrodzin 3A, 2B i 1A [Monostory i in. 1994, Yoon i in. 2002, Mączka i in. 2016]. Badania te miały na celu określenie wobec której grupy enzymów cytochromu P450 przemiany metaboliczne bisakrydyn zachodzą najefektywniej. Przygotowano mieszaniny reakcyjne zawierające 0,05 mM związek, odpowiednią frakcję mikrosomalną (2mg/ml), 2mM kofaktor NADPH, 2 mM MgCl₂ i bufor HEPES o pH 7,4. Inkubację prowadzono przez 30 min w 37°C, rejestrując również chromatogramy mieszanin na starcie inkubacji. Otrzymane analizy RP-HPLC dla dwóch najbardziej różniących się strukturą, badanych bisakrydyn tj. C-2028 i C-2045 zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.16.).



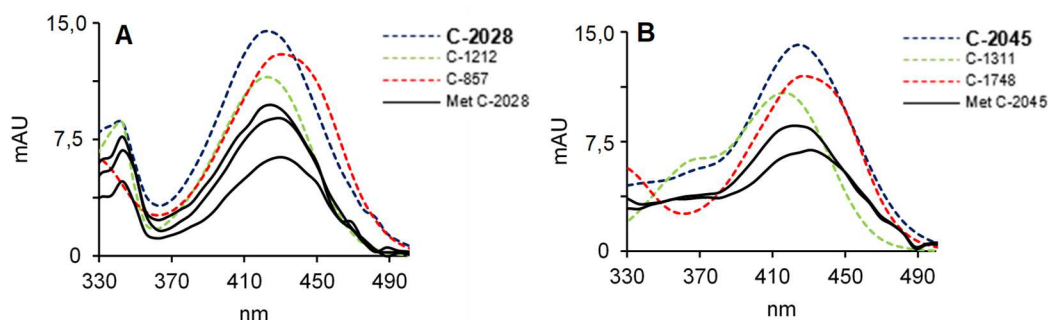
Rys.IV.16. Zestawienie analiz chromatograficznych mieszanin reakcyjnych zawierających 0,05mM bisakrydynę po inkubacji z frakcją mikrosomalną (2mg/ml) A – po 30 minutowej inkubacji z nieaktywowanymi RLM i aktywowanymi 3MC, PB, Dex, B – po 2, 5, 10 min inkubowania związku z aktywowanymi mikrosomami Dex. Jako kofaktor zastosowano 2mM NADPH. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Na wykresie (Rys.IV.16a) wykazano, że niezależnie od rodzaju zastosowanych frakcji enzymów mikrosomalnych, związki C-2028 i C-2045 ulegają przemianom metabolicznym, dając co najmniej 4 główne produkty. Największy stopień przereagowania substratu nastąpił wobec mikrosomów aktywowanych deksametazonem (Dex), czyli o podwyższonej ekspresji izoenzymów P450 3A. Najślabszy efekt obserwuje się wobec mikrosomalnych enzymów

nieaktywowanych (RLM). W przypadku frakcji aktywowanych fenobarbitalem (PB) i 3-metylocholanantrenem (3MC), podobnie jak w przypadku RLM stężenia powstałych wobec nich metabolitów są dużo niższe niż w wypadku Dex. Ponadto związek C-2028 metabolizuje dużo szybciej w porównaniu z C-2045, czyli analogiem zawierającym grupę hydroksylową w pierścieniu imidazoakrydonu (Rys.IV.16b.) Po 10 minutach inkubacji związku C-2028 z frakcją mikrosomalną Dex widać, iż związek ten przereagował praktycznie w 100%, natomiast w przypadku C-2045 po takim czasie inkubacji nie zidentyfikowano produktów przemiany metabolicznej. Otrzymane wyniki dowodzą, iż szlaki metaboliczne badanych pochodnych bisakrydyn są dość skomplikowane. Ponadto przemiany bisakrydyny nie posiadających w swojej strukturze grupy hydroksylowej w pierścieniu imidazoakrydonu w badanych warunkach zachodzą dużo szybciej, w porównaniu ze swoimi analogami hydroksylowymi.

IV.4.3. Analiza widm UV-vis metabolitów pochodnych bisakrydyny otrzymanych wobec mieszaniny enzymów mikrosomalnych

Podczas analiz chromatograficznych zebrano również widma UV-vis produktów biotransformacji badanych związków, C-2028 i C-2045 powstających wobec różnych enzymów frakcji mikrosomalnych i przedstawiono na (Rys.IV.17)



Rys.IV.17. Porównanie widm UV-vis związków A – C-2028, B – C-2045 i ich monomerów oraz metabolitów powstałych wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych Dex. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Analizując powyższe dane można dostrzec, iż widma absorpcyjne metabolitów różnią się, niektóre w mniejszym (Met C-2045), niektóre w większym stopniu (Met C-2028) od widm UV-vis związków macierzystych. Sugeruje to, iż po przemianie zmiany nastąpiły w strukturze chromoforu badanych dimerów. Na podstawie badań prowadzonych dla monomerów badanych bisakrydyn [Potęga i in. 2011, Wiśniewska i in. 2012] można wstępnie wnioskować, że w dimerze modyfikacje nastąpiły prawdopodobnie w pierścieniu 1-nitroakrydyny, ponieważ tylko monomery 1-nitroakrydyny, a nie imidazoakrydonu wykazywały wcześniej podatność na metabolizm wobec enzymów P450. Ponadto stwierdzono, iż widma UV-vis otrzymanych produktów mają inny kształt niż widma monomerów (Rys. IV.17.), zatem można twierdzić, że otrzymane metabolity pozostają dimerami.

IV.5. Metabolizm pochodnych bisakrydyny wobec enzymów rekombinantowych

Ze względu na to, iż w wyniku przemian metabolicznych badanych związków wobec enzymów frakcji mikrosomalnych skład mieszanin reakcyjnych jest skomplikowany, a stężenia powstałych produktów bardzo niskie, identyfikacja metabolitów była dość utrudniona. Dlatego też, kolejnym etapem badań było przeprowadzenie analiz HPLC oraz rejestracja widm UV-vis i ESI-MS dla mieszanin reakcyjnych, w których skład wchodziły wybrane rekombinantowe enzymy cytochromu P450, FMO i UGT. Tak zaplanowane badania pozwoliły nie tylko na prostszy skład mieszanin reakcyjnych, propozycję struktur metabolitów, lecz również na identyfikację izoenzymów odpowiedzialnych za transformację badanych bisakrydyn. Na tym etapie badań włączono dodatkowo dwa związki analizowane wcześniej, pochodne C-2041 i C-2053 o strukturach przedstawionych na Rys. II.30 i właściwościach z Tabeli IV.1a i Tabeli IV.2b.

IV.5.1. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450

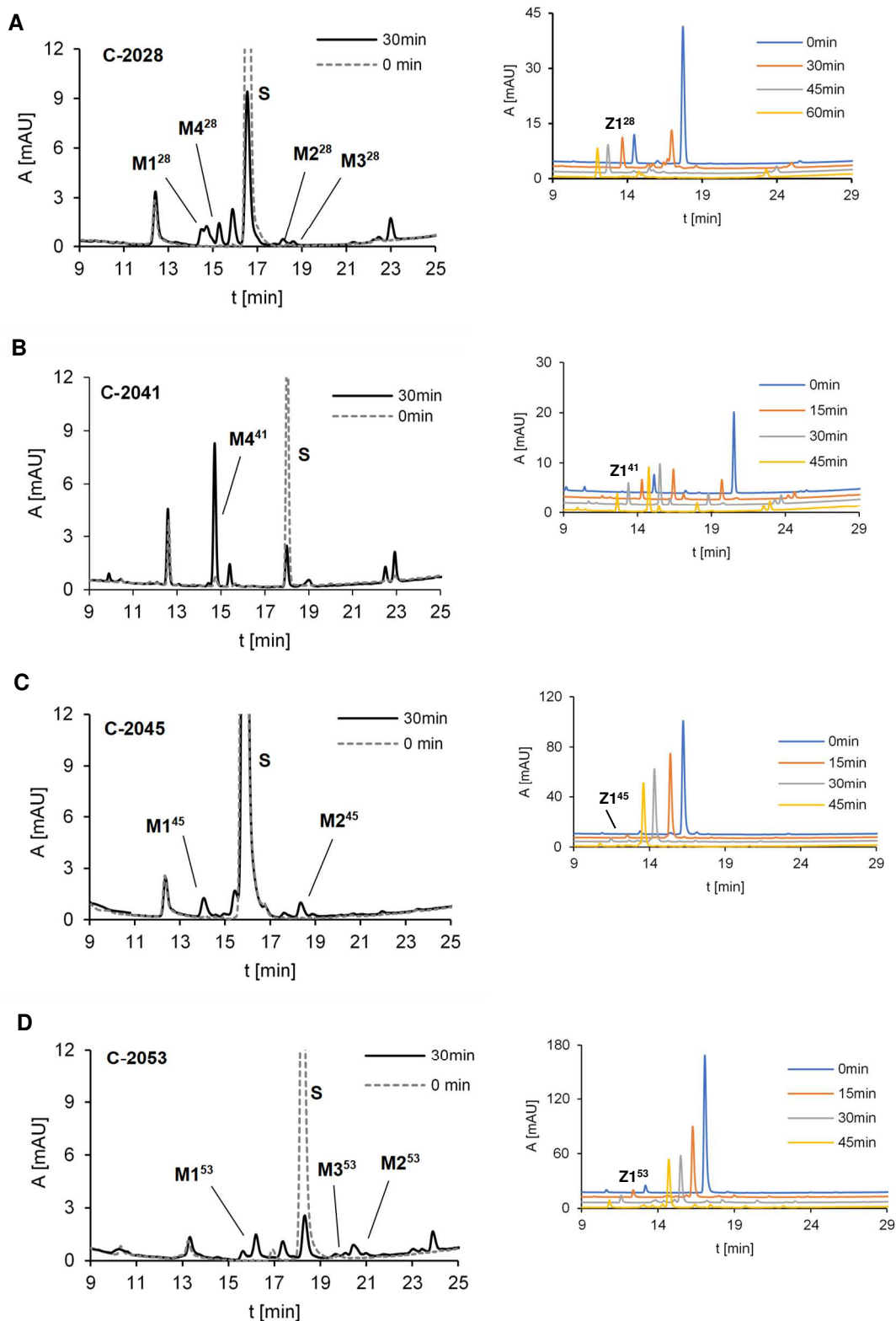
Ze względu na fakt, iż w poprzednich badaniach (*IV.4. Metabolizm pochodnych bisakrydyny wobec enzymów mikrosomalnych*) pochodne bisakrydyny, wykazały podatność na przemiany metaboliczne wobec enzymów I fazy, szczególnie P450 3A (*IV.4.2. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2045 wobec ludzkich enzymów mikrosomalnych*), w niniejszym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 ulegają przemianom wobec rekombinantowego izoenzymu P450 3A4. Jest on najważniejszym przedstawicielem podrodziny P450 3A, uczestniczy bowiem w biotransformacji prawie 50% leków. Ponadto posiada szerokie spektrum specyficzności substratowej [Ortiz 2015]. Do badań wybrano również izoenzym P450 2C19, pomimo, że odpowiedzialny jest on za transformację tylko 15% obecnie stosowanych klinicznie leków, w tym leków o wąskich oknach terapeutycznych. Jest to jednak grupa farmaceutyków powszechnie stosowanych w terapii, ponieważ zawiera leki pobudzające krzepliwość krwi, takie jak warfaryna i klopigidrel, przeciwpadaczkową karbamazepinę i inhibitor pompy protonowej omeprazol [Scott i in. 2012, Flaten i in. 2016]. Biorąc pod uwagę obecność w badanych bisakrydynach aminoalkilowego łańcucha bocznego i fakt, iż P450 2C19 jest silnie zaangażowany w metabolizm tego rodzaju grupy aminowej w innych środkach terapeutycznych, w tym katalizuje N-demetylację leku przeciwdepresyjnego imipraminy [Sequeira i in. 1995] postanowiono zbadać podatność wszystkich czterech badanych związków również wobec tego izoenzymu.

IV.5.1.1. P4503A4

W pierwszej kolejności inkubowano rekombinantowe ludzkie izoenzymy P4503A4 z pochodnymi bisakrydyny C-2028, C-2045 i C-2053 przez 0, 15, 30 i 45 lub 60 min. w obecności kofaktora NADPH. Analizy RP-HPLC i ESI MS badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono zarówno przed jak i po inkubacji. Otrzymano chromatogramy, które zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.18.).



P450 3A4



Rys.IV.17. Przemiany metaboliczne 0,05mM A - C-2028, B – C-2041, C - C-2045, D - C-2053 wobec P450 3A4 w obecności NADPH (2mM) po 0,15,30,45 lub 60 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

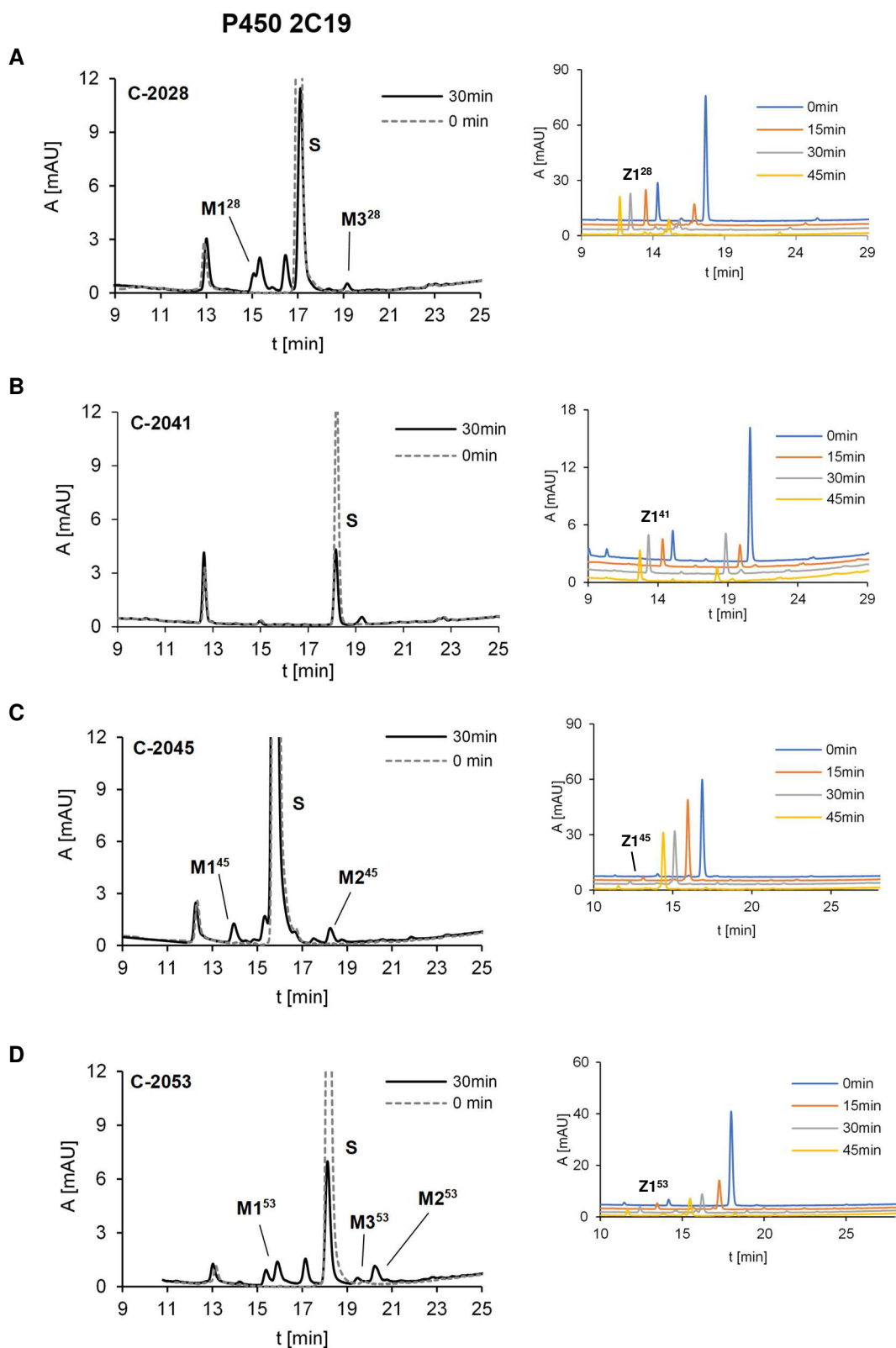
Analizując powyższe chromatogramy (Rys.IV.17) można dostrzec, że wszystkie cztery badane związki ulegają przemianom metabolicznym wobec P4503A4, dając jeden lub kilka głównych produktów o różnej intensywności. W porównaniu z C-2028 (analog demetylowy) i C-2053 (analog nie zawierający grupy hydroksylowej) związek C-2045 wykazał najslabszą podatność na metabolizm. Natomiast związek C-2041 (analog z pierścieniem piperazynom w łączniku) spośród wszystkich badanych bisakrydyn najszybciej ulega metabolizmowi wobec P4503A4, dając jeden główny pik o bardzo wysokiej intensywności. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji stężenie tego metabolitu rośnie, przy jednoczesnym spadku stężenia substratu (związku C-2041). Jednak w przeciwieństwie do pozostałych badanych związków tj. C-2028, C-2045 i C-2053, w przypadku C-2041 nie zaobserwowano produktów w formie dimeru. Analiza otrzymanego jonu masowego wskazuje, iż powstały metabolit jest monomerem.

Należy dodać, iż osady otrzymane po wirowaniu próbek posiadały żółte zabarwienie. Zatem prawdopodobne jest iż, powstałe reaktywne metabolity sorbuja się bądź wręcz wiążą się z białkami obecnymi we frakcji enzymatycznej przez co ich stężenie w próbce poddanej analizie HPLC-ESI-MS było zdecydowanie obniżone w stosunku do przewidywanego ze stechiometrii reakcji. Pomimo to udało się otrzymać jony masowe niektórych produktów.

IV.5.1.2. P4502C19

Kolejnym etapem było sprawdzenie, czy pochodne bisakrydyny o symbolach C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 podlegają metabolizmowi wobec ludzkiego izoenzymu rekombinantowego P4502C19. W tym celu przygotowano mieszaniny reakcyjne zgodnie z [Tabelą III.7 \(III.3.5.1. Badanie metabolizmu wobec rekombinantowych P4502C19 i P4503A4\)](#). Analizy RP-HPLC i ESI MS badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono zarówno przed jak i po 15, 30 i 45 minutowej inkubacji w 37°C. Otrzymane chromatogramy zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.19.).

Otrzymane wyniki wskazały, że zarówno C-2028, C-2045 jak i C-2053 ulegają metabolizmowi wobec izoenzymu P4502C19 (2-3 produkty). Pomimo niskiego stężenia metabolitów w badanej próbce, za pomocą analizy ESI-MS otrzymano jony masowe niektórych z nich. Analiza otrzymanych wyników wskazała, że piki pochodzące od metabolitów powstałych zarówno po inkubacji związków z izoenzymem P4502C19 jak i P4503A4 posiadają te same czasy retencji i jony masowe (Tabela IV.3.). Zatem można przypuszczać, iż szlaki metaboliczne badanych bisakrydyn wobec P4502C19 i P4503A4 prowadzą do powstania tych samych produktów. Natomiast dla związku C-2041 nawet po 45 minutach nie zaobserwowano powstawania nowego produktu pomimo, że stężenie substratu istotnie spadało. Można przypuszczać, że nie on wykazał podatności na metabolizm wobec P4502C19. Gwałtowny spadek stężenia substratu po 15 min wynikać może z podatności związku do sorbowania się na powierzchni lub wręcz wiązania się do białek enzymatycznych. Brak produktu przemiany przy spadającym stężeniu substratu może też świadczyć o podatności powstającego metabolitu do wiązania się z powierzchnią enzymu, szczególnie, że powstający metabolit może być związkiem reaktywnym.

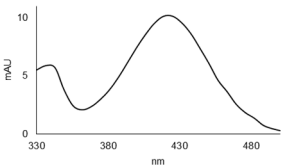
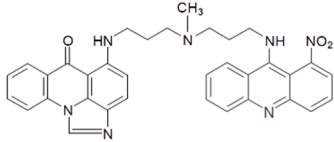
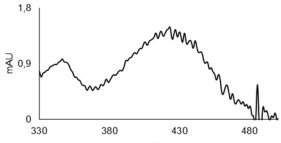
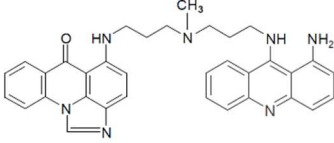
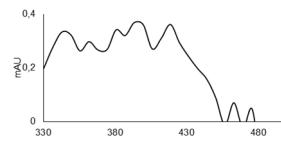
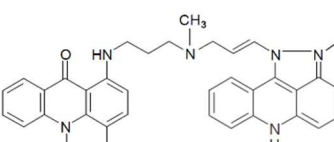
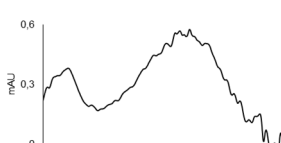
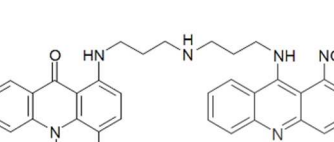

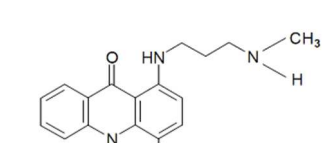
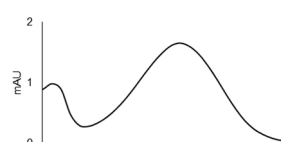
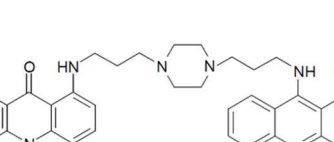


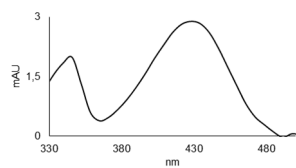
Rys.IV.18. Przemiany metaboliczne 0,05mM A - C-2028, B – C-2041, C - C-2045, D - C-2053 wobec P450 2C19 w obecności NADPH (2mM) po 0,15, 30, 45 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

IV.5.1.3. Identyfikacja metabolitów otrzymanych wobec P450 2C19 i 3A4

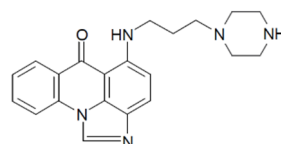
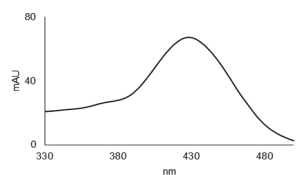
Podczas analiz chromatograficznych oprócz jonów masowych zebrano również widma UV-vis produktów biotransformacji badanych związków powstałych wobec rekombinantowych izoenzymów P4502C19 i 3A4. Na podstawie zebranych stosunków m/z i widm absorpcyjnych zaproponowano struktury dla poszczególnych metabolitów pochodzących od związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 (Tabela IV.3.)

Tabela IV.3. Zestawienie jonów masowych oraz widm absorpcyjnych metabolitów badanych bisakrydyn wraz z proponowaną strukturą. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu).

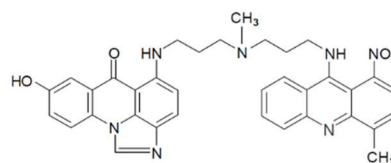
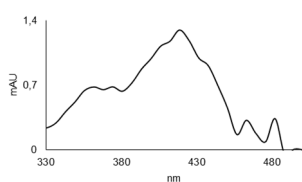
Związek	Widmo UV-vis	ESI-MS m/z	Proponowana struktura
C-2028		586.25 [M+H] ⁺	
M1²⁸		556.25 [M+H-30] ⁺	
M2²⁸		568.25 [M+H-18] ⁺	
M3²⁸		572.25 [M+H-14] ⁺	
M4²⁸		307.10	
C-2041		641.30 [M+H] ⁺	

M4⁴¹

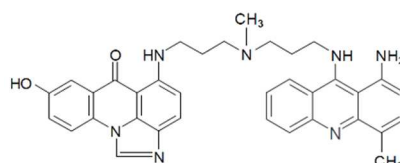
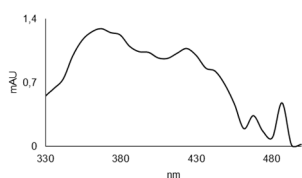
362.20

**C-2045**

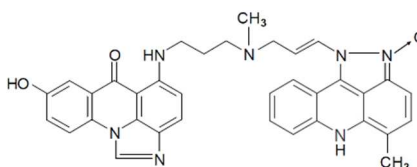
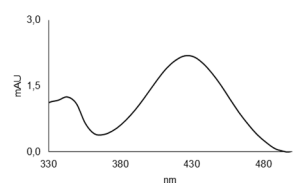
616.25

[M+H]⁺**M1⁴⁵**

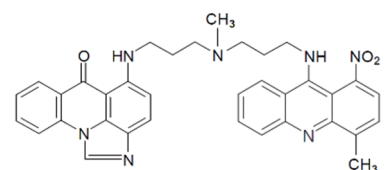
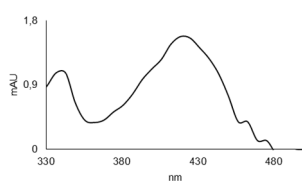
586.25

[M+H-30]⁺**M2⁴⁵**

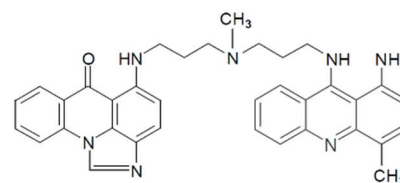
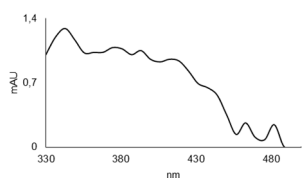
598.25

[M+H-18]⁺**C-2053**

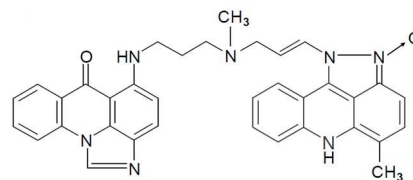
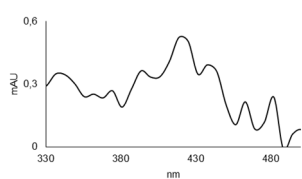
600.25

[M+H]⁺**M1⁵³**

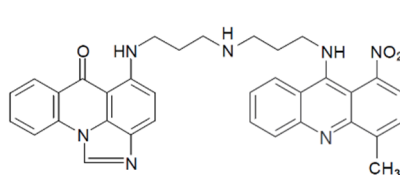
570.25

[M+H-30]⁺**M2⁵³**

582.25

[M+H-18]⁺**M3⁵³**

586.25

[M+H-14]⁺

W przypadku trzech bisakrydyn tj. C-2028, C-2045 i C-2053 jako produkt metabolizmu wobec izoenzymów P450C19 i 3A4 (M1) zaproponowano pochodną, która powstała w wyniku redukcji grupy nitrowej do aminowej w pierścieniu 1-nitroakrydyny, co odpowiada $m/z = [M-30+H]$. Dla tych trzech związków otrzymano również produkt M2 o $m/z = [M-18+H]$. Z początku wydawało się, iż jest to związek z dodatkowym 6-członowym pierścieniem w pierścieniu 1-nitroakrydyny (co miało miejsce w przypadku monomerów), jednakże przeprowadzona w naszym zespole (dr Agnieszka Potęga) elektrochemiczna symulacja metabolizmu badanych bisakrydyn oraz analiza ESI-QTOF-MS powstałych w wyniku niej metabolitów dowiodła iż produkty M2 to związki z dodatkowym 5-członowym pierścieniem i dodatkowym atomem tlenu tzw. N-tlenek (Tabela IV.3, związek M2) [dane nieopublikowane]. Ponadto, dla związków C-2028 i C-2053 wobec CYP3A4 powstawał związek M3 o $m/z = [M-14+H]$. Może to być zarówno produkt demetylacji ($-CH_2$) bądź niepełnej redukcji grupy nitrowej do N-hydroksyloamino pochodnej. Wydaje się, iż odszczepienie grupy metylowej jest bardziej prawdopodobne, gdyż N-hydroksyloamino pochodne są bardzo nietrwałe. Ponadto wynik przeprowadzonej jak powyżej symulacji elektrochemicznej, oraz badania z zastosowaniem analizy ESI-QTOF-MS potwierdzają obecność produktu demetylacji w cząsteczce bisakrydyny [dane nieopublikowane]. Tylko w przypadku związków C-2028 i C-2041 inkubowanych z P4503A4 otrzymano dodatkowy produkt o zaproponowanej strukturze monomeru (M4). Należy jednak dodać, że intensywność tych pików była bardzo niska. Tak jak wspomniano wcześniej wynika to prawdopodobnie z sorbowania się metabolitów na białkach obecnych w frakcji enzymatycznej.

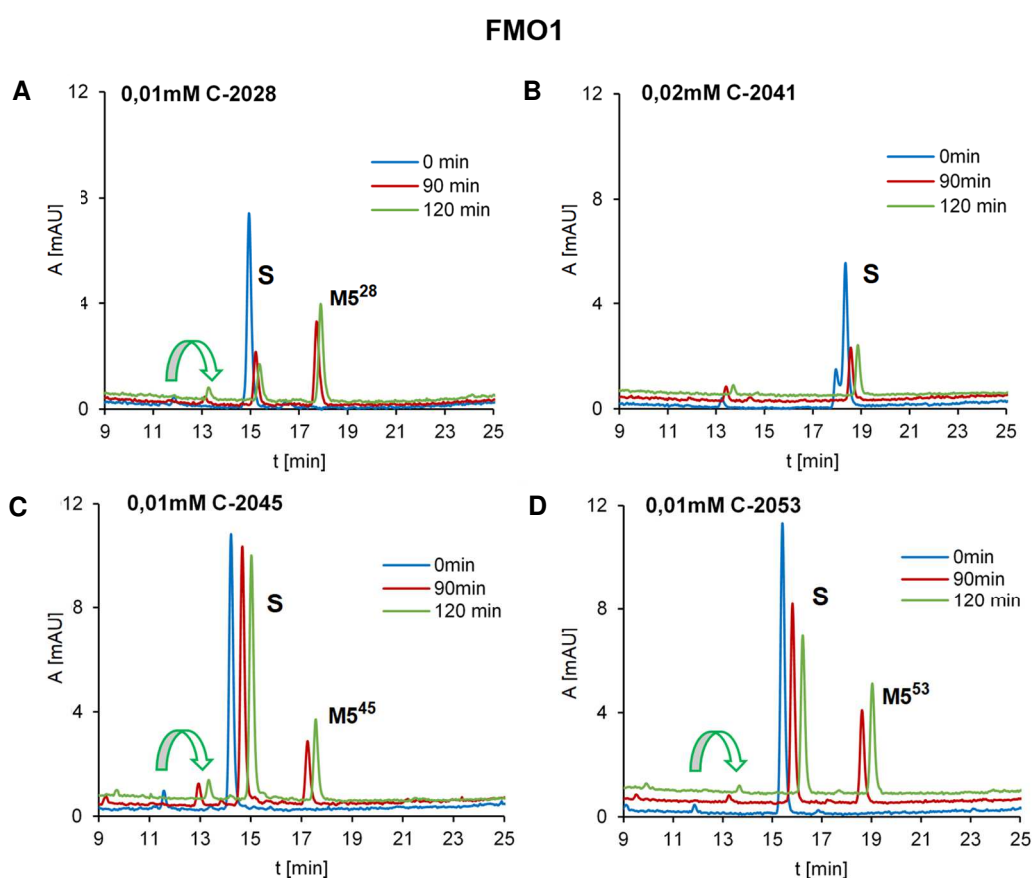
IV.5.2. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów monooksygenaz flawinowych, FMO

Monooksygenazy flawinowe należą do innej, lecz również ważnej grupy enzymów biorących udział w utlenianiu leków (I faza metabolizmu). Przez długi czas niesłusznie sądzono, iż wkład FMO w metabolizm leków jest incydentalny, a oznaczanie zakresu substratu izoenzymów FMO jest zbędne wobec udziału cytochromu P450. Substratami monooksygenaz flawinowych są przede wszystkim związki o właściwościach nukleofilowych, takie jak aminy i tiole. U ludzi najważniejsze wydają się być izoenzymy FMO1, obecny w nerkach i wątrobie płodowej (nie jest spotykany w wątrobie osób dorosłych) oraz indukowany zaraz po urodzeniu FMO3, którego najwyższe stężenie występuje w wątrobie osobników dorosłych [Krueger i in. 2005]. Wykazano również w naszym zespole, że FMO1, jak i FMO3 bierze udział w metabolizmie związków o symbolu C-1311 i C1305, monomerycznych imidazo- i trazoloakrydonu [Potęga i in. 2011, Fedejko-Kap i in. 2011b]. Ponadto ludzki FMO5 jest zasadniczo nieaktywny wobec związków nukleofilowych. Jednakże bierze on udział w metabolizmie leku z grupy niesterydowych leków przeciwzapalnych – nabumetonu, pentoksyfiliny o właściwościach przeciwzakrzepowych [Fiorentini i in. 2017] oraz aktywnych składników farmaceutycznych m. in. związku przeciwnowotworowego E7016 i przeciwbakteryjnego MRX-1 [Lai i in. 2011, Meng i in. 2015]. Wobec powyższego, kolejnym etapem prowadzonych badań było sprawdzenie, czy badane

pochodne bisakrydyny ulegają przemianom metabolicznym wobec rekombinantowych izoenzymów FMO1, FMO3 i FMO5.

IV.5.2.1. FMO1

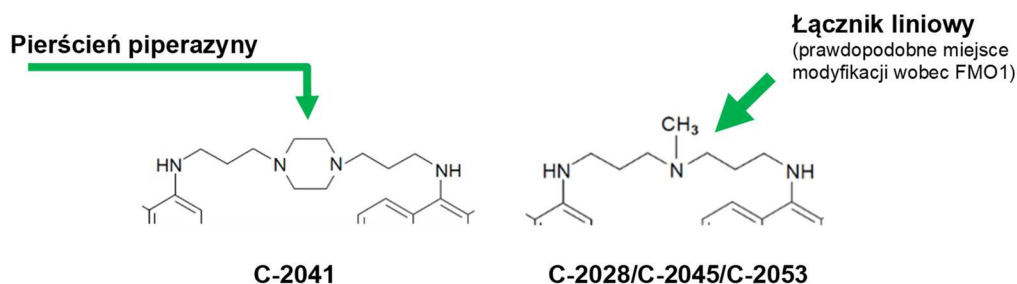
W ramach tego etapu badań sporządzono mieszaniny reakcyjne zawierające związek C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053 o stężeniu 0,01 lub 0,02 mM oraz rekombinantowe ludzkie izoenzymy FMO1 w buforze HEPES o pH ok. 8,5. Analizy RP-HPLC badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono zarówno przed jak i po 90 oraz 120 minutowej inkubacji w 37°C. Otrzymane chromatogramy zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.19.).



Rys.IV.19. Przemiany metaboliczne 0,01mM/0,02 mM A - C-2028, B – C-2041, C - C-2045, D - C-2053 wobec FMO1 w obecności NADPH (0,3 mM) po 0, 90 i 120 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Waters). Strzałką zieloną zaznaczono przemianę produktu hydrolizy Z1 w N-tlenek, Z3.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że trzy związki C-2028, C-2045 i C-2053 (posiadające liniowy, aminoalkilowy łącznik) metabolizują wobec FMO1, dając jeden produkt (M5) o dużej intensywności. W miarę wydłużania czasu inkubacji stężenie metabolitu rosło, przy jednoczesnym spadku stężenia substratu. Widmo UV-vis związku M5, jak i macierzystej bisakrydyny jest takie samo, zatem wnioskuję, iż modyfikacja nie zachodzi w chromoforze, lecz w łańcuchu bocznym (łączniku). Ponadto wobec FMO1 nie metabolizuje związek o symbolu C-2041, posiadający w łączniku dodatkowy pierścień piperazyny, ta różnica pozwala przypuszczać,

iz modyfikacja zachodzi na III-rzędowej aminie łańcucha łączącego (Rys.IV.20). Powstały produkt (M5) może być wynikiem przyłączenia atomu tlenu do cząsteczki związku, w wyniku czego powstaje N-tlenek (jak to miało miejsce w przypadku monomerów C-1311 i C1305) [Potęga 2011, Fedejko 2011b] lub zachodzić może N-demetylacja, jak w przypadku metabolizmu z udziałem P450. W celu weryfikacji, która z opcji jest prawdziwa, niezbędne było przeprowadzenie analizy HPLC-ESI-MS.

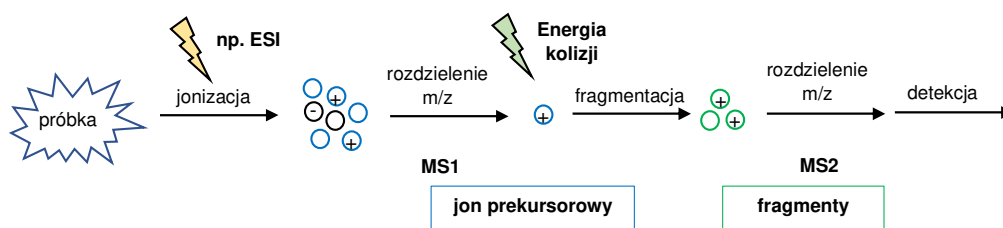


Rys.IV.20. Proponowane miejsce metabolizmu wobec izoenzymu FMO1 bisakrydyn zawierających w swojej strukturze liniowy, aminoalkilowy łącznik.

FMO1 spośród badanych monooksygenaz flawinowych charakteryzuje się najszerszym zakresem substratowym. Ponadto ekspresja FMO1 w wątrobie człowieka zostaje wyciszona w momencie narodzin, a więc i wkład tego enzymu w metabolizm leków u człowieka dorosłego jest ograniczony do tkanek poza wątrobą np. nerek [Phillips i in. 2008]. Ze względu na otrzymanie zbyt niskiej intensywności pików dla 0,01mM C-2041 (poziom szumów) przeprowadzono dla tego związku analizę w wyższym stężeniu tj. 0,02mM. Działanie to miało na celu uniknięcie sytuacji, w której zbyt niskie stężenie związku w roztworze uniemożliwiłoby jego kontakt z enzymem. Zatem na podstawie otrzymanych wyników wykluczono powstawanie metabolitu pochodzącego od C-2041 wobec FMO1, zarówno po 90 jak i 120 min nadal obserwuje się dość intensywny pik od substratu, natomiast brak sygnałów pochodzących od nowych produktów. Natomiast obserwowany spadek intensywności pików substratu po czasie inkubacji może wynikać z faktu, iż C-2041 odznacza się najniższą rozpuszczalnością spośród badanych bisakrydyn. Inkubacja w buforze HEPES ok. pH 8,5 (optymalnym środowisku działania FMO), przy tak długich czasach inkubacji powodować może wypadanie związku z roztworu w formie osadu. Należy również wziąć pod uwagę zaobserwowaną wcześniej tendencję, bisakrydyn do sorbowania lub wręcz wiązania się z białkami enzymatycznymi.

IV.5.2.2. Identyfikacja metabolitów otrzymanych wobec FMO1

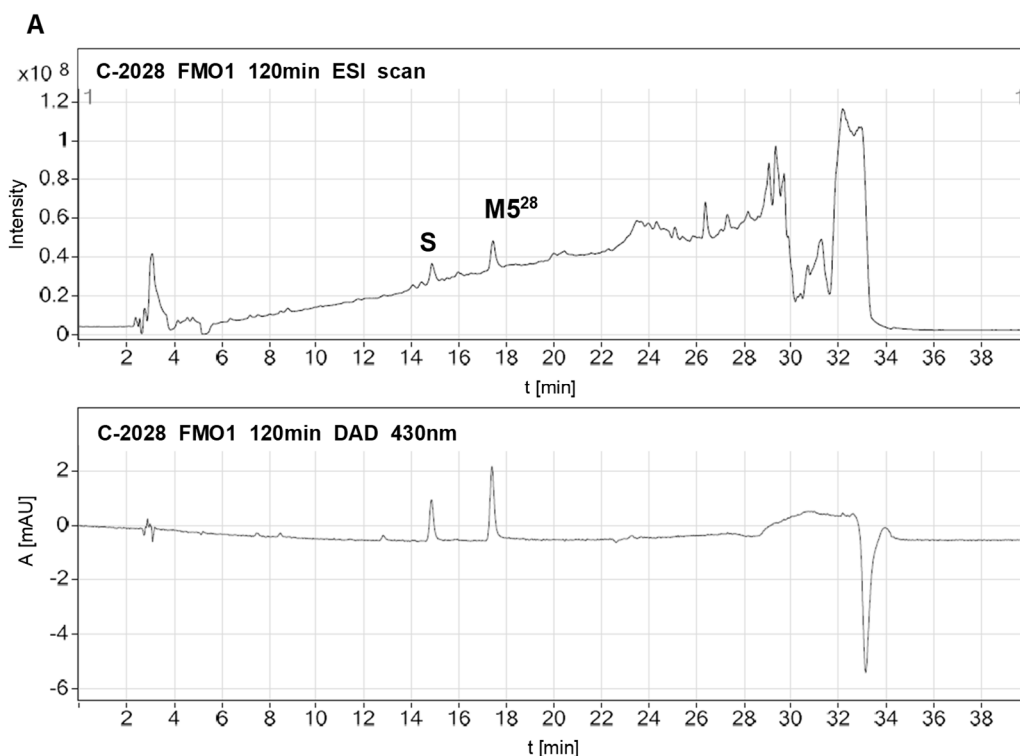
W celu identyfikacji otrzymanych dla trzech związków (C-2028, C-2045 i C2053) metabolitów (M5) wobec rekombinantowych enzymów FMO1 przeprowadzono analizę HPLC-ESI-MS w trybie scan, a następnie HPLC-MS/MS w trybie „scan - product ions” w wyniku której następuje rozbitcie wybranego jonu prekursorowego na fragmenty - jony produktu (Rys.IV.21). Otrzymane fragmenty pozwoliły na ujawnienie aspektów struktury chemicznej jonów prekursorowych, czyli metabolitów M5 badanych bisakrydyn.

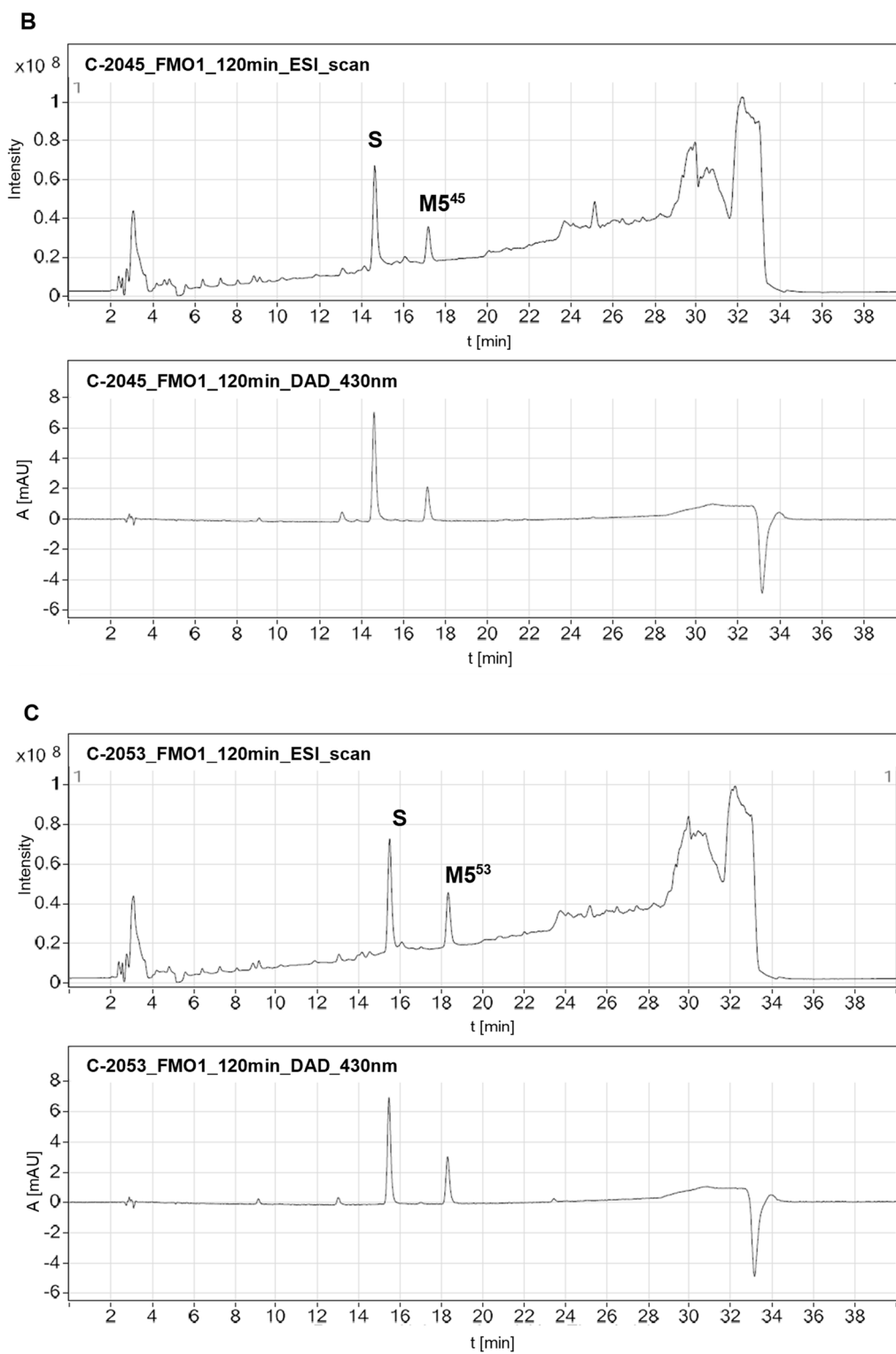


Rys.IV.21. Tandemowa spektrometria mas (MS/MS) [na podstawie <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>, dostęp 2020-07-07]

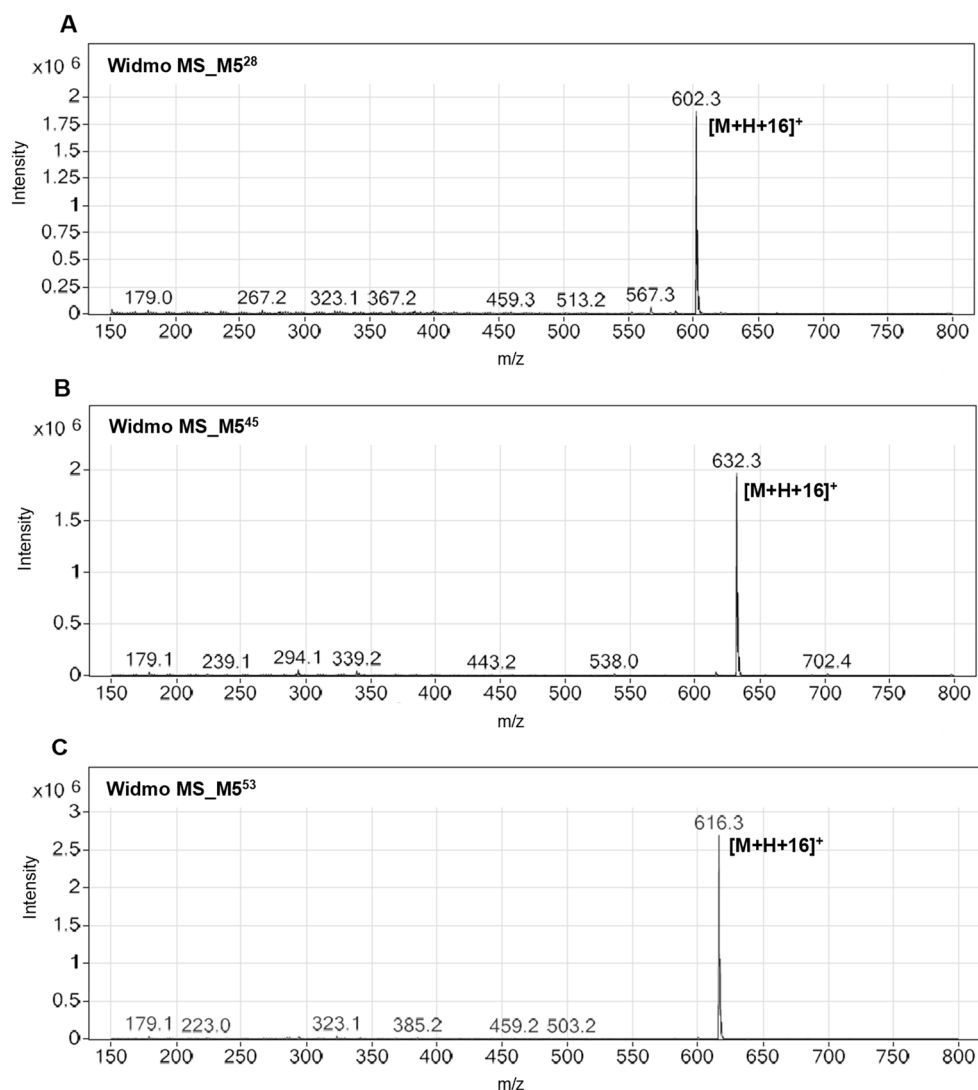
- Analiza HPLC-ESI-MS

Próbki zawierające 0,02mM roztwór pochodnej bisakrydyny (C-2028, C-2045 lub C-2053), które następnie inkubowano w 37°C przez 0 i 2 godziny wobec rekombinantowego izoenzymu FMO1 i kofaktora NADPH poddano analizie HPLC-ESI-MS w trybie scan. Jonizację przeprowadzono w trybie tworzenia jonów dodatnich, co umożliwiło obserwację pozornych jonów molekularnych $[M+H]^+$. Jednocześnie podczas analizy prowadzona była detekcja typu DAD przy długości fali 380 i 430 nm. Doświadczenie powtórzono w dwóch niezależnych eksperymentach. Poniżej (Rys. IV.22a) dla każdej pochodnej bisakrydyny zamieszczono zestaw chromatogramów DAD (430nm) i ESI-MS (TIC, total ion current) otrzymanych po 2 godzinnej inkubacji związków. Na chromatogramach zaznaczono piki: substratu (S) i metabolitu otrzymanego wobec FMO1 (M5). Dla wszystkich produktów M5 przedstawiono również widma masowe (Rys.IV.22b.). Wartości m/z dla metabolitów M5 wynoszą odpowiednio: 602.3 ($M5^{28}$), 632.3 ($M5^{45}$) i 616.3 ($M5^{53}$), co odpowiada przyłączeniu atomu tlenu do cząsteczki bisakrydyny (Tabela IV.4).





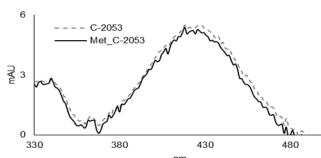
Rys.IV.22a. Wynik analizy HPLC-ESI-MS dla 0,02mM bisakrydyn A – C-2028, B – C-2045 i C – C-2053 inkubowanych przez 2 godziny wobec FMO1 (0,5 mg/ml) i kofaktora NADPH (0,3mM) w 37°C. Jonizacja ESI w trybie tworzenia jonów dodatnich, analiza DAD prowadzona przy 430 nm (Agilent).



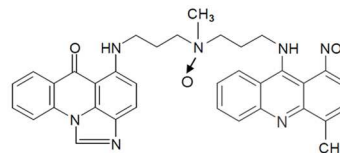
Rys.IV.22b. Widma masowe ESI-MS metabolitów M5 związków A – C-2028, B – C-2045 i C – C-2053 otrzymanych wobec FMO1. Jonizacja ESI w trybie tworzenia jonów dodatnich (Agilent).

TabelaIV.4. Zestawienie jonów masowych oraz widm absorpcyjnych metabolitów M5 badanych bisakrydyn wraz z proponowaną strukturą. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC-UV-vis (Waters) i HPLC-ESI-MS (Agilent).

Związek	Widmo UV-vis	ESI-MS m/z	Proponowana struktura
M5²⁸		602.3 [M+H+16] ⁺	
M5⁴⁵		632.3 [M+H+16] ⁺	

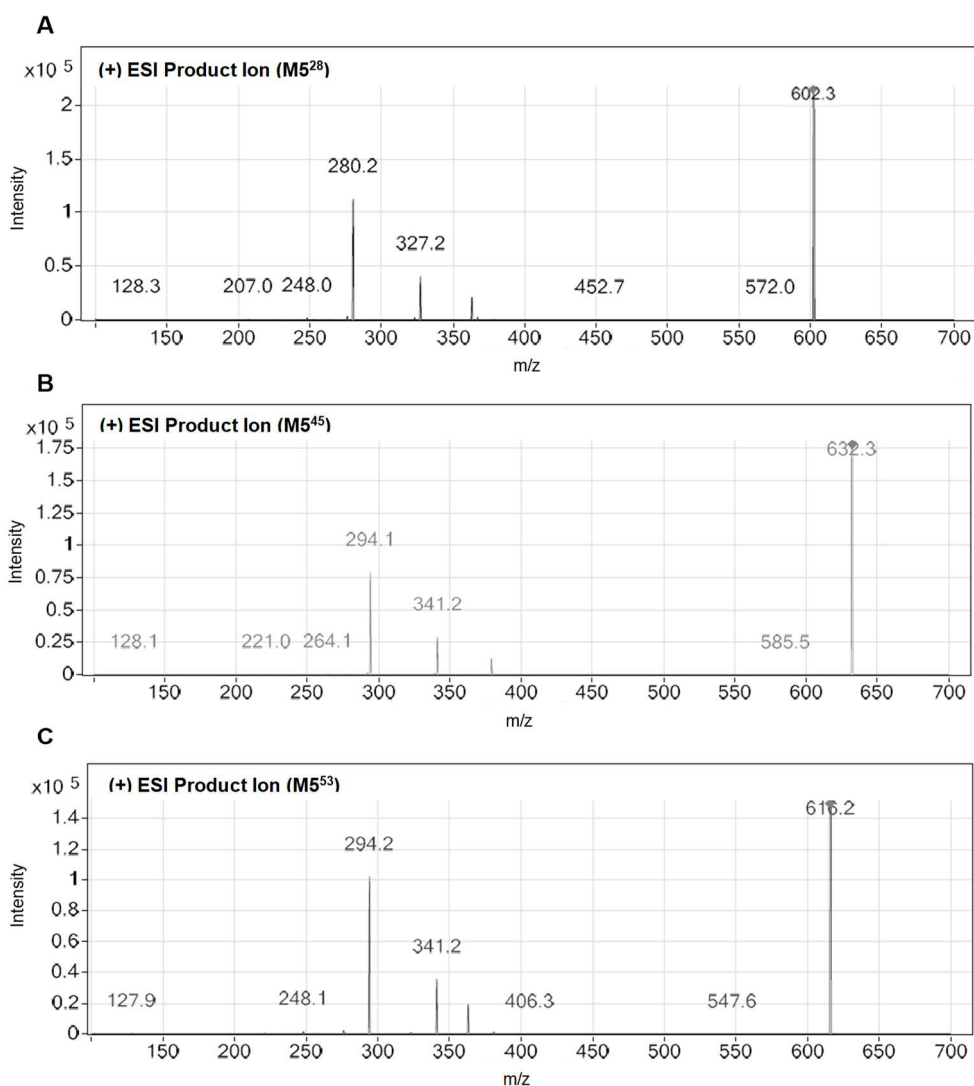
M5⁵³

616.3
[M+H+16]⁺



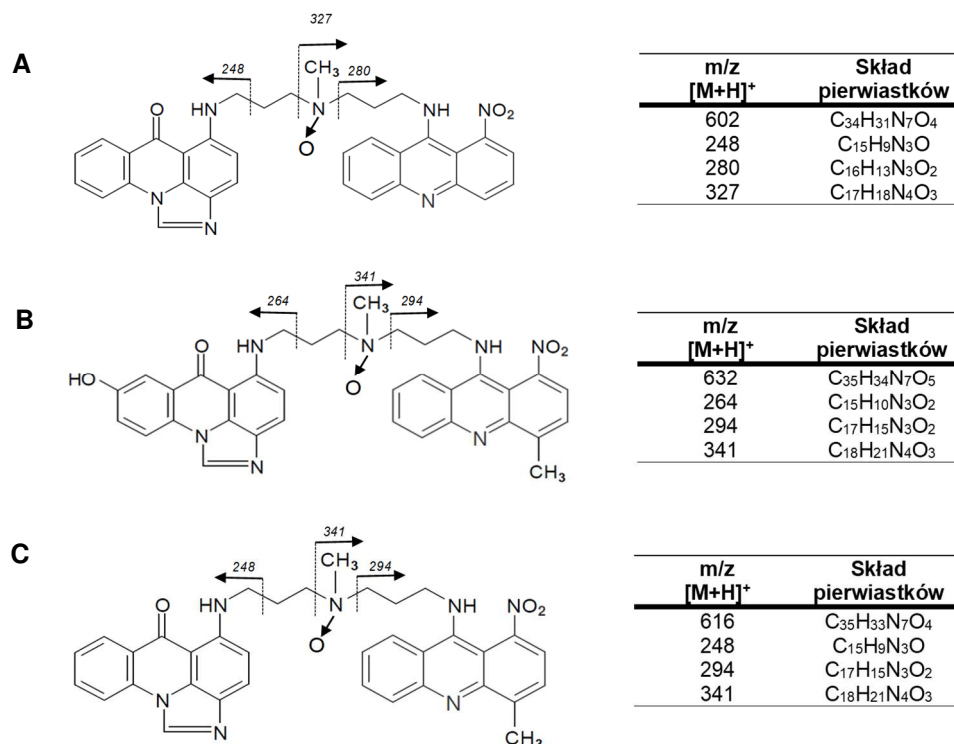
- Analiza LC-MS/MS – product ions

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie analizy HPLC-ESI-MS/MS tych samych próbek (*Analiza HPLC-ESI-MS/MS*) w trybie „product ion” dla otrzymanych wcześniej metabolitów M5. Dla każdej analizy, jako jon prekursorowy wybrano wartość m/z odpowiadającą jonowi masowemu metabolitu M5, odpowiednio 602 (M5²⁸), 632 (M5⁴⁵) i 616 (M5⁵³). Jonizację przeprowadzono w trybie tworzenia jonów dodatnich, a fragmentację przy 135 V (napięcie fragmentatora) i 10eV (energia kolizji). Wyniki otrzymanych analiz przedstawiono na Rys.IV.23.



Rys.IV.23. Widma fragmentacyjne dla metabolitów M5 związków A – C-2028, B – C-2045 i C – C-2053 otrzymanych wobec FMO1. Analiza HPLC-ESI-MS/MS 0,02mM bisakrydyn inkubowanych przez 2 godziny wobec FMO1 (0,5 mg/ml) i kofaktora NADPH (0,3mM) w 37°C. Jonizacja ESI w trybie tworzenia jonów dodatnich; napięcie fragmentatora - 135V, energia kolizji – 10eV (Agilent).

Analizując otrzymane widma fragmentacyjne można stwierdzić, że wszystkie wybrane jony prekursorowe pochodzące od metabolitów M5 rozpadają się do trzech charakterystycznych jonów masowych, w tym jednego o masie świadczącej o przyłączeniu atomu tlenu w wyniku inkubacji związków z FMO1. Na Rys.IV.24 przedstawiono proponowane struktury metabolitów M5²⁸, M5⁴⁵ i M5⁵³ wraz z ich fragmentacją.

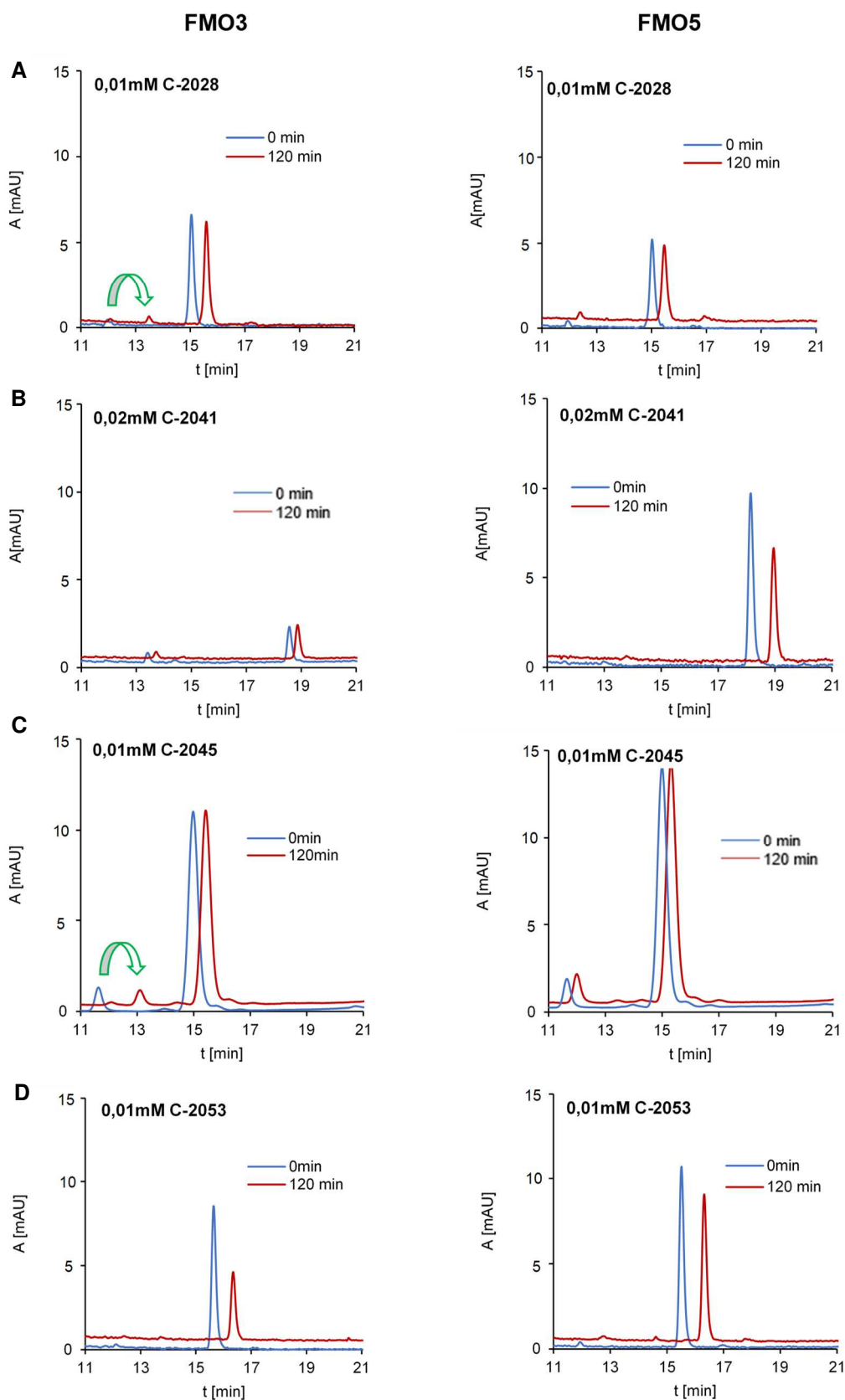


Rys.IV.24. Struktury produktów otrzymanych podczas inkubacji A – C-2028, B – C-2045 i C – C-2053 z FMO1 (M5) wraz z fragmentacją.

Podsumowując, zarówno analiza HPLC-ESI-MS, jak i otrzymane w wyniku analizy HPLC-ESI-MS/MS fragmenty poszczególnych metabolitów M5 potwierdzają, że w wyniku inkubacji związków C-2028, C-2045 i C-2053 z ludzkimi rekombinantowymi izoenzymami FMO1 otrzymano metabolity w wyniku przyłączenia atomu tlenu do cząsteczki substratu. Przyjęto, iż otrzymane metabolity (M5) są N-tlenkami pochodnych bisakrydiny. Należy również podkreślić, że otrzymane metabolity zachowały strukturę dimeryczną.

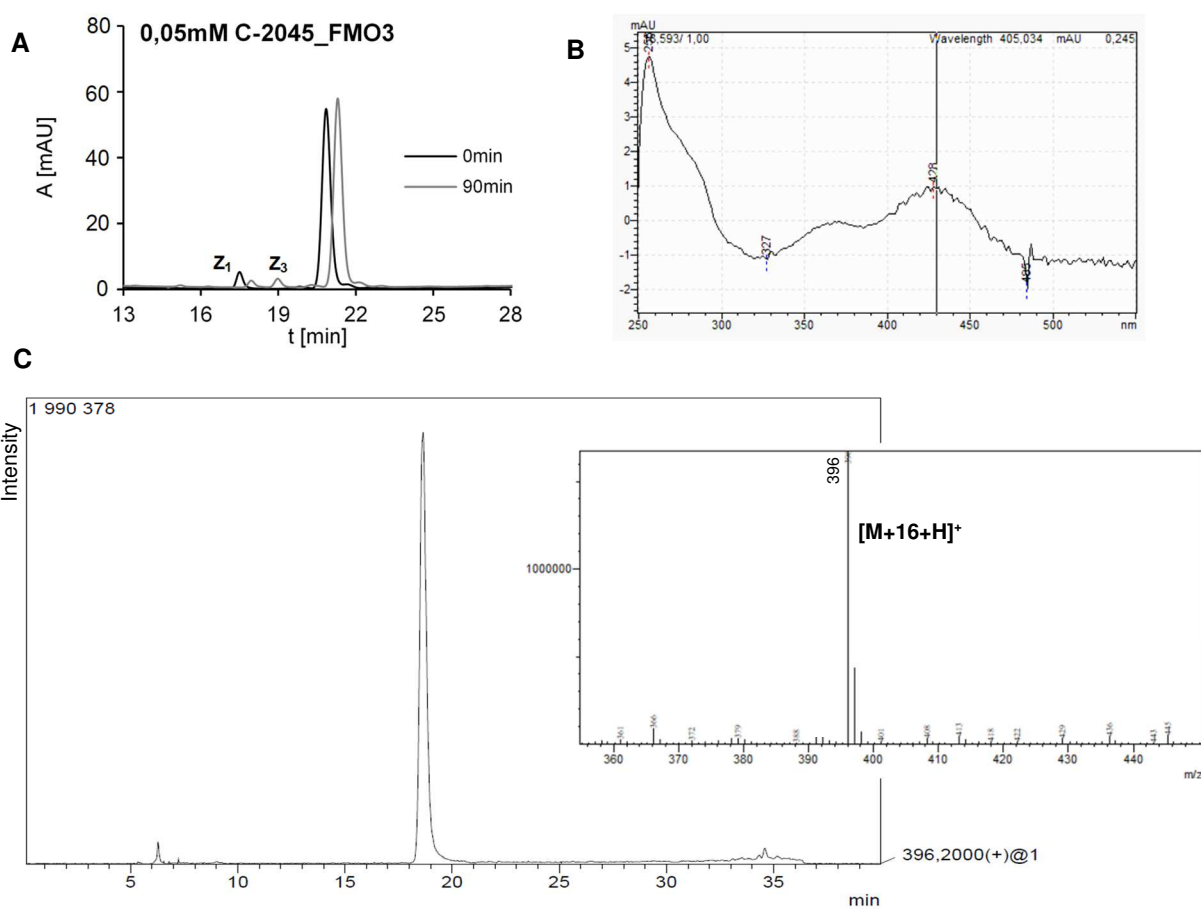
IV.5.2.3. FMO3 i FMO5

Kolejnym etapem badań metabolizmu związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec monooksygenaz flawinowych było poznanie reakcji wobec izoenzymów FMO3 i FMO5. W tym celu sporządzono mieszaniny reakcyjne według Tabeli III.8 (III.3.5.2. *Badanie metabolizmu wobec rekombinantowych FMO1, FMO3 i FMO5*). Ze względu na znaczący spadek intensywności piku pochodzącego od C-2041 już na starcie ($t=0$), również na tym etapie dla C-2041 zastosowano stężenie 0,02mM zamiast 0,01 mM. Analizy RP-HPLC badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono zarówno przed jak i po 120 minutowej inkubacji w 37°C. Otrzymane chromatogramy zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.25.).



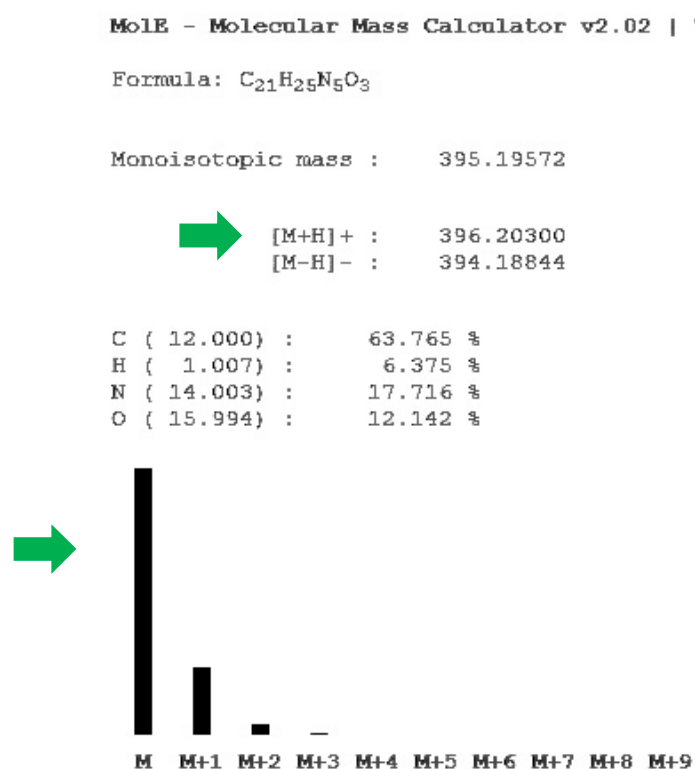
Rys.IV.25. Przemiany metaboliczne 0,01mM/0,02 mM A - C-2028, B – C-2041, C - C-2045, D - C-2053 wobec FMO3 i FMO5 w obecności NADPH (0,3 mM) po 0, 120 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (A,B,D – Waters, C - Shimadzu). Zieloną strzałką oznaczono przemianę produktu hydrolyzy Z₁ w N-tlenek, Z₃.

Jak widać na załączonych chromatogramach w wyniku inkubacji badanych związków z izoenzymami FMO poza FMO1, tj. FMO3 i FMO5 produktu M5 (otrzymany wobec FMO1) nie obserwowano. Jednakże pomimo braku produktów po inkubacji wobec FMO3 i FMO5 w niektórych wypadkach intensywność pików pochodzącego od pochodnej bisakrydyny po inkubacji w 37°C była niższa. Może, podobnie jak przedstawiano wcześniej, wynikać z faktu, iż badane związki są podatne na sorbowanie lub wręcz wiązanie z białkami obecnymi w mieszaninie reakcyjnej – osady po odwirowaniu próbek miały żółte zabarwienie. Zwrócił uwagę również fakt, iż w miarę wydłużania czasu inkubacji do 120 min nie obserwuje się, aby badane związki ulegały dalszej hydrolizie. Głębsza analiza otrzymanych chromatogramów (Rys.IV.19. i Rys.IV.25) wykazała, że zarówno wobec FMO1, jak i FMO3 dla trzech badanych związków (C-2028, C-2045 i C-2053) otrzymano dodatkowy produkt, przy jednoczesnym zaniku pików pochodzącego od opisywanego wcześniej (IV.2.3. *Identyfikacja produktów rozpadu badanych bisakrydyn*), produktu hydrolizy Z₁. Na chromatogramach dla FMO1 i FMO3 zmianę tę zaznaczono zieloną strzałką. Natomiast wobec FMO5 procesu tego nie zaobserwowano. Przeprowadzona dodatkowa analiza LC-MS wykazała, iż otrzymany nowy produkt (Z₃) nie jest wynikiem bezpośredniej przemiany bisakrydyny, lecz monomeru imidazoakrydonu, produktu hydrolizy Z₁. Przykładowy wynik analizy LC/MS dla związku C-2045 zamieszczono poniżej (Rys.IV.26.).



Rys.IV.26. Analiza LC/MS 0,05 mM C-2045 wobec FMO3 w obecności NADPH (0,3 mM) po 0, 90 min. inkubacji w 37°C. A - analiza prowadzona metodą RP-HPLC (Shimadzu) przy 430 nm, przepływ 0,5 ml/min. B – widmo UV-vis produktu Z₃, C - chromatogram MS, m/z = 396.15 wraz z widmem masowym produktu Z₃. Analiza prowadzona HPLC-ESI-MS (Shimadzu).

Powyższy rysunek ilustruje, że w wyniku analizy LC/MS dla związku C-2045 po 90 minutach inkubacji oprócz piku pochodzącego od bisakrydyny otrzymano również dwa piki ($t_R = \text{ok.}18 \text{ i } 19 \text{ min}$) pochodzące odpowiednio od Z_1 o jonie masowym $m/z = 380.15$ [$379 (Z_1) + 1(H^+)$] oraz Z_3 o $m/z = 396.15$ [$395 (Z_3) + 1(H^+)$]. Ponadto dla produktu Z_3 otrzymano charakterystyczne widmo UV-vis, sugerujące, iż produkt ten podobnie jak Z_1 jest monomeryczną pochodną imidazoakrydonu (Rys.IV.26b.). Analizując zgromadzone dane oraz fakt, że wraz z wzrostem stężenia produktu Z_3 ubywa nie związek C-2045, lecz produktu Z_1 (Rys.IV.26a) uznano, iż przemianie wobec FMO3 ulega monomer Z_1 , produkt hydrolizy bisakrydyny do monomerycznej pochodnej. W dodatku na podstawie analizy jonów masowych pochodzących od Z_1 i Z_3 jak i analizy wcześniejszych badań prowadzonych nad monomerami imidazo [Potęga i in. 2011, Fedejko-Kap i in. 2011b], przyjęto iż otrzymany metabolit (Z_3) jest prawdopodobnie N-tlenkiem powstałym w wyniku przyłączenia atomu tlenu do cząsteczki Z_1 , czyli m/z dla $Z_3 = 396.15$ [$380.15 (Z_1) + 16 (O?) + 1(H^+)$]. Aby potwierdzić tą tezę zastosowano program „MoIE Molecular Mass Calculator v2.02” i wyznaczono jon masowy dla sugerowanego N-tlenku o wzorze $C_{21}H_{25}N_5O_3$ (Rys.IV.27.). Jak widać na załączonym rysunku zarówno wygenerowany jon masowy $[M+H]^+$ jak i widmo masowe pokrywają się z tymi otrzymanymi podczas analizy LC/MS (Rys. IV.26c.). Wykazano więc, iż powstawanie N-tlenkowej pochodnej związku Z_1 wobec FMO3 jest bardzo prawdopodobne.



Rys.IV.27. Wynik analizy dla cząsteczki $C_{21}H_{25}N_5O_3$ (proponowany wzór dla Z_3) w programie „MoIE Molecular Mass Calculator v2.02” [<https://mods.rna.albany.edu/masspec/MoIE>, dostęp dnia: 03.06.2020]

IV.5.3. Metabolizm pochodnych bisakrydyny C-2028, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów UDP-glukuronylotransferaz, UGT

Kolejnym etapem badań nad metabolizmem pochodnych bisakrydyny było sprawdzenie, czy związki C-2028, C2045 i C2053 ulegają reakcji glukuronidacji, a więc czy następuje ich biochemiczna modyfikacja wobec wybranych enzymów II fazy biotransformacji UDP-glukuronylotransferaz, UGT. Zbadanie podatności potencjalnego leku na przemiany metaboliczne wobec enzymów UGT jest niezwykle istotne. Jest to jeden z elementów badań przedklinicznych niezbędnych do oceny m.in. efektywności detoksykacji, jak i dezaktywacji potencjalnego leku, a także związanego z tym ryzyka wystąpienia oporności na stosowaną terapię. Enzymy UGT katalizują ok. 35% wszystkich reakcji II fazy metabolizmu, a największy udział przypada izoenzymom UGT2B7, a następnie UGT1A4 i UGT1A1 [Williams i in. 2004]. W wątrobie przedstawiciele podrodziny UGT2B występują w wyższych stężeniach niż izoenzymy UGT1A, a główną izoformą wątrobową jest UGT2B4. Tkanka żołądka charakteryzuje się obecnością przede wszystkim izoenzymów: UGT2B15, 2B17 i 1A6, a tkanka nerek - UGT1A9, 2B7 i 1A6 [Ohno i in. 2009, Court i in. 2012]. Natomiast izoenzym UGT1A9 posiada zdolność sprzęgania z glukuronianem zarówno substratów z nukleofilowym atomem tlenu, azotu a nawet węgla. Niedawno wykazano, że UGT1A10 jest izoenzymem pozawątrobowym występującym głównie w tkankach przewodu pokarmowego [Yang i in. 2017]. Odkrycie to jest istotne z punktu widzenia chemoterapii, gdyż jelitowe UGT mogą przyczynić się do tzw. efektu pierwszego przejścia polegającego na ograniczeniu biodostępności leku podanego doustnie. W związku z tym tylko część podanej dawki leku dociera wraz z krążeniem wrotnym do wątroby.

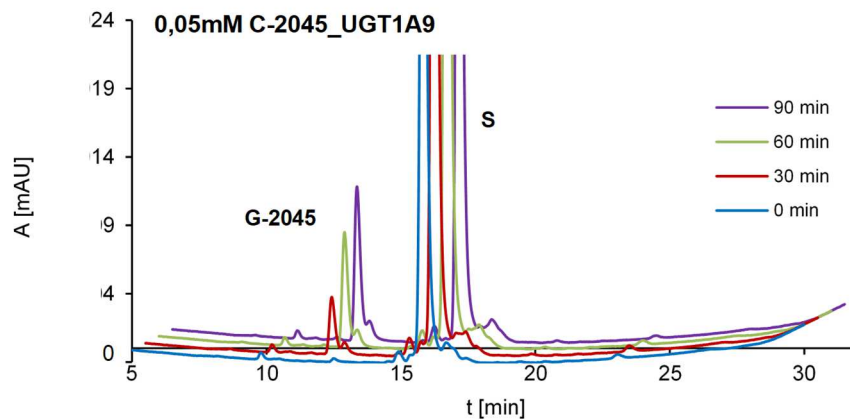
Wobec powyższego w niniejszej pracy przeprowadzono badania przesiewowe podatności na metabolizm trzech badanych związków C-2028, C-2045 i C-2053 z wybranymi izoenzymami rekombinantowymi UGT tj. UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A10 i UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 oraz UGT2B17. Związki inkubowano z odpowiednią frakcją enzymatyczną w obecności kofaktora UDPGA przez 0, 60, 90 i 120 min. Analizy RP-HPLC i ESI MS badanych mieszanin reakcyjnych przeprowadzono przed i po każdej inkubacji. Wyniki poszczególnych analiz zestawiono w Tabeli IV.5.

Tabela IV.5. Przemiany metaboliczne badanych bisakrydyn wobec wybranych izoenzymów UGT.

	UGT 1A1	UGT 1A4	UGT 1A6	UGT 1A9	UGT 1A10	UGT 2B4	UGT 2B7	UGT 2B15	UGT 2B17
C-2028	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2045	+	-	+/-	+	+	-	-	-	-
C-2053	-	-	-	-	-	-	-	-	-

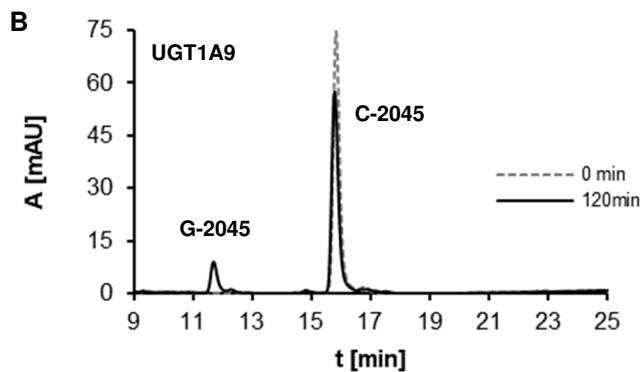
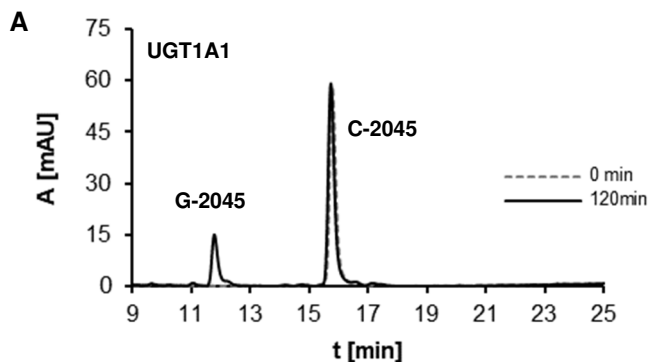
Analizując powyższe dane (Tabela IV.5), wskazano, iż tylko związek C-2045 (analog z grupą hydroksylową) ulega przemianom metabolicznym wobec izoenzymów UGT, a dokładnie

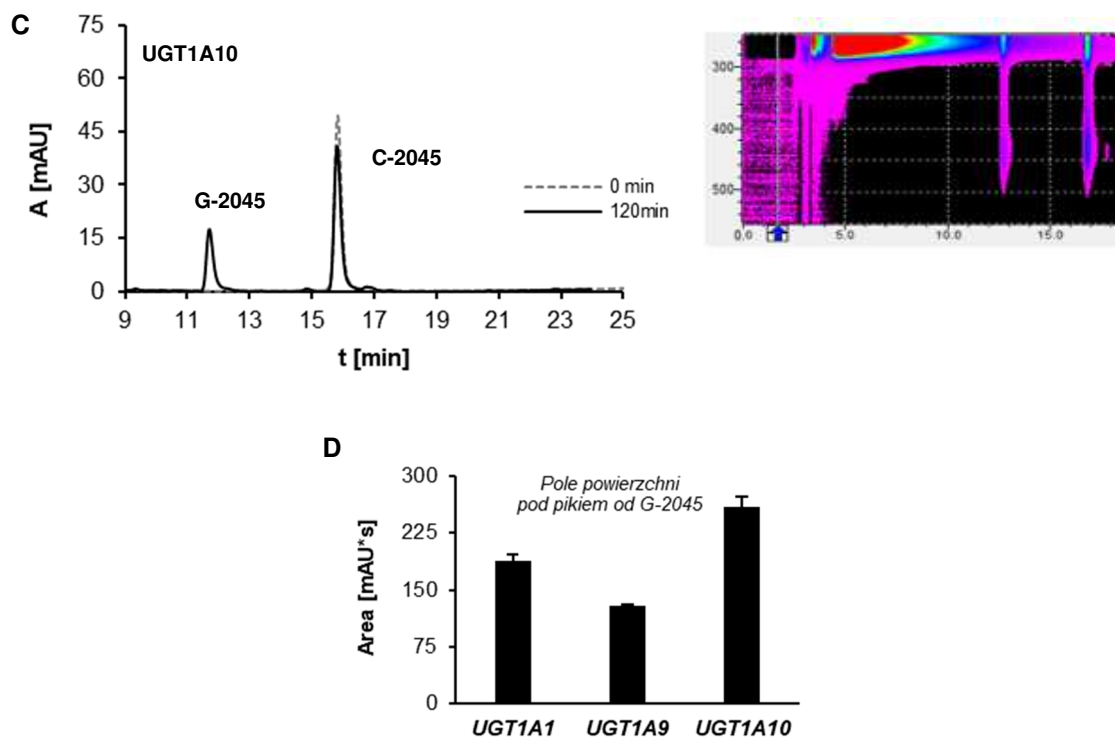
wobec UGT1A1, UGT1A9 i UGT1A10 oraz w nieznacznym stopniu UGT1A6. Wykazano również, że wraz z wydłużeniem czasu inkubacji następował spadek intensywności piku pochodzącego od związku macierzystego, a ilość obserwowanego produktu reakcji enzymatycznej (G-2045) rosła (Rys.IV.28.).



Rys.IV.28. Przemiany metaboliczne 0,05mM C-2045 wobec UGT1A9 w obecności UDPGA (5 mM) po 0, 30, 60 i 90 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu).

Co ciekawe, najwyższą aktywność wobec związku C-2045 wykazywał izoenzym UGT1A10, którego ekspresja ma miejsce głównie w jelitach, a nie w komórkach wątroby (Rys.IV.29.). Ponadto, żaden ze związków nie był metabolizowany przez izoenzymy z rodziny UGT2B.

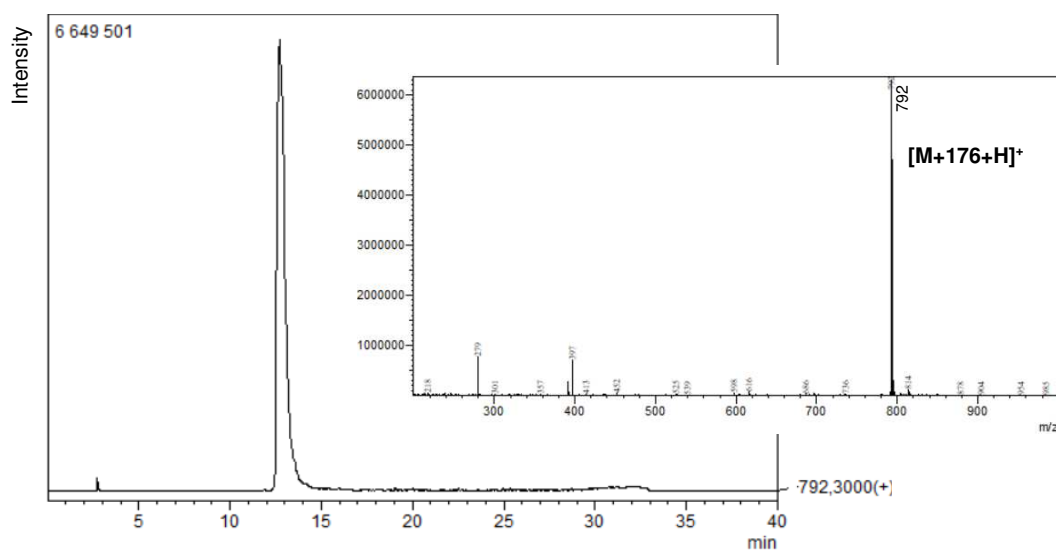




Rys.IV.29 Przemiany metaboliczne 0,05mM C-2045 wobec A - UGT1A1, B - UGT1A9, C - UGT1A10 w obecności UDPGA (5 mM) po 0, 120 min. inkubacji w 37°C. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC i ESI-MS (Shimadzu) i D – porównanie pól powierzchni (stężenia glukuronidów) pod pikiem pochodzącym od G-2045 otrzymanych podczas analiz A, B, C.

IV.5.3.1. Identyfikacja metabolitu powstającego podczas inkubacji C-2045 z UGT1A1, 1A9 i 1A10

Na podstawie analizy jonów masowych pochodzących od produktu G-2045 (Rys.IV.30) i związku macierzystego (C-2045, $m/z = 616.30$) przyjęto, iż otrzymany metabolit jest wynikiem sprzężenia cząsteczki związku C-2045 z resztą kwasu glukuronowego [M+176+H]⁺.



Rys.IV.30. Analiza LC/MS 0,05 mM C-2045 wobec UGT1A10 w obecności UDPGA (5 mM) po 0, 120 min. inkubacji w 37°C. Chromatogram MS, $m/z = 792.30$ wraz z widmem masowym produktu G-2045. Analiza prowadzona HPLC-ESI-MS (Shimadzu).

Wyniki badań, w których związki C-2028 i C-2053 (analogi pozbawione grupy hydroksylowej) nie były metabolizowane wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów UGT wskazują, iż w wypadku C-2045 musi to być pochodna O-glukuronidu na atomie tlenu pochodzącym z grupy -OH. Podczas analizy chromatograficznej oprócz jonu masowego zebrano również widmo UV-vis O-glukuronidu związku C-2045. Otrzymane widmo absorpcyjne zestawiono z widmem UV-vis związku macierzystego (C-2045) i zamieszczono w Tabeli IV.6.

Tabela IV.6. Struktura O-glukuronidu związku C-2045 otrzymanego podczas inkubacji z UGT1A10. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

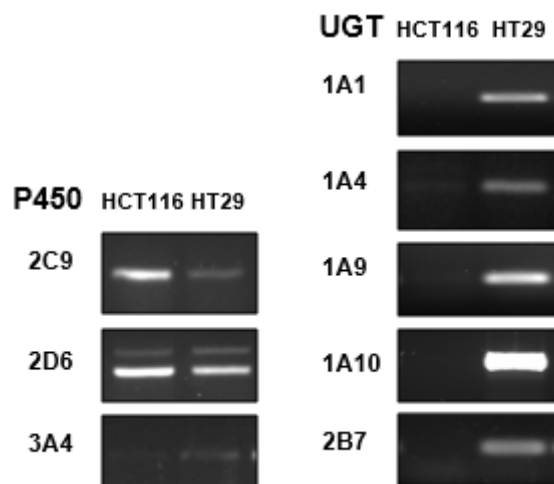
Związek	Widmo UV-vis	ESI-MS m/z	Proponowana struktura
G-2045		792.25 [M+H+176] ⁺	

Wykazano, że widmo UV-Vis O-glukuronidu C-2045 różni się od widma związku macierzystego. Wskazuje to na przyłączenie reszty kwasu glukuronowego do cząsteczki pochodnej C-2045 w miejscu ugrupowania hydroksylowego. Wobec powyższego, zaproponowano strukturę metabolitu powstającego w wyniku glukuronidacji (Tabela IV.6.).

IV.6. Metabolizm badanych bisakrydyn w komórkach nowotworowych

Przedstawione dotychczas badania nad enzymatycznymi transformacjami bisakrydyn wykazały, iż związki te posiadają wysoką zdolność do metabolizmu wobec enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura, jak i aktywowanych ludzkich mikrosomów. Jednakże okazały się zdecydowanie mniej podatne na przemiany wobec wybranych izoenzymów P450 3A4 i 2C19. Ponadto trzy związki tj. C-2028, C-2045 i C-2053 (analogi z liniowym aminoalkilowym łącznikiem) metabolizowały tylko wobec FMO1, izoenzymu który u osób dorosłych nie jest spotykany w wątrobie, lecz w nerkach. Warto również zauważyć, iż związek C-2045 (analog z grupą hydroksylową w pierścieniu imidazokrydonu) jako jedyny z przebadanych UA podlegał metabolizmowi z wybranymi izoenzymami UGT z podrodziny 1A. Kolejny etap badań nad metabolizmem pochodnych bisakrydiny zmierzał do poznania przemian tych związków w komórkach nowotworowych, które są ostatecznym celem ich działania. Kierunek tych badań uwzględniał dwa aspekty. Po pierwsze, porównano skład mieszanin uzyskanych po inkubacji ze związkiem komórek trzech różnych linii nowotworu jelita grubego różniących się ekspresją enzymów UGT. Uwzględniono następujące linie komórkowe: (i) HCT116, która naturalnie charakteryzuje się niskim poziomem ekspresji enzymów UGT, (ii) HCT116-1A10, która jest

transfekowana wektorem plazmidowym z sekwencją genu kodującego izoenzym UGT1A10, czyli wykazuje ekspresję izoenzymu UGT1A10 (aktywność enzymów UGT 3,74%) oraz (iii) HT-29, linii ludzkiego gruczolaka jelita grubego, wykazującej naturalną ekspresję izoenzymów UGT, w tym najwyższą dla izoenzymu UGT1A10 (53,74%). Z drugiej strony uwzględniono, że pochodne glukuronidowe leków lub innych ksenobiotyków są zwykle produktami detoksyfikacji, zatem mogą być wydalone poza komórkę. Dlatego po inkubacji komórek z badanym związkiem analizie poddawano nie tylko zawartość ekstraktu komórkowego, ale także zawartość pożywek po inkubacji z komórkami.



Rys.IV.31 Ekspresja wybranych enzymów metabolizujących z rodziny P450 i UGT w liniach komórkowych HCT116 i HT-29. Metoda: Reverse Transcript PCR, Sposób przedstawienia: elektroforeza w żelu agarozowym (1,5%, 40 min, 90V; próbka: 5 μ l) [Pawłowska i in. 2020]

Ekspresję wybranych enzymów metabolizujących w badanych liniach komórkowych przedstawiono na Rys.IV.31. W komórkach HCT116 i HT-29 ekspresja i aktywność izoenzymu P4503A4 jest nieznaczna [Pawłowska i in. 2020], dlatego też badania dla pochodnych bisakrydyn, które nie ulegały glukuronidacji (C-2028, C-2041 i C-2053) przeprowadzono w celu zbadania ich kinetyki wnikania z pożywki do wnętrza komórki nowotworowej, a także sprawdzenia czy związki te aby wykazać aktywność przeciwnowotworową wymagają biochemicznej aktywacji. Komórki nowotworowe traktowano stężeniem związku, które jest wielokrotnością określonego wcześniej EC_{50} .

IV.6.1. Metabolizm bisakrydyn C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w komórkach HCT116

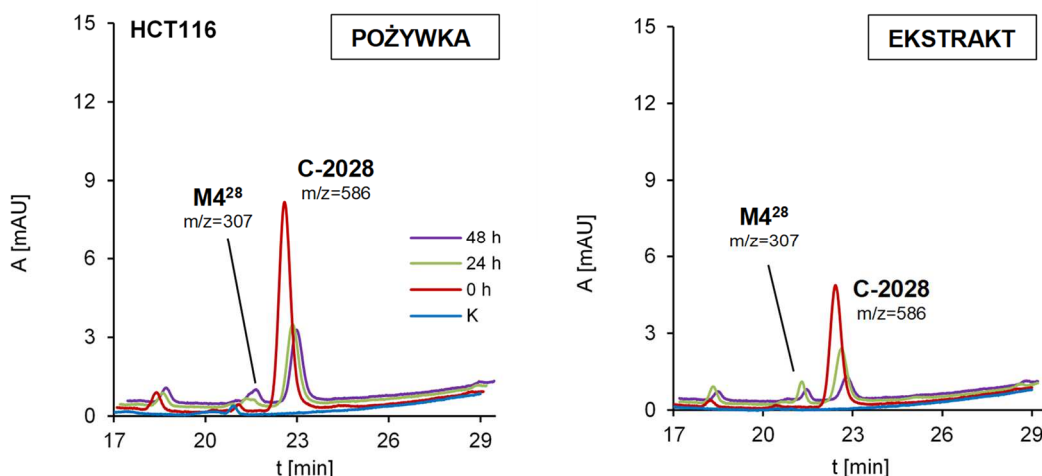
Prace nad metabolizmem bisakrydyn zachodzącym wobec enzymów obecnych w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego, HCT116 (o niskim poziomie ekspresji enzymów UGT) poprzedzono zapoznaniem się z wynikami badań dotyczącymi aktywności cytotoksycznej badanych związków wobec tych komórek. Badania te zostały przeprowadzone w naszym zespole w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Pilch. Ich wyniki wskazały na bardzo wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek HCT116, szczególnie wykazaną przez związek C-2028 (Tabela IV.7.).

Tabela IV.7 Parametry aktywności cytotoksycznej dla bisakrydyn wobec komórek nowotworowych HCT116 [Pilch i in. 2020, Paluszkiwicz i in. 2020]

Związek	EC ₅₀ dla HCT116, [μM]
C-2028	0,0104 ± 0,0007
C-2041	0,0083 ± 0,0018
C-2045	0,0590 ± 0,0083
C-2053	0,0481 ± 0,0139

IV.6.1.1. Metabolizm C-2028 w komórkach HCT116

Badania nad metabolizmem w komórkach nowotworowych HCT116 rozpoczęto od związku C-2028. Komórki traktowano związkiem o stężeniu 50 μM, a po określonym czasie inkubacji (0, 24, 48 godz.) przeprowadzono analizę RP-HPLC i ESI-MS składu zarówno ekstraktów komórkowych jak i pożywek zastosowanych do hodowli. Tak szeroka analiza losu metabolitów podyktowana była zamiarem weryfikacji przypuszczenia, że metabolity mogą, z jednej strony, podlegać akumulacji w komórkach ale mogą też być wydalone na zewnątrz komórek.



Rys.IV.32. Metabolizm związku C-2028 w komórkach nowotworowych HCT116. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek poodhodowlanych oraz ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 24 i 48 godz.; stężenie związku C-2028 na płytce – 50 μM, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

Analiza otrzymanych chromatogramów (Rys.IV.32.) wykazała, że w pożywce stężenie związku C-2028 maleje do stałego poziomu. Wnioskować zatem można, że C-2028 wnika do komórki. W ekstrakcie natomiast w miarę wydłużania czasu inkubacji stężenie C-2028 ciągle spada, czyli związek wyrzucany jest na zewnątrz komórki.

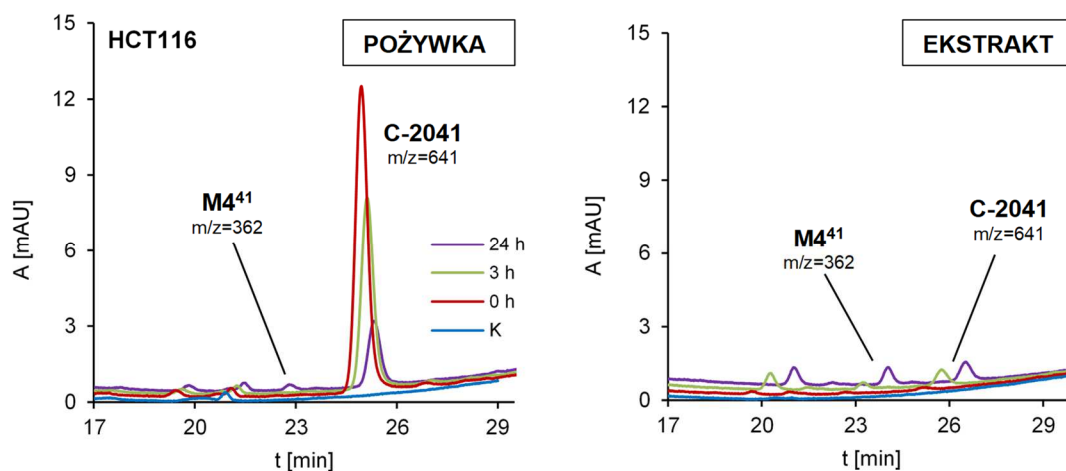
Zarówno w pożywce, jak i w ekstrakcie komórkowym obserwuje się metabolit M4. Metabolit ten wyrzucany jest na zewnątrz komórki, dlatego też obecny jest zarówno w ekstrakcie komórkowym, jak i w pożywce. Analiza widma *UV-vis* i ESI-MS otrzymanego



produktu, potwierdza, że taki sam metabolit obserwowano również podczas inkubacji związku C-2028 z enzymami rekombinantowymi cytochromu P450 – M4²⁸. Jest to produkt o jonie masowym $m/z=307$, zatem jest on monomerem. Tak więc, ani w pożywce, ani w ekstrakcie nie zaobserwowano metabolitów dimerycznych.

IV.6.1.2. Metabolizm C-2041 w komórkach HCT116

Zestawione wyników analiz RP-HPLC i ESI-MS po inkubacji komórek HCT116 ze związkiem C-2041 przedstawiono poniżej (Rys. IV.33.).



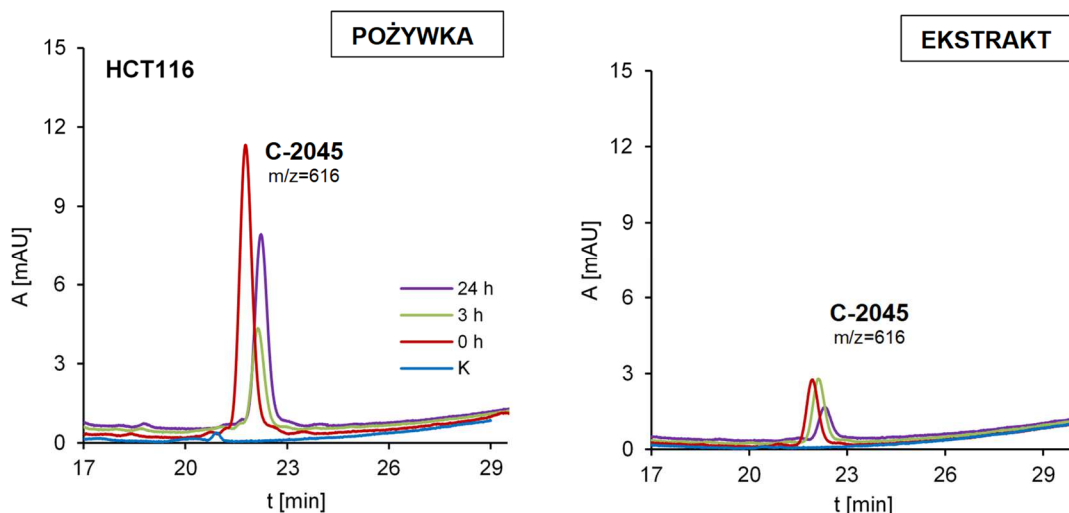
Rys.IV.33. Metabolizm związku C-2041 w komórkach nowotworowych HCT116. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących oraz ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 3 i 24 godz.; stężenie związku C-2041 na płytce – 50 μM , Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

Analizując powyższe chromatogramy można dostrzec, że stężenie związku C-2041 w pożywce po inkubacji z komórkami HCT116 spada. W ekstrakcie natomiast jest przez długi czas bardzo niskie. Można zatem wnioskować, iż C-2041 wnika do komórki, jednakże w porównaniu z pozostałymi badanymi bisakrydynami wnikanie to przebiega dużo wolniej.

Jednakże, pomimo tak niskiego stężenia substratu w ekstrakcie komórkowym, już po 3 godzinach zaobserwowano powstanie monomerycznego produktu o jonie masowym: $m/z=362$, którego stężenie rośnie wraz z wydłużeniem czasu inkubacji. Metabolit obecny jest zarówno w ekstrakcie komórkowym, jak i w pożywce, co oznacza, że jest też wyrzucany na zewnątrz komórki. Taki sam produkt obecny był również podczas inkubacji związku C-2041 z enzymami rekombinantowymi cytochromu P450 – M4⁴¹. Natomiast dla związku C-2041 produktów dimerycznych nie zaobserwowano.

IV.6.1.3. Metabolizm C-2045 w komórkach HCT116

Następnie komórki HCT116 traktowano związkiem C-2045. Po określonym czasie inkubacji (0, 3, 24 godz.) przeprowadzono analizę RP-HPLC i ESI-MS, której wyniki zamieszczono na Rys.IV.34.



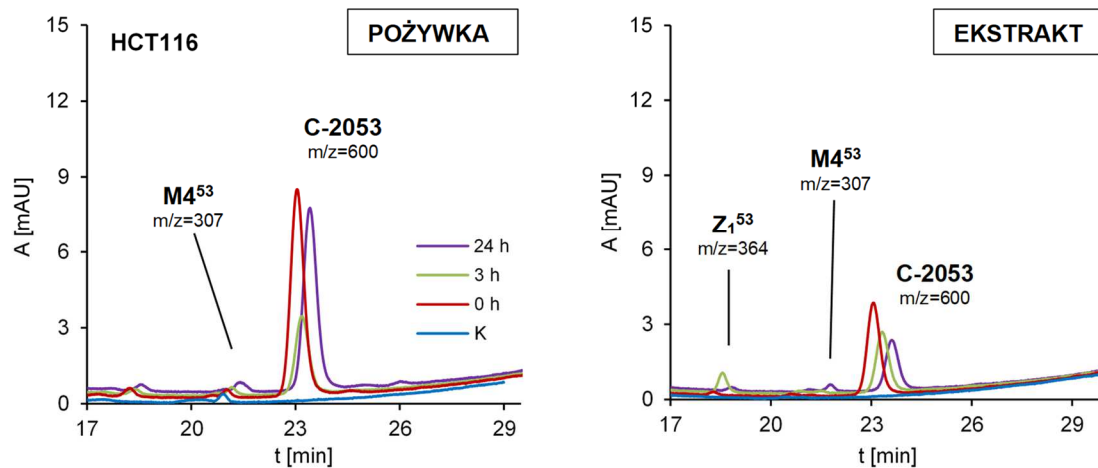
Rys.IV.34. Metabolizm związku C-2045 w komórkach nowotworowych HCT116. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących oraz ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 3 i 24 godz.; stężenie związku C-2045 na płycie – 50 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

Analiza powyższych chromatogramów zarejestrowanych dla kolejnego związku, C-2045, wykazała, że już po 3 godzinach jego stężenie w pożywce gwałtownie spada. W ekstrakcie komórkowym również przy tym samym czasie inkubacji obserwuje się bardzo intensywny pik pochodzący od związku C-2045. Wydaje się jednak, że stężenie związku C-2045 po 3 godzinach inkubacji jest takie samo jak przy rozpoczęciu inkubacji (czas 0) . Zatem można wnioskować, że związek C-2045 wnika do komórki.

Ponadto, na chromatogramach nie zaobserwowano żadnych dodatkowych pików, mogących pochodzić od produktów przemiany związku C-2045. Wynika stąd, że bisakrydyna C-2045 nie ulega biochemicznej transformacji w komórkach linii HCT116.

IV.6.1.4. Metabolizm C-2053 w komórkach HCT116

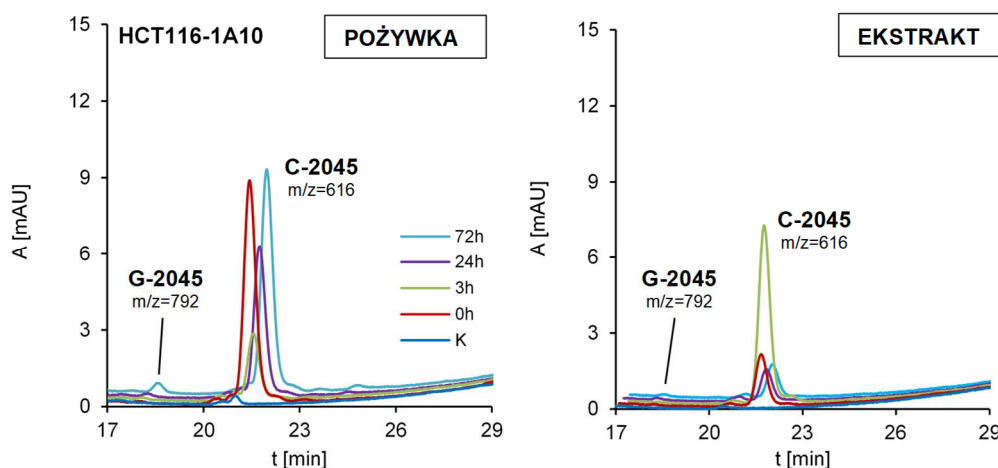
Z kolei analizując chromatogramy otrzymane po inkubacji komórek HCT116 ze związkiem C-2053 (Rys.IV.35.) można dostrzec, już po 3 godzinach gwałtowny spadek jego stężenia w pożywce co wskazuje, że bardzo szybko wnika on do komórki. W ekstrakcie komórkowym stężenie C-2053 w miarę wydłużania czasu inkubacji również spada. Po 3 godzinach następuje znaczny wzrost intensywności piku, który odpowiada opisanemu wcześniej produktowi hydrolizy Z₁⁵³ o jonie masowym $m/z=364$ (IV.2.3. Identyfikacja produktów rozpadu badanych bisakrydyn). Po 24 godzinach intensywność tego piku spada, natomiast pojawia się monomeryczny produkt o $m/z=307$ (M4⁵³), którego nie obserwowano wcześniej wobec rekombinantowych P450. Zarówno w pożywce jak i w ekstrakcie produktów w formie dimerycznej nie zaobserwowano. Należy również nadmienić, że wyniki otrzymane dla związku C-2053 są bardzo zbliżone do tych dla C-2028.



Rys.IV.35. Metabolizm związku C-2053 w komórkach nowotworowych HCT116. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących oraz ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 3 i 24 godz.; stężenie związku C-2053 na płytce – 50 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

IV.6.2. Metabolizm pochodnej bisakrydyny C-2045 w komórkach HCT116-1A10

W kolejnym etapie przeprowadzono badania nad metabolizmem niesymetrycznych bisakrydyn w komórkach HCT116-1A10, linii transfekowanej wektorem plazmidowym z sekwencją genu kodującego izoenzym UGT1A10, czyli takiej, która wykazuje nadekspresję izoenzymu UGT1A10 w stosunku do linii nietransfekowanej. Oczekiwano, że powstaną produkty metabolizmu II fazy, pochodne glukuronidów. Komórki linii HCT116-1A10 inkubowano ze związkiem C-2028, C-2041, C-2045 lub C-2053 o stężeniu 50 μ M przez 0, 3, 24 i 72 godz. Analizie RP-HPLC i ESI-MS poddano zarówno pożywki, jak i ekstrakty komórkowe.



Rys. IV.36. Metabolizm związku C-2045 w komórkach nowotworowych HCT116 z nadekspresją izoenzymu UGT1A10. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 3, 24 i 72 godz.; stężenie związku C-2045 na płytce – 50 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.



Analizując powyższe dane (Rys.IV.36) można zauważyć, że w pożywce po 3 godzinach inkubacji stężenie związku C-2045 gwałtownie spada, natomiast w ekstrakcie komórkowym rośnie. Zatem należy przyjąć, iż związek C-2045 stosunkowo szybko wnika do komórki. Ponadto po 72 godzinach inkubacji zarówno w pożywce, jak i ekstrakcie komórkowym zaobserwowano metabolit związku C-2045. Stężenie tego produktu jest zdecydowanie wyższe w pożywce, ponieważ metabolity II fazy są najczęściej, w ramach detoksyfikacji wyrzucane na zewnątrz komórki. Na podstawie otrzymanego widma *UV-vis*, a także analizy ESI-MS można stwierdzić, iż otrzymany produkt to glukuronid związku C-2045 (G-2045) o jonie masowym: 792. Należy również nadmienić, iż w pożywce po 72 godzinach inkubacji zaobserwowano wyższe stężenie substratu niż po 24 godzinach. Dowodzi to, że więcej substratu przechodziło do pożywki.

Wyniki wskazały, że związek C-2045, hydroksylowy analog bisakrydiny wykazał podatność na metabolizm II fazy wobec enzymów UGT. Pozostałe związki (C-2028, C-2041 i C-2053) nie metabolizowały w komórkach tej linii. Zatem otrzymane wyniki są zgodne z tymi otrzymanymi we wcześniejszych badaniach w układach bezkomórkowych (IV.5.3. *Metabolizm pochodnych bisakrydiny C-2028, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów UDP-glukuronylotransferaz, UGT*).

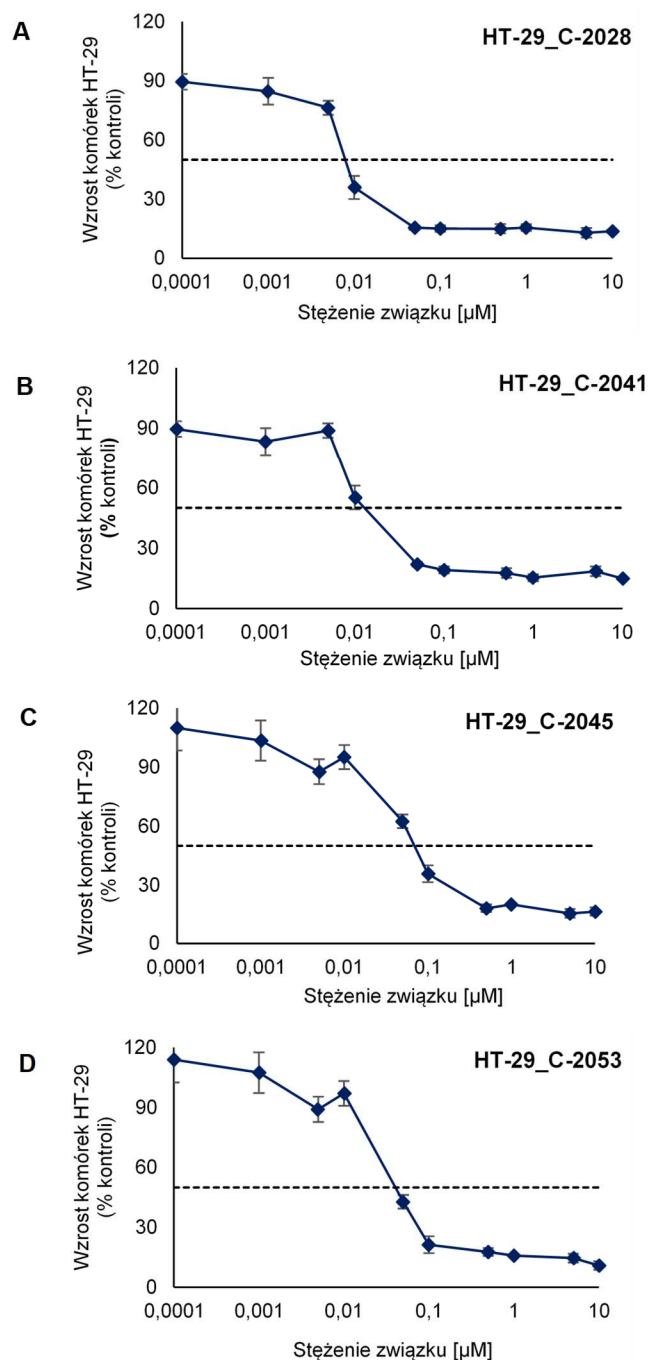
IV.6.3. Cytotoksyczność i metabolizm badanych związków w komórkach HT-29

Do kolejnego etapu badań zastosowano komórki nowotworowe linii HT-29, ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego. Komórki te wykazują naturalną ekspresję izoenzymów UGT, w tym najwyższą obserwuje się dla izoenzymu UGT1A10. Aktywność enzymów UGT w komórkach wynosi 53,74% [Pawłowska i in. 2020]. Badania przeprowadzono nad metabolizmem bisakrydyn o symbolach C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053. Komórki traktowano związkiem o stężeniu 5 i 25 μM i inkubowano przez określony czas w 37°C. Analizie RP-HPLC i ESI-MS poddano zarówno pożywki jak i ekstrakty komórkowe.

IV.6.3.1. Cytotoksyczność badanych związków w komórkach HT-29

Prace nad metabolizmem pochodnych bisakrydiny zachodzącym w komórkach HT-29 poprzedzono oznaczeniem aktywności cytotoksycznej badanych związków w stosunku do tej linii komórek nowotworowych. Oznaczenia dokonano metodą MTT (*III.3.9. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT*). Za miarę aktywności cytotoksycznej badanych bisakrydyn przyjęto stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* została zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych – EC_{50} (ang. effective concentration). Na podstawie otrzymanych wartości absorbancji przygotowanych roztworów obliczono % wzrostu komórek traktowanych związkiem C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 do komórek kontrolnych, nie traktowanych tym związkiem. Następnie z tak uzyskanych wyników sporządzono dla każdego ze związków wykres zależności zahamowania wzrostu komórek od logarytmu stężenia badanego związku (Rys.IV.37.). Analizując otrzymane wykresy można stwierdzić, iż wszystkie cztery związki hamują proliferację komórek HT-29 w sposób zależny od stężenia. Wyznaczone krzywe

charakteryzują się dużą powtarzalnością. Wyniki oznaczenia aktywności cytotoksycznej badanych związków dla linii komórkowej HT-29 będące średnią z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi przedstawiono w Tabeli IV.8.



Rys. IV.37. Zależny od dawki wpływ związku A - C-2028, B - C-2041, C - C-2045, D - C-2053 na proliferację komórek linii HT-29 wyrażony jako procent żywych komórek w stosunku do komórek kontrolnych, nieinkubowanych ze związkiem. Wykresy zostały opracowane na podstawie trzech niezależnych doświadczeń.

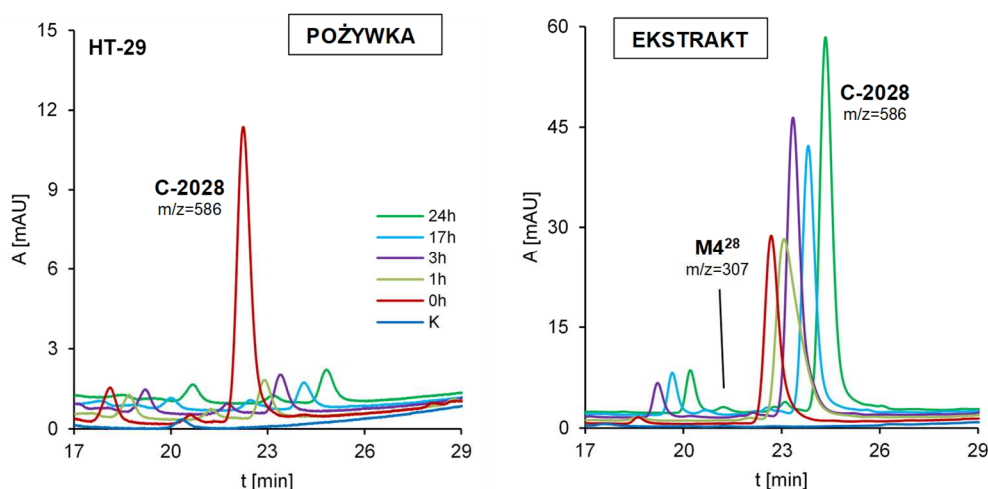
Tabela IV.8 Parametry aktywności cytotoksycznej dla bisakrydyn wobec komórek nowotworowych HT-29

Związek	EC ₅₀ dla HT-29, [μM]
C-2028	0,0073 ± 0,0004
C-2041	0,012 ± 0,002
C-2045	0,070 ± 0,001
C-2053	0,036 ± 0,008

Najbardziej aktywny okazał się związek C-2028, analog niepodstawiony (bez grupy OH i CH₃), zaś najmniej C-2045 (z grupą OH i CH₃), którego aktywność cytotoksyczna w porównaniu z C-2028 różni się o rząd wielkości. Związek C-2041 (analog niepodstawiony, lecz z dodatkowym pierścieniem w łańcuchu aminoalkilowym) wykazał zbliżoną aktywność do C-2028. Natomiast aktywność związku C-2053 (analogu bez grupy OH i z grupą CH₃) była trzykrotnie niższa w porównaniu z analogami niepodstawionymi. Wobec powyższego wnioskować można, iż obecność dodatkowych podstawników (szczególnie grupy hydroksylowej) w strukturze bisakrydyny skutkuje obniżeniem aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych HT-29. Wynik ten jest zaskakujący, ponieważ wcześniejsze badania nad monomerami wykazały dla nich odwrotną zależność. Związek C-1311 wykazywał zdecydowanie wyższą aktywność w porównaniu ze swoim analogiem nie posiadającym grupy hydroksylowej [Cholody i in. 1992 i 1996, Kuśnierczyk i in. 1994, Dopierała i in. 2011].

IV.6.3.2. Metabolizm badanych związków w komórkach HT-29 – stężenie 25 μM

Następnie przeprowadzono badania nad metabolizmem badanych bisakrydyn tj. C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053. Wyniki analiz RP-HPLC i ESI-MS otrzymane po inkubacji przez 0, 1, 2, 3, 17 godz. w 37°C komórek HT-29 ze związkiem C-2028/C-2041/C-2045/C-2053 o stężeniu 25 μM zestawiono i zamieszczono poniżej (Rys.IV.38-41).

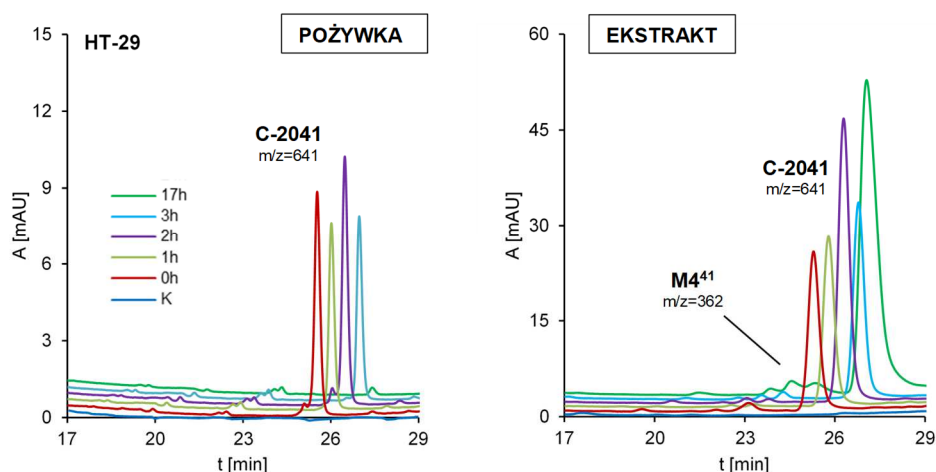


Rys.IV.38. Metabolizm związku C-2028 w komórkach nowotworowych HT-29. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz

po czasach inkubacji: 0, 1, 2, 3, 17 i 24 godz.; stężenie związku C-2041 na płytce – 25 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

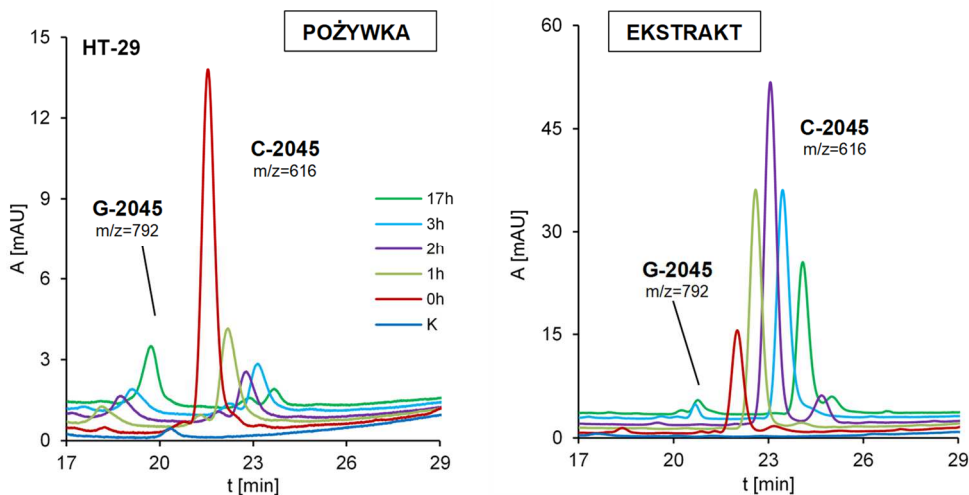
Analizując otrzymane wyniki dla związku C-2028 (Rys.IV.38) można zauważyć, iż w pożywce już po godzinie gwałtownie spada stężenie związku C-2028. W ekstrakcie natomiast w miarę wydłużania czasu inkubacji stężenie substratu rośnie. Zatem jednoznacznie można stwierdzić, iż C-2028 wnika do komórki bardzo szybko i w niej pozostaje. Po 24 godzinach w ekstrakcie komórkowym zaobserwowano jedynie śladowe ilości opisywanego już wcześniej metabolitu M4²⁸ o m/z=307. Zarówno w pożywce, jak i ekstrakcie nie wykryto również metabolitów dimerycznych.

Natomiast jak widać na kolejnych załączonych chromatogramach (Rys.IV.39) związek C-2041 dużo wolniej wnika do komórki niż C-2028. Po trzech godzinach stężenie tego związku w pożywce jest nadal wysokie. Dopiero po 17 godzinach następuje gwałtowny ubytek substratu w pożywce. Prawdopodobnie spowodowane jest to wnikaniem związku do komórki, ponieważ w miarę wydłużania czasu inkubacji przybywa związku C-2041 w ekstrakcie komórkowym. Ponadto w ekstrakcie nie wykryto metabolitów w formie dimerycznej, lecz tylko ślad pochodzący od opisywanego już wcześniej metabolitu M4⁴¹ o m/z=362.

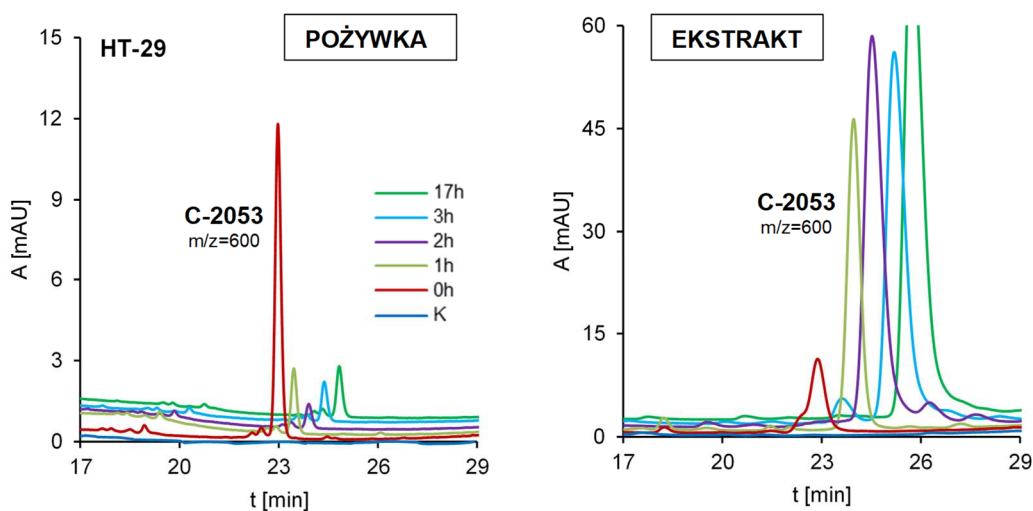


Rys.IV.39. Metabolizm związku C-2041 w komórkach nowotworowych HT-29. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 1, 2, 3 i 17 godz.; stężenie związku C-2041 na płytce – 25 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

Analiza chromatogramów przedstawionych na Rys.IV.40 wykazała, że w pożywce w miarę wydłużania czasu inkubacji stężenie związku C-2045 szybko spada. W ekstrakcie natomiast stężenie C-2045 na początku rośnie (związek wnika do komórki), a po 3 godzinach nagle spada. Już po 1 godzinie stężenie substratu maleje kosztem wzrastającego stężenia metabolitu (m/z=792). Wyniki te wskazują, że związek C-2045 metabolizuje w komórkach HT-29. W miarę wydłużenia czasu inkubacji obserwowany jest wzrost jego stężenia w pożywce. Analiza ESI-MS wykazała, iż nowy produkt to opisywany już wcześniej glukuronid związku C-2045 (G-2045).



Rys.IV.40. Metabolizm związku C-2045 w komórkach nowotworowych HT-29. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 1, 2, 3, 17 i 24 godz.; stężenie związku C-2045 na płytce – 25 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

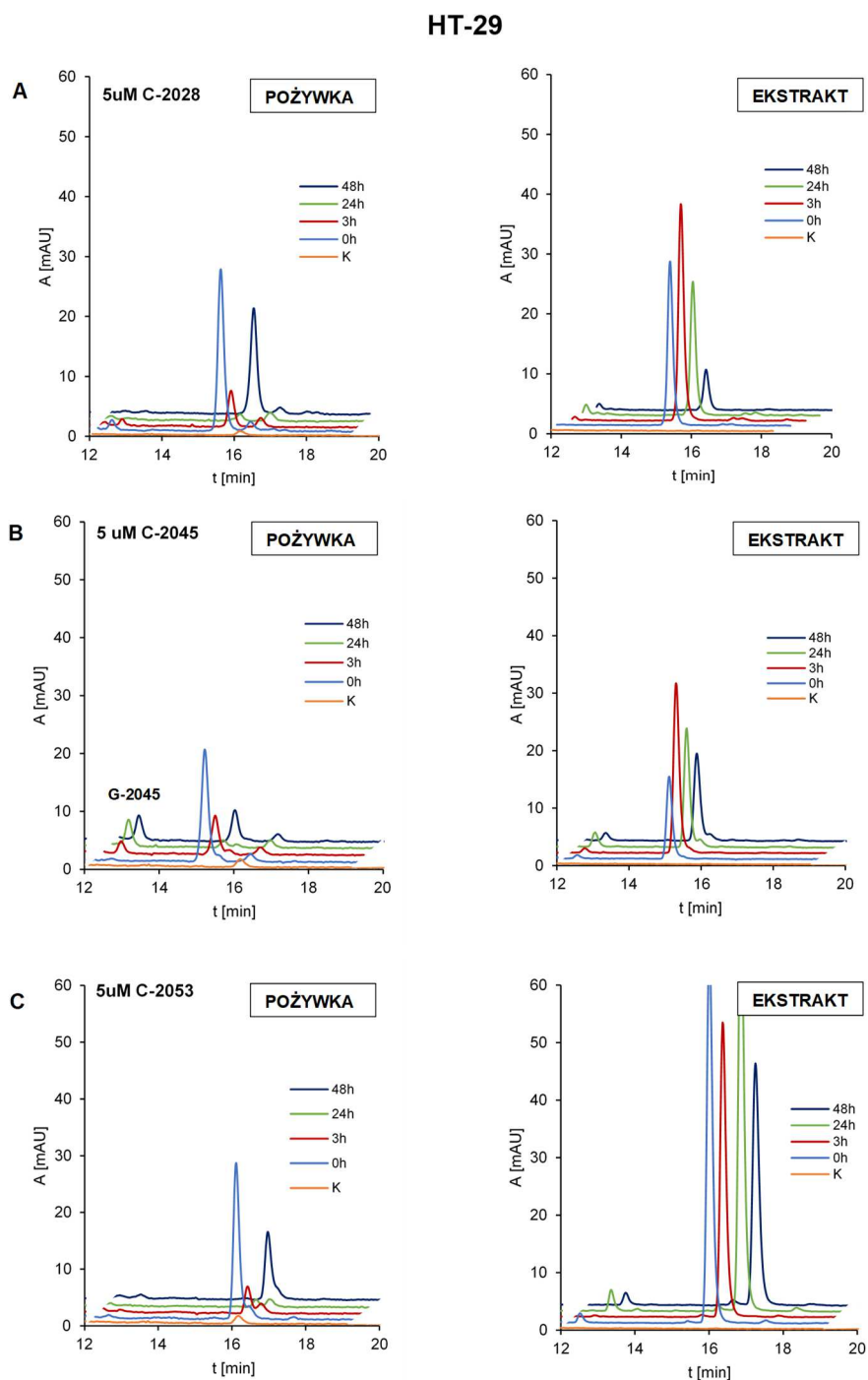


Rys.IV.41. Metabolizm związku C-2053 w komórkach nowotworowych HT-29. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 1, 2, 3, 17 i 24 godz.; stężenie związku C-2053 na płytce – 25 μ M, Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.

W przypadku związku C-2053 (Rys.IV.41) wyraźnie widać, że w pożywce jego stężenie spada w bardzo szybkim tempie, natomiast w ekstrakcie komórkowym gwałtownie rośnie. Wydaje się, iż związek ten wnika do komórki najszybciej w porównaniu z innymi badanymi bisakrydynami. Nie jest też wyrzucany na zewnątrz komórki. Zarówno w ekstrakcie komórkowym, jak i w pożywce nie zaobserwowano produktów przemiany metabolicznej związku C-2053. Kinetyka wnikania do komórki tego związku wydaje się być podobna do kinetyki reakcji związku C-2028.

IV.6.3.3. Metabolizm badanych związków w komórkach HT-29 – stężenie 5 μM

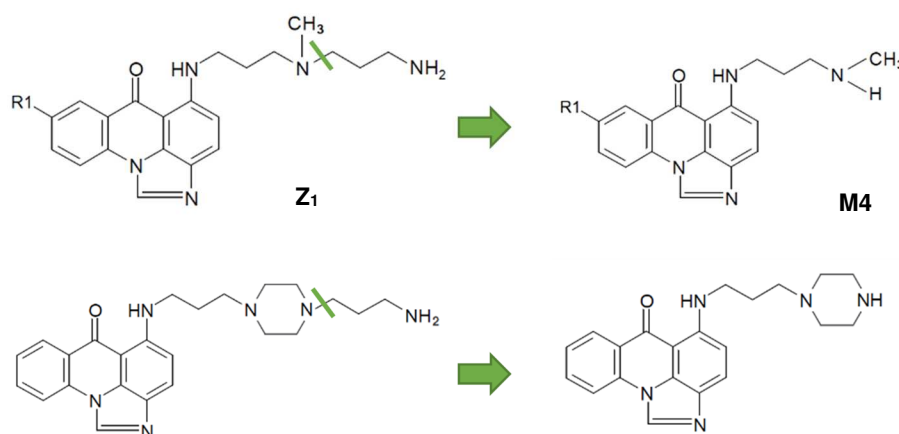
Ze względu na fakt, iż w komórkach HT-29 po 24 godzinnej inkubacji ze związkiem o stężeniu 25 μM nie zaobserwowano innych dimerycznych produktów metabolizmu oprócz glukuronidu związku C-2045, zdecydowano się również przeprowadzić dodatkowe badania z pięciokrotnie niższym stężeniem bisakrydyny w komórkach tj. 5 μM .



Rys.IV.42. Metabolizm bisakrydyn A – C-2028, B – C-2045, C – C-2053 w komórkach nowotworowych HT-29. Wyniki analiz chromatograficznych pożywek pochodzących i ekstraktów komórkowych przedstawiono jako zestaw chromatogramów: K (kontrola pożywki/ekstraktu komórkowego z komórek nietraktowanych związkiem) oraz po czasach inkubacji: 0, 3, 24 i 48 godz.; stężenie związku na płytce – 5 μM , Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Waters).

Ze względu na problemy z rozpuszczalnością dla związku C-2041 (osadzanie się na kolumnie), a także fakt iż związek ten nie wykazywał podatności na metabolizm wobec żadnych zastosowanych wcześniej w niniejszej pracy izoenzymów rekombinantowych badania te przeprowadzono tylko dla bisakrydyn o symbolach C-2028, C-2045 i C-2053 (Rys.IV.42).

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że pomimo zastosowania dużo niższego stężenia bisakrydyny oraz wydłużenia czasu inkubacji komórek ze związkiem do 48 godzin nie zaobserwowano powstawania istotnych stężeń innych metabolitów oprócz glukuronidu związku C-2045. Co ciekawe, nie zaobserwowano również w tych warunkach obecności metabolitów monomerycznych, obserwowanych wcześniej przy wyższych stężeniach związku. Wynioskowano zatem, iż badane bisakrydyny C-2028 i C-2053, poza C-2045 wykazują stabilność i nie ulegają bezpośrednim przemianom metabolicznym w komórkach HT-29. Przy zastosowaniu wyższych stężeń tych związków obserwuje się jedynie obecność produktów monomerycznych, których powstawanie jest prawdopodobnie wynikiem nie przemian enzymatycznych a hydrolizy (atak na wiązanie C-N) dimerów do monomerów, takich Z₁, które następnie ulegają przemianom do produktu M4 (Rys.IV.43.).



Rys.IV.43. Proponowany szlak powstawania monomerycznego metabolitu M4 z produktu hydrolizy bisakrydyny – Z₁.

Analizy przedstawione na Rys.IV.42 pokazały również kinetykę wnikania bisakrydyn do komórek, a dokładnie poziomy badanych związków w pożywce hodowlanej i ekstrakcie komórkowym po ich inkubacji z komórkami nowotworowymi HT-29. Wyniki wskazały, że penetracja związków między wnętrzem komórki a pożywką inkubacyjną wskazuje różną kinetykę dla każdego związku. W przypadku niepodstawionego C-2028 jego stężenie w pożywce komórkowej spada po 3 godzinach inkubacji i po 48 godzinach związek powraca do pożywki komórkowej. Odpowiednio, stężenie C-2028 w ekstrakcie komórkowym było wysokie do 24 godzin i znacznie niższe po 48 godzinach. W przypadku związku C-2053 z grupą 4-metylową w pierścieniu 1-nitroakrydyny, po inkubacji zaobserwowano niższe stężenie substratu w pożywce komórkowej. Jednak w ekstraktach komórkowych znaleziono niezwykle wysokie poziomy C-2053. Związek ten szybko wnikać do komórki i po upływie 24 godzin jego poziom wzrósł, a po

kolejnych 24 godzinach tylko nieznacznie spadł. Można przypuszczać, że obecność grupy metylowej w pierścieniu akrydyny C-2053 podwyższa jego lipofilowość, co powoduje zatrzymanie potencjalnego leku wewnątrz komórki.

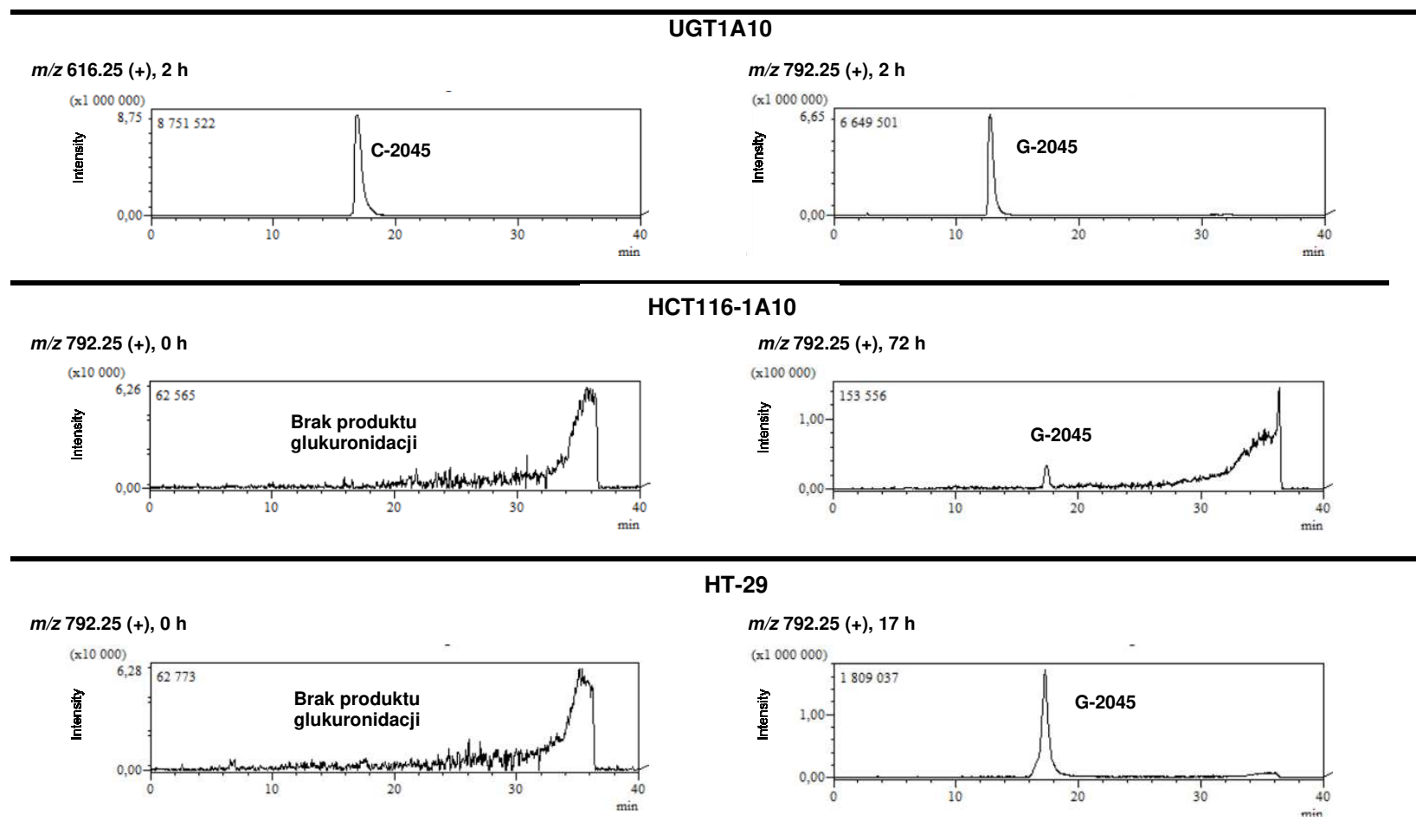
IV.6.3.4. Identyfikacja produktów przemian badanych bisakrydyn powstających w wyniku ich inkubacji z komórkami nowotworowymi

Podczas analiz chromatograficznych oprócz jonów masowych zebrano również widma UV-vis produktów otrzymanych w wyniku inkubacji badanych związków (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) z komórkami nowotworowymi jelita – HCT116, HCT116-1A10 i HT-29. Na podstawie zebranych danych tj. wartości m/z i widm absorpcyjnych, a także wcześniejszych etapów badań w układach bezkomórkowych zaproponowano struktury dla poszczególnych produktów pochodzących z transformacji badanych związków komórkach nowotworowych (Tabela.IV.9.).

Tabela IV.9 Proponowane struktury metabolitów pochodzących od bisakrydyn i otrzymanych podczas inkubacji z komórkami nowotworowymi HCT116, HCT116-1A10 i HT-29.

Związek	ESI-MS m/z	Proponowana struktura
M4^{28/53}	307	
M4⁴¹	362	
Z1^{28/53}	364	
G-2045	792	

Rys.IV.44. Analiza porównawcza otrzymanych chromatogramów MS, $m/z=616.3$ dla związku C-2045 i 792.3 dla O-glukuronidu podczas inkubacji komórek HCT116-1A10 i HT-29 ze związkiem C-2045 oraz wobec rekombinantowego UGT1A10. Analiza prowadzona przy 430 nm metodą RP- HPLC (Shimadzu) i ESI-MS.



Podsumowując, wyniki wskazały, że w trzech badanych liniach komórek nowotworowych przemiany związków bez grupy hydroksylowej w pierścieniu imidazoakrydonu będą przez degradację wiązań C-N w łańcuchu łączącym dwa monomery (Z₁ i M₄). Jednakże stopień tych przemian jest bardzo niski, bowiem nawet po najdłuższych czasach inkubacji komórek z pochodnymi bisakrydiny, stężenia badanych substratów w ekstraktach komórkowych i pożywkach pochodowlanych są bardzo wysokie w stosunku do powstających produktów Z₁ i M₄. Zatem wywnioskowano, że związki C-2028, C-2041 i C-2053 wykazują aktywność cytotoksyczną bez uprzedniej aktywacji biochemicznej. Natomiast związek C-2045 z grupą hydroksylową ulega przemianie do glukuronidu w komórkach o zwiększonej ekspresji enzymu UGT odpowiedzialnego za tę reakcję. Analiza RP-HPLC i ESI MS wykazała, że jest to ten sam produkt, który otrzymano wobec rekombinantowego izoenzymu UGT1A10 (Rys.IV.44).

IV.7. Wpływ badanych pochodnych bisakrydiny na aktywność wybranych rekombinantowych izoenzymów

Wykazano wcześniej (IV.5.1. *Metabolizm pochodnych bisakrydiny C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 wobec rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450*) niski stopień przemiany badanych bisakrydyn wobec izoenzymów P450 3A4 i P450 2C19 oraz brak produktów metabolizmu tych związków wobec większości izoenzymów podrodziny UGT1A, a w szczególności UGT2B. Również w komórkach nowotworowych związki te nie ulegały istotnym przemianom, poza glukuronidacją C-2045. Wobec tego w kolejnym etapie podjęto badania w kierunku wpływu badanych związków na aktywność w/w enzymów, które metabolizują wiele substancji aktywnych. Modulacja aktywności enzymów odpowiedzialnych za przemiany metaboliczne innych leków jak również związków naturalnych obecnych w organizmie człowieka np. hormonów może mieć znaczący wpływ na skuteczność terapii, ze względu na możliwe wystąpienie interakcji lek-lek bądź lek-substancje endogenne.

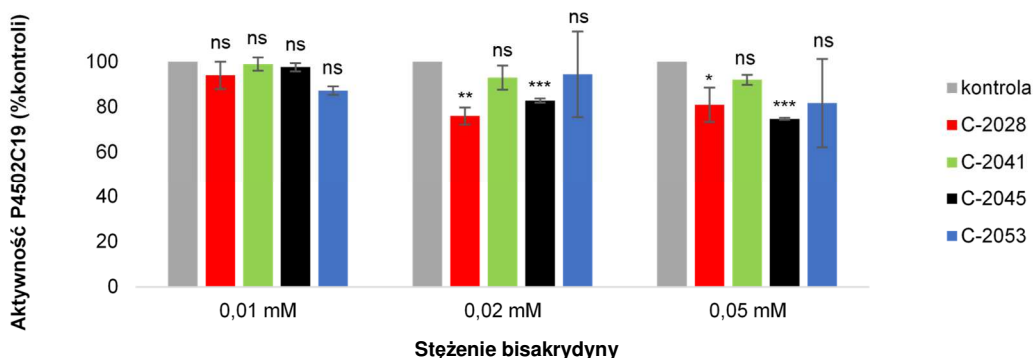
IV.7.1. Wpływ badanych bisakrydyn na aktywność izoenzymów P450 2C19 i 3A4

Celem pierwszego etapu zaproponowanych powyżej badań było określenie zdolności badanych bisakrydyn do modulacji aktywności rekombinantowych izoenzymów P450, P4502C19 i 3A4. W zależności od izoformy stosowano różne substraty standardowe. Aktywność P4502C19 określano na podstawie przemian metabolicznych imipraminy, natomiast aktywność P4503A4 z zastosowaniem testosteronu.

IV.7.2.1. P450 2C19

Dla zbadania wpływu związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymu P4502C19 sporządzono mieszaniny reakcyjne według Tabeli III.3 przedstawionej w części eksperymentalnej (III.3.6.1. *Wpływ bisakrydyn na aktywność izoenzymów P4502C19 i P4503A4*). Reakcje prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności różnych stężeń

związków tj. 0,01mM, 0,02mM i 0,05mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.45.).

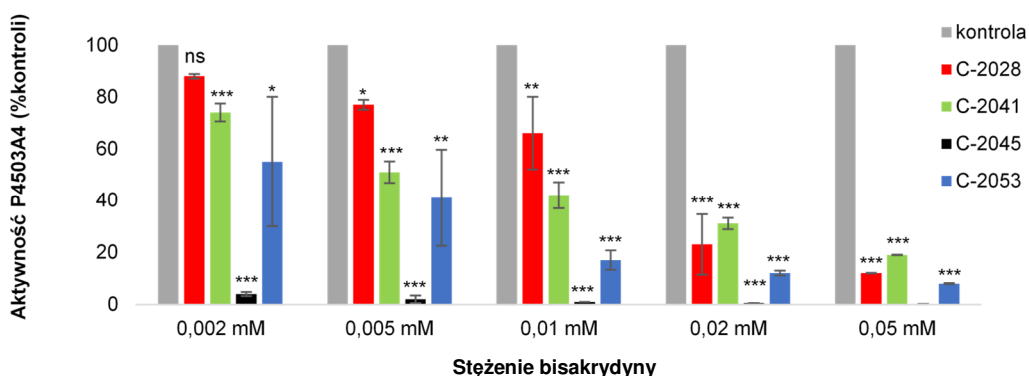


Rys. IV.45. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymu P450 2C19. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydiny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż nawet najwyższe stężenia badanych związków nie wykazują znacznego wpływu na działanie izoenzymu P4502C19. W przypadku związków C-2028 i C-2045 stopień zahamowania aktywności P4502C19 jest niewielki ok. 20%.

IV.7.2.2. P450 3A4

W celu zbadania wpływu badanych bisakrydyn (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) na aktywność izoenzymu P4503A4 reakcje prowadzono również przez 30 min przy braku i w obecności różnych stężeń związków tj. 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.46.).



Rys. IV.46. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymu P4503A4. Analiza prowadzona metodą RP- HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydiny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

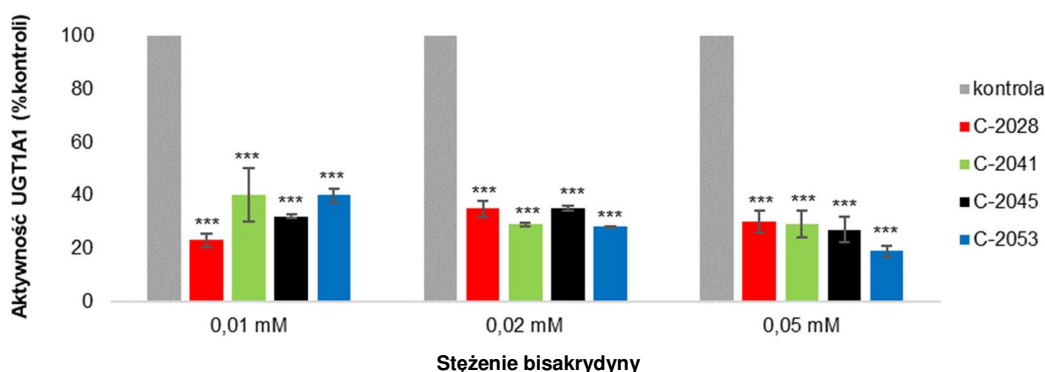
Analizując otrzymane wyniki można generalnie postawić wniosek, że badane pochodne bisakrydyny tj. związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w dużym stopniu hamują aktywność izoenzymu P4503A4, nawet do 80% przy stężeniach 0,02 i 0,05 mM. Jednak wykazując również wysokie hamowanie, związkiem odbiegającym od pozostałych okazał się C-2045 (analog z grupą hydroksylową w pierścieniu imidazoakrydonu). Już przy najniższych stężeniach związek ten wykazywał ponad 90% spadek aktywności P4503A4. Wzrost jego stężenia powodował dalszy wzrost hamowania aktywności tego izoenzymu. Dla najwyższych stężeń zaobserwowano praktycznie całkowitą inhibicję (99%).

IV.7.2. Wpływ badanych pochodnych bisakrydyny na aktywność wybranych UGT

Badania zdolności bisakrydyn do modulacji aktywności rekombinantowych izoenzymów UGT przeprowadzono z izoenzymami UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15 i 2B17. W zależności od izoformy stosowano różne substraty standardowe. Aktywność UGT1A6, 1A9, 1A10, 2B4, 2B15 i 2B17 określono na podstawie glukuronidacji TFK, natomiast aktywność UGT1A1, 1A4 i 2B7 z zastosowaniem odpowiednio: SN-38, TFP i epirubicynę (EPI). Wybór izoenzymów został podyktowany ich miejscem i poziomem ekspresji (większość wybranych izoform UGT ulega ekspresji w wątrobie z wyjątkiem UGT1A10, które ulegają ekspresji głównie w jelitach), zdolnością katalityczną (UGT1A4 jako jedyny katalizuje selektywnie reakcję N-glukuronidacji) oraz znaczeniem dla metabolizmu leków. Obniżona ekspresja lub aktywność izoenzymu UGT1A1, może stać się przyczyną poważnych efektów ubocznych chemoterapii. Inhibicja UGT1A1, jedynej izoformy odpowiedzialnej za glukuronidację, prowadzi do wystąpienia niesprężonej hiperbilirubinemii. Natomiast nadekspresja UGT1A6 przyczynia się do oporności linii komórkowych raka piersi na metotreksat. Wiele doniesień literaturowych wskazuje również na możliwość interakcji typu lek-lek oraz pomiędzy lekami a składnikami ziół wynikających z inhibicji UGT1A9. UGT2B7 odpowiada za metabolizm 35% leków podlegających glukuronidacji. Hamowanie aktywności tego izoenzymu jak i innych przedstawicieli rodziny UGT2B (UGT2B15 i UGT2B17) jest niezwykle istotne ze względu na możliwe oddziaływanie lek-lek oraz lek-substancje endogenne [Yang i in. 2017].

IV.7.2.1. UGT1A1

Wpływ badanych pochodnych bisakrydyn (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) na aktywność izoenzymu UGT1A1 oznaczono wobec specyficznego substratu SN-38. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności różnych stężeń związków C-2028, C-2041, C2045 i C-2053 tj. 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.47.)

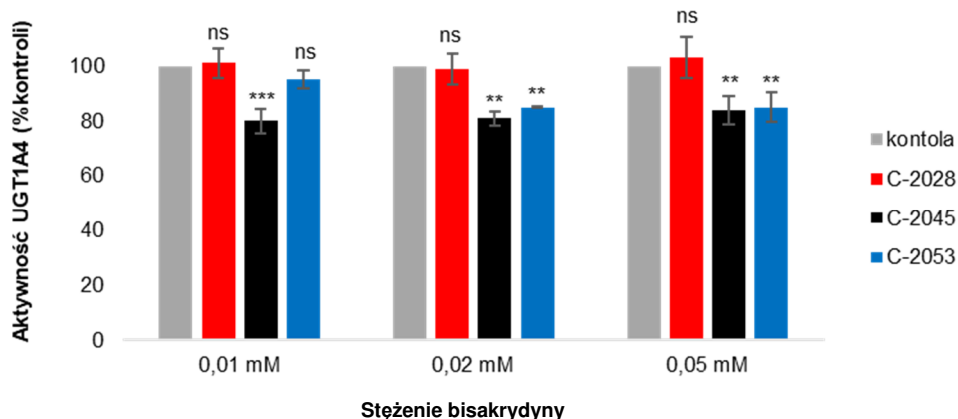


Rys.IV.47. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT1A1. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydiny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 indukują istotną inhibicję procesu syntezy glukuronidu związku SN-38. Dla przykładu, przy najniższych stężeniach C-2028 spadek aktywności izoenzymu UGT1A1 sięga nawet 77%. Przy wyższych stężeniach tego związku stopień hamowania jest nieznacznie niższy i sięga 65%-70%. Zatem wraz ze wzrostem stężenia związku C-2028 nie obserwuje się wzrostu stopnia hamowania aktywności izoenzymu UGT1A1. Może być to spowodowane np. wysyceniem enzymu inhibitorem. Nie mniej jednak można jednoznacznie stwierdzić, że C-2028 jest silnym inhibitorem izoenzymu UGT1A1. Związki C-2041 i C-2053 także wpływają na silne zahamowanie aktywności UGT1A1 (60-81%). W przeciwieństwie do C-2028 i C2045 wraz ze wzrostem stężenia zaobserwowano wzrost stopnia inhibicji.

IV.7.2.2. UGT1A4

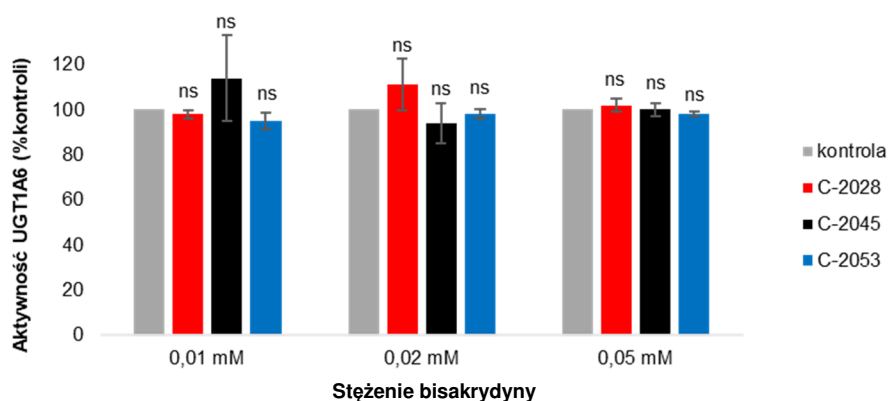
Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy badane bisakrydiny są inhibitorami izoenzymu UGT1A4. Badania przeprowadzono wobec specyficznego substratu TFP. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności związków C-2028, C-2045 i C-2053 o stężeniu 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.48.). W obecności związku C-2028 nie zaobserwowano hamowania aktywności izoenzymu UGT1A4. Można zatem założyć, iż nie wywiera on wpływu na działanie tego izoenzymu. W przypadku związków C-2045 i C-2045 stopień zahamowania aktywności UGT1A4 jest niewielki ok. 20 %. Jeśli w tym przypadku inhibicja ma miejsce, to przy tak niewielkim stopniu, że to nie będzie miało znaczenia w warunkach *in-vivo*.



Rys.IV.48. Wpływ C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT1A4. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydiny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

IV.7.2.3. UGT1A6

Zbadano również wpływ związków C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymu UGT1A6. Jako substratu zastosowano TFK - standardowy substrat dla wielu izoenzymów UGT. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności różnych stężeń związków tj. 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.49.). Ich analiza pozwala stwierdzić, iż żaden z badanych związków nie wpływał na aktywność izoenzymu UGT1A6. Nawet w przypadku obecności najwyższych stężeń związku C-2028, C-2045 lub C-2053 w próbce aktywność izoenzymu wynosiła ok. 100%. Zatem, badane wykazano, że bisakrydiny nie są inhibitorami izoenzymu UGT1A6.

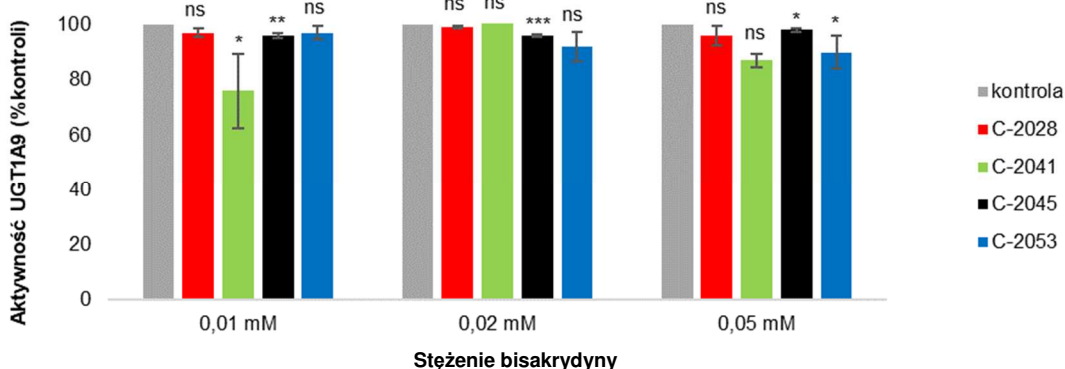


Rys.IV.49. Wpływ C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT1A6. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydiny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie ns – wynik nieistotny statystycznie.

IV.7.2.4. UGT1A9

Wpływ badanych bisakrydiny na aktywność UGT1A9 badano wobec standardowego substratu dla izoenzymów UGT tj. TFK. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy

braku oraz w obecności trzech stężeń związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 tj. 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.50.).

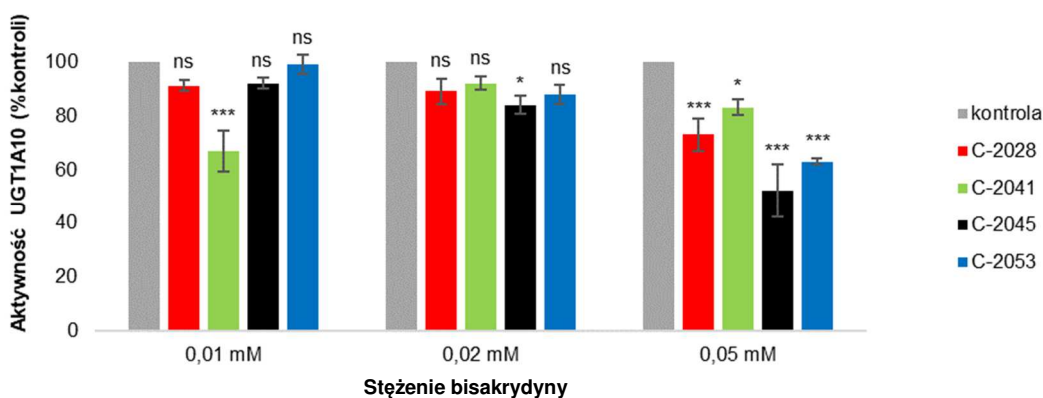


Rys.IV.50. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT1A9. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

Również w tym przypadku nie zaobserwowano wpływu związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność badanego izoenzymu UGT1A9. Niezależnie od stężenia związków obecnego w próbce glukuronid TFK powstawał z 90-99% wydajnością. Jedyne dla związku C-2041 w przypadku stężenia 0,01mM obserwuje się spadek aktywności enzymu do 80% jednakże wynik ten obarczony jest dość dużym błędem.

IV.7.2.5. UGT1A10

Następnym etapem badań było sprawdzenie, czy badane pochodne bisakrydyny są inhibitorami izoenzymu UGT1A10. Jak wspomniano katalizuje on metabolizm głównie poza wątrobą. Badania przeprowadzono wobec standardowego substratu TFK. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 o stężeniu 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.51.).



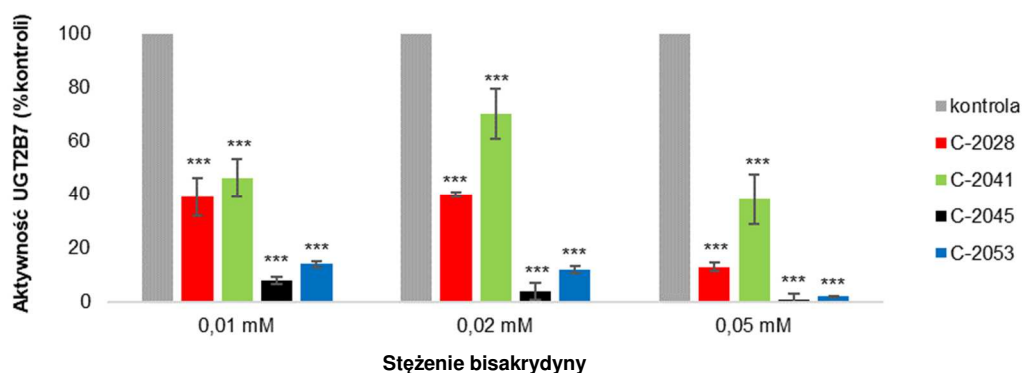
Rys.IV.51. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT1A10. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a

seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0.05$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

Analizując powyższe wyniki stwierdzono, iż najniższe stężenia (0,01mM) trzech badanych związków (oprócz C-2041) nie wykazują wpływu na działanie enzymu UGT1A10. Dla stężenia pośredniego (0,02mM) zaobserwowano niewielki spadek aktywności enzymu tj. 11-16%. Hamowanie aktywności izoenzymu UGT1A10 wykazano jedynie dla najwyższych stężeń badanych związków (0,05mM). Stopień inhibicji wynosił odpowiednio, C-2028 – 28%, C-2041 – 20%, C-2045 – 48%, C-2053 – 37%.

IV.7.2.6. UGT2B7

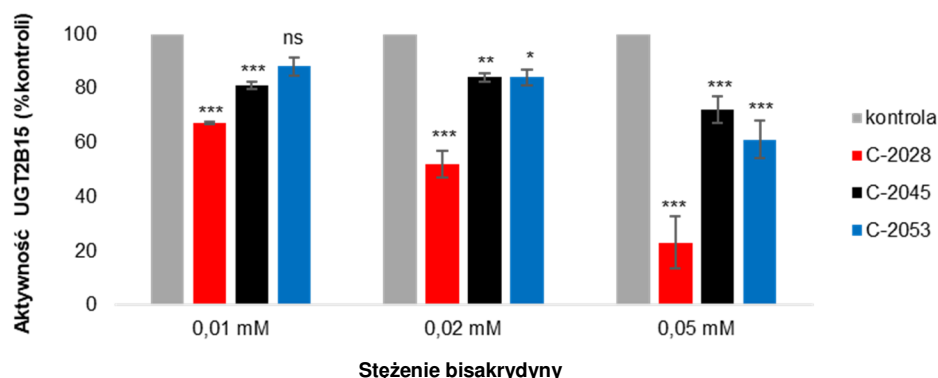
Wpływ badanych bisakrydyn na aktywność UGT2B7 zbadano wobec substratu specyficznego dla tego izoenzymu, czyli epirubicyny. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 o stężeniu 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.52.). Analizując otrzymane dane stwierdzono, iż badane bisakrydyny tj. C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w dużym stopniu hamują aktywność izoenzymu UGT2B7. 0,01 i 0,02 mM stężenie związku C-2028 spowodowało 60% spadek aktywności tego izoenzymu. Natomiast w obecności najwyższego stężenia nastąpiła 90% inhibicja. Związki C-2045 i C-2053 (analogi metylowe) okazały się znacznie lepszymi inhibitorami. Już przy najniższych stężeniach wykazywały 90% spadek aktywności UGT2B7. Wzrost stężenia powodował dalszy spadek hamowania aktywności tego izoenzymu. Dla najwyższych stężeń zaobserwowano praktycznie całkowitą inhibicję (98-99%). Dla związku C-2041 (analogu z dodatkowym pierścieniem w łączniku) obserwuje się natomiast znacznie słabszy spadek aktywności izoenzymu UGT2B7 tj. 30-55%.



Rys.IV.52. Wpływ C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT2B7. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie.

IV.7.2.7. UGT2B15

Związki C-2028, C-2045 i C-2053 zbadano również pod kątem inhibicji izoenzymów UGT2B15. W tym celu jako substrat zastosowano TFK – standardowy substrat dla izoenzymów UGT. Podobnie jak we wcześniejszych przypadkach reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności związków C-2028, C-2045 i C-2053 o stężeniu 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.53.).



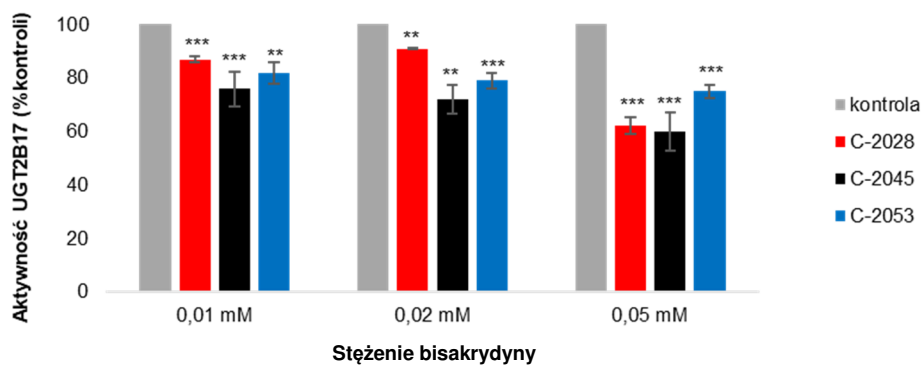
Rys.IV.53. Wpływ C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT2B15. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

Na Rys. IV.48. wyraźnie widać, że inaczej niż w przypadku z UGT2B7 znacznie lepszym inhibitorem dla izoenzymu UGT2B15 okazał się związek C-2028 (analog demetylowy). Wraz ze wzrostem jego stężenia następował wzrost stopnia hamowania aktywności izoenzymu UGT2B15. Przy najniższych stężeniach inhibicja wynosiła ok. 30% zaś przy najwyższych aż 80%. Związek C-2045 jak i C-2053 nawet w najwyższych stężeniach nie powodował spadku aktywności UGT2B15 powyżej 40%.

IV.7.2.8. UGT2B17

Ostatnim izoenzymem UGT, który został poddany badaniom podatności na inhibicję był UGT2B17. Wpływ związków C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność tego izoenzymu oznaczono wobec TFK, czyli standardowego substratu dla UGT. Reakcje glukuronidacji prowadzono przez 30 min przy braku oraz w obecności badanych związków o stężeniu 0,01mM, 0,02 mM i 0,05 mM. Otrzymane wyniki zebrano i zestawiono na poniższym wykresie (Rys.IV.54.).

Analizując otrzymane dane stwierdzono że związki C-2028, C-2045 i C-2053 w nieznacznym stopniu wpływają na aktywność UGT2B17. W przypadku najwyższych stężeń stopień zahamowania aktywności tego izoenzymu wynosił zaledwie 25-40%, natomiast przy najniższych stężeniach ok. 20%.



Rys.IV.54. Wpływ C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność UGT2B17. Analiza prowadzona metodą RP - HPLC (Shimadzu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskane na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie.

Analizując powyższe dane stwierdzono że związki C-2028, C-2045 i C-2053 w nieznacznym stopniu wpływają na aktywność UGT2B17. W przypadku najwyższych stężeń stopień zahamowania aktywności tego izoenzymu wynosił zaledwie 25-40%, natomiast przy najniższych stężeniach ok. 20%.

Należy również dodać, że nie dla wszystkich wybranych rekombinantowych izoenzymów UGT było możliwe przeprowadzenie badań wobec związku C-2041. Związek ten, spośród badanych pochodnych bisakrydyny odznacza się w badanych warunkach dużo gorszą rozpuszczalnością, co skutkowało osadzeniem się związku C-2041 na kolumnie, przez co przeprowadzenie analizy HPLC było w niektórych przypadkach niemożliwe.

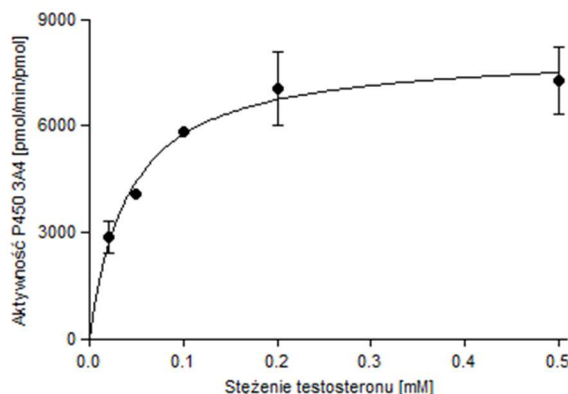
IV.7.3. Parametry inhibicji izoenzymów P450 3A4, UGT1A1 i UGT2B7 przez badane pochodne bisakrydyny

Jak wykazano wcześniej badane bisakrydyny wykazują istotny statystycznie wpływ na aktywność wybranych rekombinantowych izoenzymów P450 3A4, UGT1A1 i 2B7. W celu głębszej oceny zdolności badanych związków do modulacji aktywności tych izoenzymów przeprowadzono szereg dodatkowych eksperymentów, w których użyto standardowego substratu dla UGT, TFK lub dla P450 3A4, testosteron w różnym stężeniu: 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 mM przy braku oraz w obecności różnych stężeń wybranych bisakrydyn. Reakcje prowadzono przez 45 min dla UGT lub 30 min dla P450 3A4.

IV.7.3.1. Hamowanie P430 3A4 przez C-2045 i C-2053

W pierwszej kolejności przeprowadzono doświadczenie, które pozwoliło na zbadanie kinetyki przemiany testosteronu, czyli specyficznego substratu dla izoenzymu P450 3A4, do 6β-hydroksyttestosteronu w nieobecności bisakrydyny. Na Rys.IV.55 przedstawiono wykres zależności szybkości reakcji biotransformacji, wyrażonej jako aktywność P450 3A4, od zastosowanego stężenia substratu. Otrzymany wynik wskazuje, że reakcja zachodzi według

mechanizmu opisanego równaniem Michaelisa-Menten. Parametry: stałą Michaelisa-Menten (K_m) oraz maksymalną szybkość reakcji (V_{max}) zamieszczono w tabeli (Tabela IV.10.).

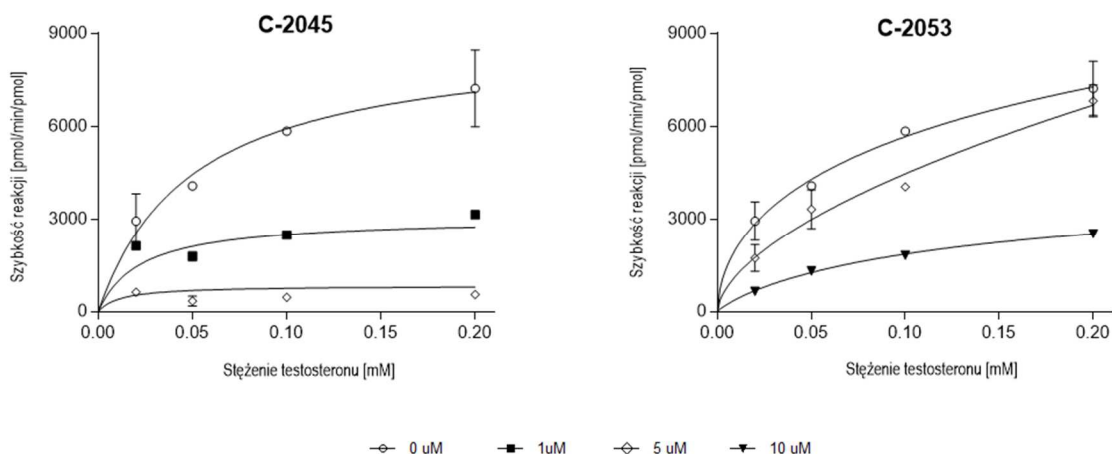


Rys.IV.55. Zależność szybkości przemiany testosteronu wobec P450 3A4 od stężenia substratu. Aktywność enzymu wyznaczono wobec substratu testosteronu (0 - 0,5 mM) i 222 pmol/ml P450 3A4 oraz 2 mM NADPH; czas inkubacji 30 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Tabela.IV.10. Parametry kinetyczne przemiany testosteronu wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu P450 3A4. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

K_m [mM]	V_{max} [pmol/min/pmol]
$0,041 \pm 0,012$	8113 ± 616

Kolejnym etapem było przeprowadzenie analogicznych analiz szybkości reakcji, ale w obecności jednej z dwóch wybranych pochodnych bisakrydyn tj. C-2045 lub C-2053 (Rys.IV.56.).



Rys.IV.56. Analiza inhibicji przemiany testosteronu wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu P450 3A4. Aktywność enzymu wyznaczono dla testosteronu (0 - 0,2 mM) wobec 222 pmol/ml P450 3A4 oraz 2 mM NADPH; czas inkubacji 30 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Analiza otrzymanych wyników (Rys.IV.56) wykazała, że zarówno związek C-2045, jak i C-2053 powodują już w bardzo niskich stężeniach silne obniżenie aktywności izoenzymu P450 3A4, przy czym efekt hamowania dla związku C-2045 jest zdecydowanie silniejszy. Jest to wynik

zgodny z przedstawionymi powyżej (IV.7.1. Wpływ badanych bisakrydyn na aktywność izoenzymów P450 2C19 i 3A4). Natomiast poniżej zebrano wartości parametrów inhibicji tej reakcji wyznaczonych na podstawie dopasowania modelu zebrano w Tabeli IV.11.

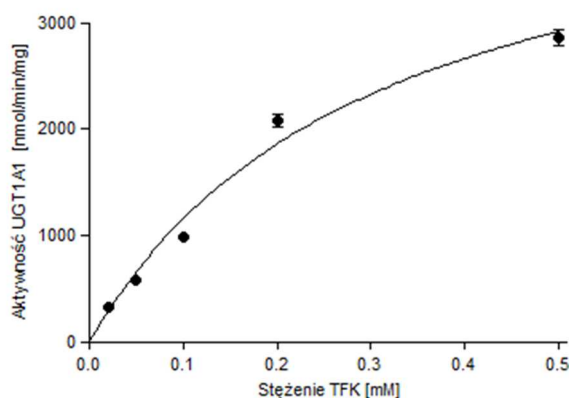
Tabela.IV.11. Parametry kinetyczne przemiany testosteronu wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu P450 3A4 w obecności związku C-2045 i C-2053. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Związek	Model inhibicji	K _i [μM]	V _{max} [nmol/min/mg]	K _m [μM]
C-2045	niekompetycyjna	0,65 ± 0,1	9502 ± 778	50 ± 11
C-2053	kompetycyjna	5,8 ± 1,5	9765 ± 907	58 ± 15

Za pomocą programu GraphPad Prism 5 dopasowano model inhibicji dla każdego związku. Dla C-2045, czyli pochodnej z dodatkową grupą hydroksylową najlepiej pasował model inhibicji niekompetycyjnej, natomiast dla związku C-2053 (analog bez grupy hydroksylowej) wyznaczono model inhibicji kompetycyjnej.

IV.7.3.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT1A1

Celem kolejnego etapu badań było określenie kinetyki glukuronidacji standardowego substratu dla UGT, czyli TFK wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT1A1 w obecności badanych związków. W pierwszym etapie przeprowadzono szereg reakcji w warunkach różnych stężeń substratu, stosując czas inkubacji 45 min. Wykres przedstawiający zależność szybkości reakcji glukuronidacji od stężenia substratu uzyskany metodą regresji nieliniowej (Rys.IV.57) wskazuje, że reakcja katalizowana przez izoenzym UGT1A1 również przebiega według mechanizmu opisanego równaniem Michaelisa-Menten. Wartości stałej równania (K_m) oraz maksymalnej szybkości reakcji (V_{max}) zamieszczono w tabeli (Tabela IV.12.).

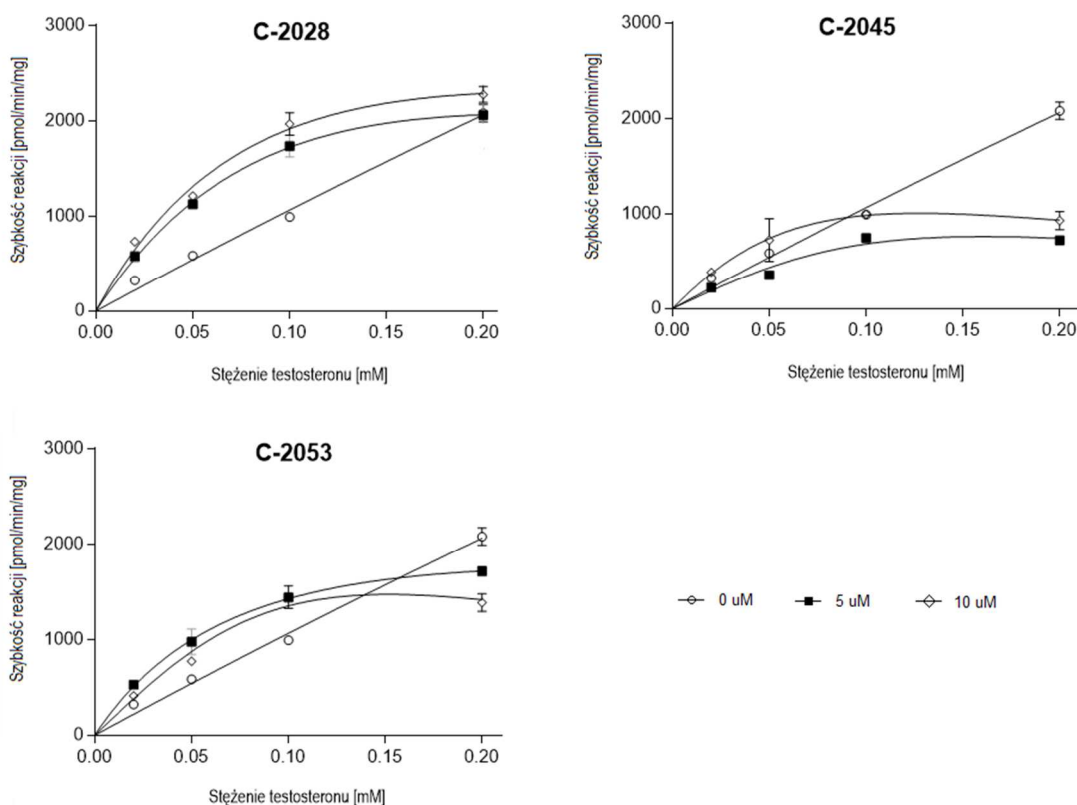


Rys.IV.57. Zależność szybkości przemiany TFK wobec UGT1A1 od stężenia substratu. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,5 mM) wobec 0,5 mg/ml UGT1A1 oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 45 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Tabela.IV.12. Parametry kinetyczne glukuronidacji TFK wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT1A1. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

K_m [mM]	V_{max} [nmol/min/mg]
$0,31 \pm 0,06$	4698 ± 468

Następnie przeprowadzono analogiczne reakcje, w których do mieszaniny reakcyjnej dodawano określone stężenia bisakrydyny C-2028, C-2045 lub C-2053. Otrzymane wyniki zestawiono i przedstawiono poniżej (Rys. IV.58). Wartości parametrów inhibicji wyznaczonych na podstawie dopasowania modelu zebrano w Tabeli IV.13.



Rys.IV.58. Analiza inhibicji przemiany TFK wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT1A1. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,2 mM) wobec 0,5 mg/ml UGT1A1 oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 45 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Tabela.IV.13. Parametry kinetyczne przemiany TFK wobec rekombinantowego ludzkiego UGT1A1 w obecności 0,05mM C-2028, C-2045 i C-2053. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Związek	Model inhibicji	K_i [mM]	V_{max} [nmol/min/mg]	K_m [mM]
C-2028	substratowa	$2,4 \pm 7,5$	3997 ± 1178	$0,12 \pm 0,05$
C-2045	substratowa	$\sim 0,00005$	$1052 \pm 264^*$	$0,07 \pm 0,04^*$
C-2053	substratowa	$0,4 \pm 0,8$	3528 ± 2430	$0,12 \pm 0,12$

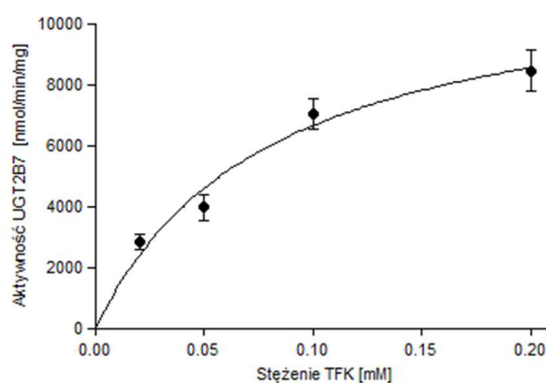
* wartości obliczone na podstawie modelu Michaelisa-Menten

Analiza otrzymanych wyników (Rys.IV.58) wykazała, że badane bisakrydyny dla niższych stężeń standardowego substratu (< 0,1 mM) powodują wzrost aktywności izoenzymu UGT1A1. Przy wyższych stężeniach TFK, dla związku C-2028 (analogu niepodstawionego) nadal obserwuje się indukcję aktywności UGT1A1 w porównaniu z próbką kontrolną (niezawierającą bisakrydyny), choć intensywność tego zjawiska wydaje się słabnąć w miarę wzrostu stężenia standardowego substratu, czyli TFK. Natomiast dla analogów metylowych (C-2045 i C-2053) przy stężeniu TFK wyższym niż 0,1 mM obserwuje się inhibicję aktywności tego izoenzymu. Należy również dodać, iż zdecydowanie silniejszy efekt hamowania wywiera związek posiadający, prócz grupy metylenowej, również grupę hydroksylową tj. C-2045.

Model inhibicji dla każdego związku został dopasowany za pomocą programu GraphPad. Dla związku C-2028, C-2045, jak i C-2053 najlepiej dopasowanym modelem okazał się model inhibicji substratowej.

IV.7.3.3. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT2B7

W celu określenia mechanizmu zaobserwowanej inhibicji aktywności rekombinantowego izoenzymu UGT2B7 w kolejnym etapie zbadano zmiany przebiegu kinetyki reakcji glukuronidacji standardowego substratu TFK w obecności badanych związków tj. C-2028, C-2045 i C-2053. Podobnie jak poprzednio (IV.7.3.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT1A1) reakcje prowadzono przy braku i w obecności określonych stężeń związku C-2028, C-2045 lub C-2053. Otrzymane wyniki zestawiono i przedstawiono na Rys.IV.59 i Rys.IV.60.



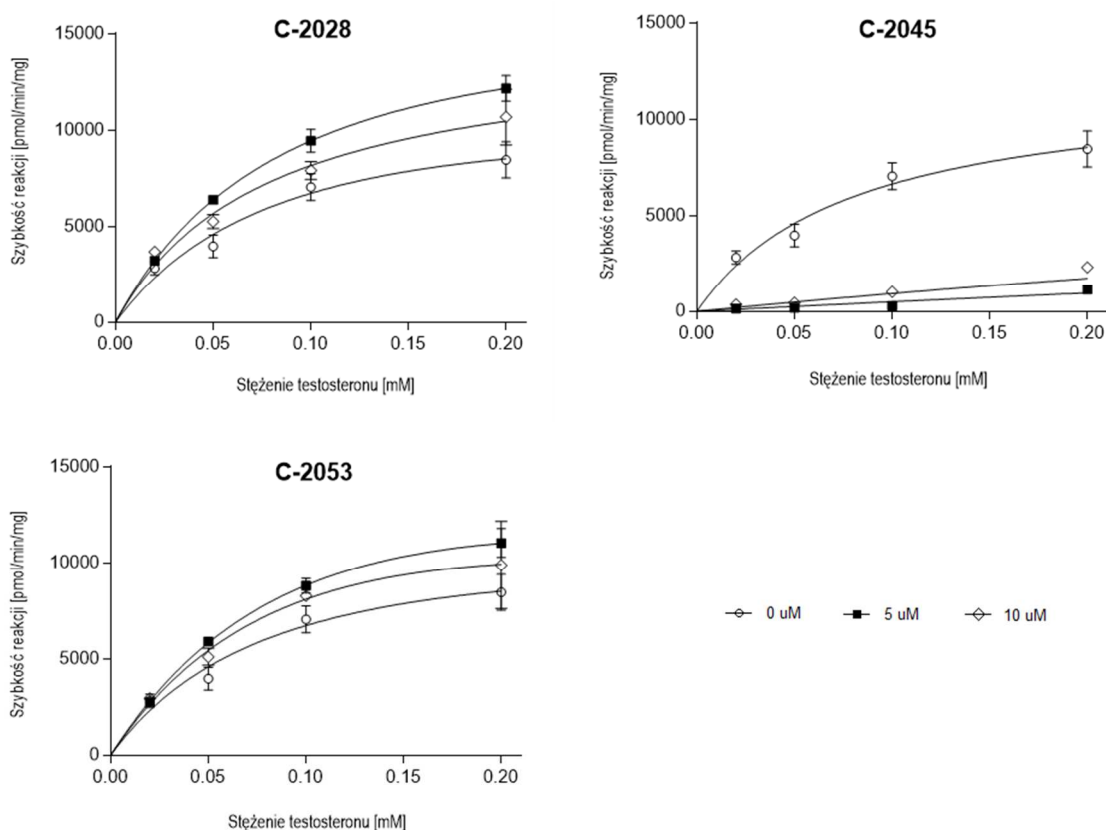
Rys.IV.59. Zależność szybkości przemiany TFK wobec UGT2B7 od stężenia substratu. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,2mM) wobec 0,5 mg/ml UGT2B7 oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 45 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Tabela.IV.14. Parametry kinetyczne glukuronidacji TFK wobec rekombinantowego ludzkiego izoenzymu UGT2B7. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

K_m [mM]	V_{max} [nmol/min/mg]
0,08 ± 0,02	11975 ± 1578

Otrzymany wynik (Rys.IV.59) wskazuje, że reakcja glukuronidacji TFK wobec UGT2B7 zachodzi według mechanizmu opisanego równaniem Michaelisa-Menten. Parametry: stała

Michaelisa-Menten (K_m) oraz maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) zamieszczono w tabeli (Tabela IV.14.). Dodatek do mieszaniny reakcyjnej 5 μM związku C-2028 lub C-2053 (analogu bez grupy hydroksylowej) spowodował wzrost aktywności izoenzymu UGT2B7 (Rys.IV.60). Natomiast wyższe stężenie C-2028/C-2053 tj 10 μM spowodowało osłabienie tego efektu. W przypadku związku C-2045, czyli analogu hydroksylowego zarówno przy stężeniu 5 μM , jak i 10 μM obserwuje się gwałtowny spadek aktywności izoenzymu UGT2B7, przy czym przy wyższym stężeniu zjawisko hamowania jest nieznacznie słabsze. Wartości parametrów inhibicji wyznaczonych na podstawie dopasowania modelu zebrano w Tabeli IV.15.



Rys.IV.60. Analiza inhibicji przemiany TFK wobec rekombinowanego ludzkiego izoenzymu UGT2B7. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,2 mM) wobec 0,5 mg/ml UGT2B7 oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 45 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

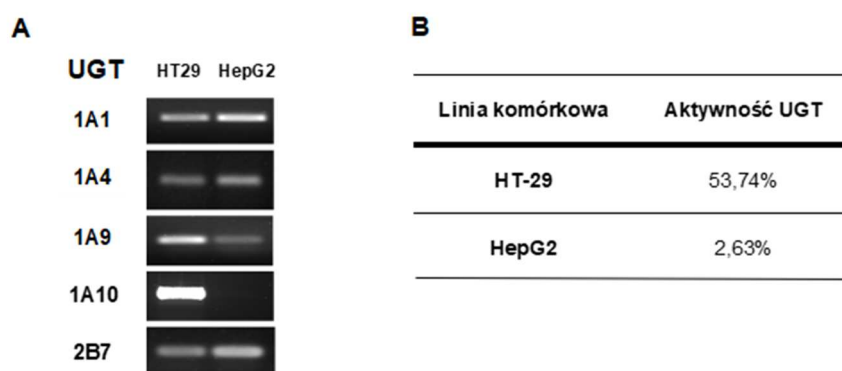
Tabela.IV.15. Parametry kinetyczne przemiany TFK wobec rekombinowanego ludzkiego UGT2B7 w obecności 0,05 mM C-2028, C-2045 i C-2053. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Związek	Model inhibicji	K_i [mM]	V_{max} [nmol/min/mg]	K_m [mM]
C-2028	substratowa	$0,3 \pm 0,2$	29116 ± 9645	$0,16 \pm 0,07$
C-2045	kompetycyjna	$0,3 \pm 0,1$	12680 ± 1637	$0,09 \pm 0,03$
C-2053	substratowa	$0,4 \pm 0,1$	27783 ± 2883	$0,09 \pm 0,03$

Dopasowania modelu inhibicji dla każdej badanej bisakrydyny dokonano za pomocą programu GraphPad Prism. Najlepiej dopasowanym modelem dla związków nie zawierających grupy hydroksylowej, tj. C-2028 i C-2053 okazał się model inhibicji substratowej, natomiast dla związku C-2045, czyli hydroksy pochodnej otrzymany wynik wskazywał na inhibicję kompetycyjną.

IV.8. Badanie zmian aktywności katalitycznej UGT indukowanych przez pochodne bisakrydyny w komórkach nowotworowych

Badania zmian aktywności katalitycznej izoenzymów UGT w obecności badanych bisakrydyn przeprowadzono również w układach komórkowych. Jako model do badań zastosowano homogenaty komórek HepG2, czyli ludzkiego nowotworu wątroby oraz linię HT-29, ludzkiego gruczolakoraka jelita. Linia HepG2 posiada wysoką ekspresję izoenzymów z podrodziny UGT2B, w tym UGT2B7 oraz z podrodziny UGT1A, zwłaszcza UGT1A1 [Hu i in. 2014 i 2015, Pawłowska i in. 2020]. Natomiast linia HT-29 odznacza się wysoką ekspresją izoenzymów z podrodziny UGT1A, głównie UGT1A10 [Landmann i in. 2014, Pawłowska i in. 2020]. (Rys.IV.61).

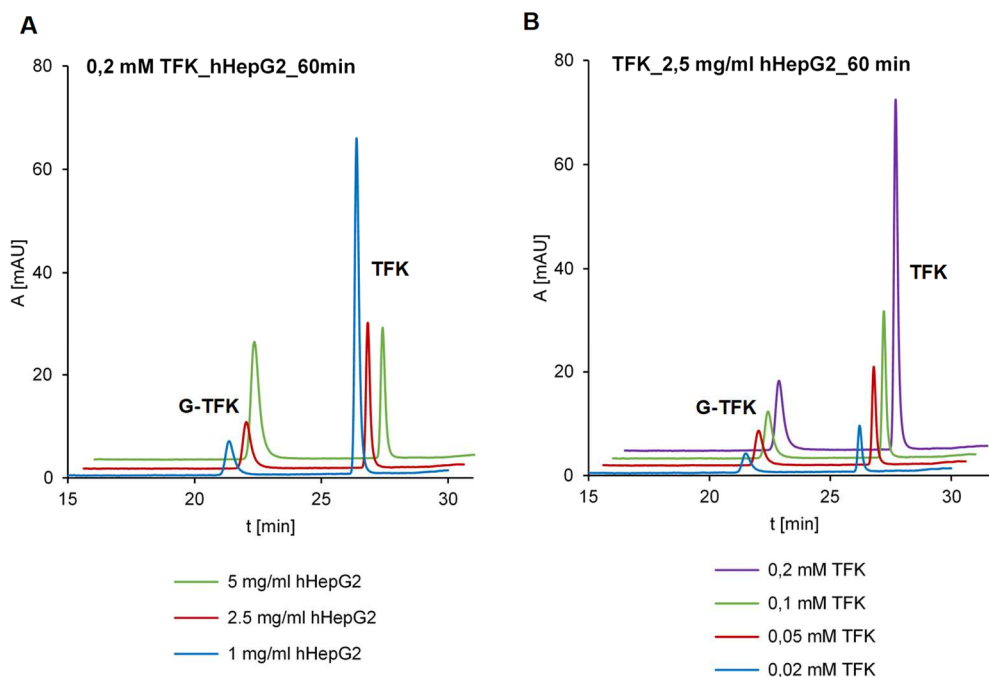


Rys.IV.61. A - ekspresja wybranych enzymów metabolizujących z rodziny UGT w liniach komórkowych HepG2 i HT-29. Metoda: Reverse Transcript PCR, Sposób przedstawienia: elektroforeza w żelu agarozowym (1,5%, 40 min, 90V; próbka: 5 µl), B – Aktywność enzymów UGT w liniach komórkowych HepG2 i HT-29. Metoda: Oznaczono na podstawie zdolności do przemiany 50 µM standardowego substratu TFK dla procesu glukuronidacji, czas inkubacji 3 godziny, liczba komórek 2 mln – wartości pochodzą z doświadczenia wykonanego równolegle dla wszystkich linii [Pawłowska i in. 2020, dane nie opublikowane]

IV.8.1. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT w homogenatach komórek HepG2

Ze względu na fakt, iż komórki linii HepG2 wykazują dość niską aktywność izoenzymów UGT (2,63%) zdecydowano, aby wpływ bisakrydyn na aktywność tych enzymów zbadać nie bezpośrednio w komórkach, lecz wobec homogenatów komórek tej linii. Homogenaty otrzymane z ludzkich linii komórkowych są bowiem często stosowanym modelem do badań glukuronidacji. Pozwalają one na otrzymanie bardziej powtarzalnych wyników [Hu i in 2014, Quan i in. 2015, Mróz i in.2018]. Wszystkie reakcje prowadzono w obecności kofaktora UDPGA, alametycyny i jonów Mg²⁺, czyli w warunkach sprzyjających reakcji glukuronidacji.

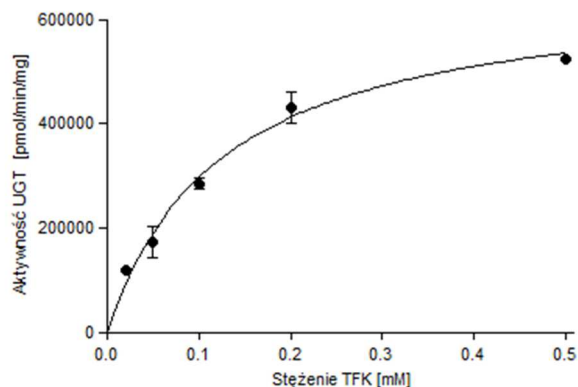
W pierwszej kolejności sprawdzono aktywność izoenzymów UGT w otrzymanych homogenatach linii HepG2 stosując standardowy substrat dla większości izoenzymów UGT – TFK oraz substraty specyficzne dla UGT1A1 i UGT2B7, odpowiednio: SN-38 oraz epirubicynę. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż homogenaty komórek HepG2 wykazały aktywność glukuronidacyjną wobec standardowego substratu (TFK), lecz okazały się nieaktywne względem substratów specyficznych. Zatem nie wykazały aktywności izoenzymu UGT1A1 i UGT2B7. Wyniki badań zdolności do glukuronidacji otrzymanych homogenatów wobec TFK zamieszczono w postaci zestawionych chromatogramów (Rys.IV.62).



Rys.IV.62. Aktywność glukuronidacyjna homogenatów otrzymanych z komórek HepG2 w zależności od A - stężenia białek w homogenacie HepG2 i B – od stężenia substratu. Aktywność wyznaczana wobec standardowego substratu dla izoenzymów UGT (TFK) oraz w obecności 5 mM UDPGA; czas inkubacji 60 min. Analiza prowadzona przy 325 nm metodą RP- HPLC (Waters).

Pomimo tego iż, homogenaty HepG2 nie wykazały aktywności wobec UGT1A1 i UGT2B7 postanowiono sprawdzić, czy badane bisakrydyny wpływają na zmiany aktywności pozostałych izoenzymów UGT zawartych w homogenatach linii HepG2.

W tym celu w pierwszej kolejności zbadano kinetykę glukuronidacji TFK wobec enzymów obecnych w homogenatach HepG2 (2,5 mg/ml) przy braku bisakrydyny w mieszaninie reakcyjnej. Otrzymane wykresy zależności szybkości glukuronidacji od zastosowanego stężenia substratu przedstawiono na Rys.IV.63. Otrzymany wynik wskazuje, że reakcja glukuronidacji zachodzi według mechanizmu opisanego równaniem Michaelisa-Menten. Parametry: stała Michaelisa-Menten (K_m) oraz maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) zamieszczono w tabeli (Tabela IV.16.).

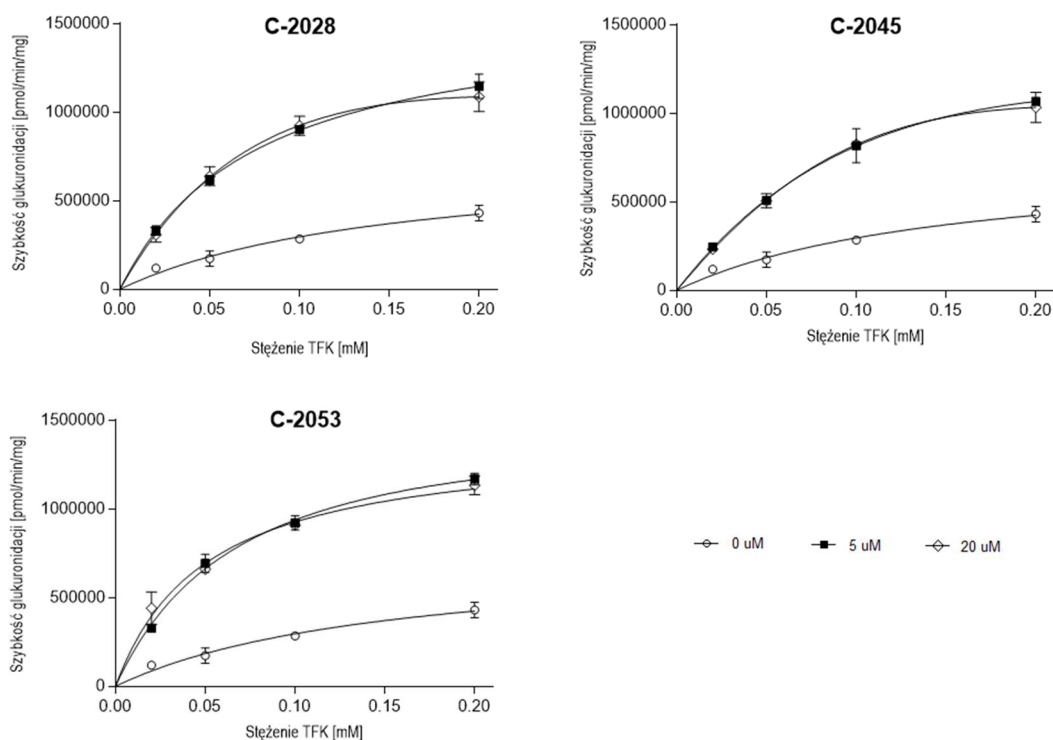


Rys.IV.63. Zależność szybkości przemiany TFK wobec UGT obecnych w homogenacie komórek HepG2 od stężenia substratu. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,5mM) wobec 2,5 mg/ml białka oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 60 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Tabela.IV.16. Parametry kinetyczne glukuronidacji TFK wobec UGT obecnych w homogenacie komórek HepG2. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

K_m [mM]	V_{max} [pmol/min/mg]
0,12 ± 0,02	66 9829 ± 56 650

Następnie przeprowadzono analogiczne reakcje, lecz tym razem w obecności różnych stężeń związku C-2028, C-2045 lub C-2053. Otrzymane wyniki zestawiono i zamieszczono. (Rys.IV.64).



Rys.IV.64. Analiza zmian kinetyki glukuronidacji TFK wobec UGT obecnych w homogenatach komórek HepG2. Aktywność enzymu wyznaczono dla TFK (0 - 0,2 mM) wobec 2,5 mg/ml białka oraz 5 mM UDPGA; czas inkubacji 60 min. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi

uzyskanymi na podstawie co najmniej dwóch powtórzeń. Wykresy uzyskano na podstawie analizy regresji nieliniowej za pomocą programu GraphPad Prism 5.

Jak widać na załączonych wykresach (Rys.IV.64.) już 5 μM dodatek związku C-2028, C-2045 lub C-2053 do homogenatów komórkowych HepG2 powoduje intensywny, ponad dwukrotny wzrost aktywności izoenzymów UGT tam obecnych. Ponadto przy czterokrotnie wyższym stężeniu któregokolwiek z badanych związków nie obserwuje się wzmocnienia tego zjawiska. Efekt indukcji dla stężenia 20 μM jest zbliżony do tego otrzymanego wobec 5 μM stężenia bisakrydyny. Wydaje się zatem, że już niewielkie stężenie badanych związków tj. C-2028, C-2045 lub C-2053 powoduje zdecydowany wzrost aktywności katalitycznej izoenzymów UGT obecnych w homogenatach komórek HepG2, lecz zjawisko to nie jest ściśle zależne od stężenia badanych związków.

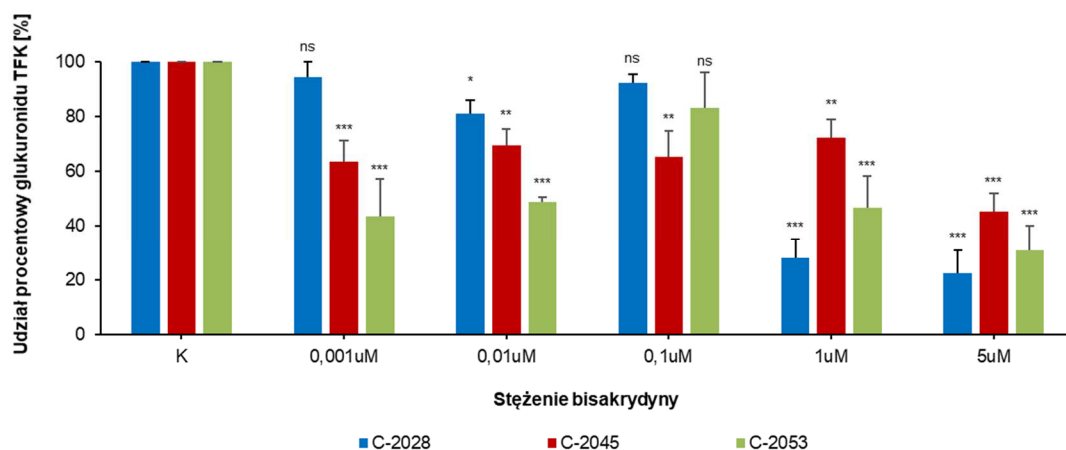
Tabela.IV.17. Parametry kinetyczne przemiany TFK wobec UGT obecnych w homogenatach komórek HepG2 w obecności 5 μM związku C-2028, C-2045 i C-2053. Wartości przedstawiono jako średnie z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Związek	K_m [mM]	V_{max} [pmol/min/mg]
C-2028	$0,077 \pm 0,008$	1586000 ± 67749
C-2045	$0,11 \pm 0,02$	1674000 ± 126125
C-2053	$0,15 \pm 0,05$	1568000 ± 71002

Dla wszystkich wyznaczonych zależności wyznaczono również parametry: stałą Michaelisa-Menten (K_m) oraz maksymalną szybkość reakcji (V_{max}) – Tabela.IV.17.

IV.8.2. Wpływ bisakrydyn na aktywność UGT w komórkach HT-29

Wpływ na aktywność katalityczną izoenzymów UGT zbadano bezpośrednio również w układzie komórkowym, a dokładnie w komórkach linii HT-29. Linia ta, jak wspomniano wcześniej odznacza się wysoką ekspresją enzymów UGT, głównie izoenzymu UGT1A10, jak i bardzo wysoką, bo ponad 50% aktywnością tych enzymów wyznaczoną względem standardowego substratu dla UGT, TFK [Pawłowska i in. 2020]. Doświadczenie przeprowadzono przy stałym czasie ekspozycji komórek (24 godz.) na bisakrydynę C-2028, C-2045 lub C-2053 i zmiennym stężeniu danego związku (0-5 μM). Zakres stężeń został dobrany na podstawie analizy wyników pochodzących z wcześniejszych badań, z których wynika, iż (I) wartość EC_{50} dla badanych związków wobec komórek HT-29 jest bardzo niska (0,01-0,04 μM) oraz (II) bisakrydyny wywierają wpływ na aktywność katalityczną enzymów już w bardzo niskich zakresach stężeń. Zmianę w aktywności katalitycznej komórek HT-29 obserwowano względem TFK, na podstawie wyników analiz chromatograficznych składu pożywek pochodowlanych po uprzedniej ekspozycji komórek na związek C-2028/C-2045/C-2053, w stosunku do komórek nietraktowanych tym związkiem. Aktywność przeliczono względem liczby żywych komórek (Rys.IV.65).

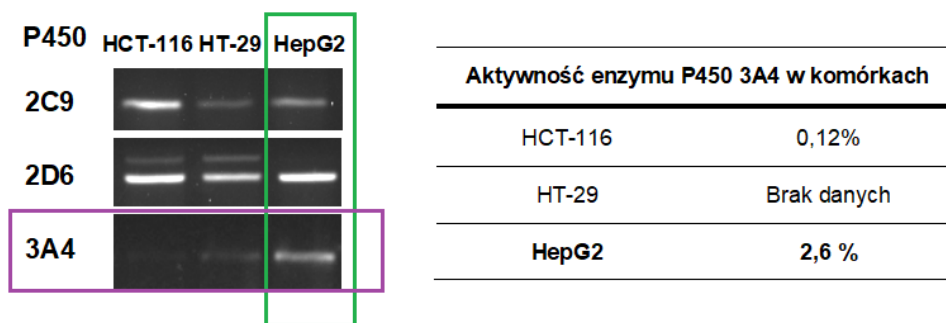


Rys.IV.65. Wpływ badanych bisakrydyn C-2028, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymów UGT obecnych w komórkach HT-29. Porównanie aktywności glukuronidacyjnej wrażonej jako udział procentowy powierzchni pod pikami glukuronidu TFK względem sumy powierzchni pod pikami substratu i glukuronidu przy braku (K) jak i w obecności danego związku o różnym stężeniu. Analizę statystyczną różnic pomiędzy kontrolą a seriami dla poszczególnych stężeń bisakrydyny przeprowadzono testem ANOVA, gdzie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oznacza różnice istotne statystycznie, ns – wynik nieistotny statystycznie.

Analizując przedstawione wyniki można dostrzec wyraźny spadek udziału procentowego glukuronidu TFK wraz z rosnącym stężeniem badanych związków, co świadczy o obniżeniu aktywności katalitycznej izoenzymów UGT obecnych w komórkach HT-29. Najsilniejszy efekt obserwuje się przy stężeniu powyżej 1 μM . Natomiast przy niższych stężeniach hamowanie zdolności glukuronidacyjnej dla większości związków nie jest już tak intensywne. Dla związku niepodstawionego grupą hydroksylową, czyli C-2028 przy najniższych stężeniach ($\leq 0,1 \mu\text{M}$) inhibicja wynosiła 10 - 15 %, przy czym część wyników była nieistotna statystycznie, zaś przy wyższych stężeniach hamowanie dochodziło do 80%. Wynik ten był istotny statystycznie (** $p < 0,01$). Związek C-2053, analog metylowy również bez grupy hydroksylowej znacząco hamował aktywność badanych izoenzymów przy stężeniu 0,001; 0,01; 1 i 5 μM . Aktywność enzymów wynosiła bowiem tylko 30 - 50 % (wynik istotny statystycznie, *** $p < 0,001$). Dla stężenia 0,1 μM zaobserwowano spadek aktywności enzymów tylko o 15 %, przy czym wynik ten okazał się nieistotny statystycznie. Inny natomiast efekt na aktywność izoenzymów UGT wywarł związek C-2045, analog metylowy z grupą hydroksylową. Dla stężenia 5 μM nastąpił spadek aktywności enzymów UGT o 55%, zaś dla pozostałych stężeń inhibicja wynosiła 30-40%. Wszystkie wyniki otrzymane dla związku C-2045 okazały się istotne statystycznie (** $p < 0,01$ lub *** $p < 0,001$).

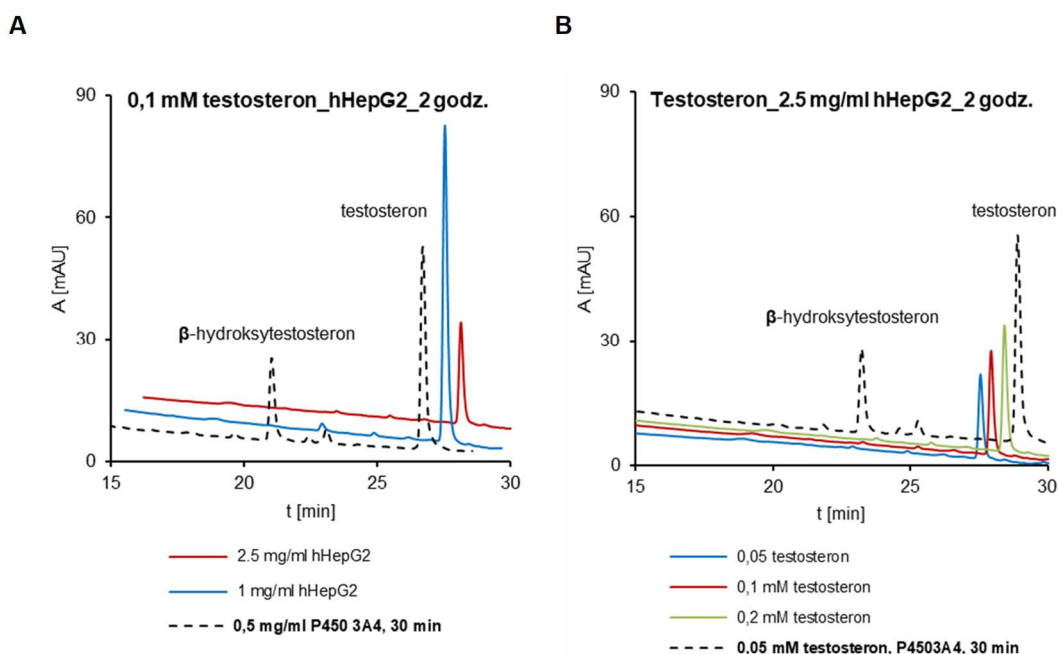
IV.9. Badanie aktywności izoenzymu P450 3A4 w homogenatach komórek HepG2.

W ramach niniejszej pracy planowano również przeprowadzić badania zmian aktywności katalitycznej izoenzymu P450 3A4 w obecności badanych bisakrydyn w układzie komórkowym, podobnie jak w przypadku enzymów UGT, stosując homogenaty komórek HepG2, czyli ludzkiego nowotworu wątroby. Ekspresję wybranych izoenzymów P450, w tym P450 3A4 w linii komórek HepG2 oraz aktywność P450 3A4 w badanych komórkach przedstawiono na Rys.IV.66.



Rys.IV.66. A - ekspresja wybranych enzymów metabolizujących z rodziny P450 w komórkach linii HCT116, HT-29 i HepG2. Metoda: Reverse Transcript PCR, Sposób przedstawienia: elektroforeza w żelu agarozowym (1,5%, 40 min, 90V; próbka: 5 μ l), B – Aktywność enzymu P450 3A4 w komórkach linii HCT116, HT-29 i HepG2. Metoda: Oznaczono na podstawie zdolności do przemiany 20 μ M standardowego substratu testosteronu (6- β -hydroksylacja), czas inkubacji 24 godziny, liczba komórek 2 mln – wartości uśrednione pochodzące z różnych doświadczeń [Pawłowska i in. 2020]

W pierwszej kolejności sprawdzono aktywność izoenzymu P450 3A4 w otrzymanych homogenatach linii HepG2 stosując specyficzny substrat dla P4503A4, czyli testosteron. Niestety, na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż homogenaty komórek HepG2 nie wykazały zdolności do 6- β -hydroksylacji testosteronu, lecz okazały się nieaktywne względem substratu specyficznego. Zatem nie wykazały aktywności izoenzymu P450 3A4. Wyniki badań zestawiono z wynikami otrzymanymi w wyniku przeprowadzenia analogicznej reakcji wobec ludzkiego enzymu rekombinantowego P4503A4 i zamieszczono w postaci zestawu chromatogramów (Rys.IV.67). Wobec powyższego, przeprowadzenie dalszych etapów badań było niemożliwe do zrealizowania.

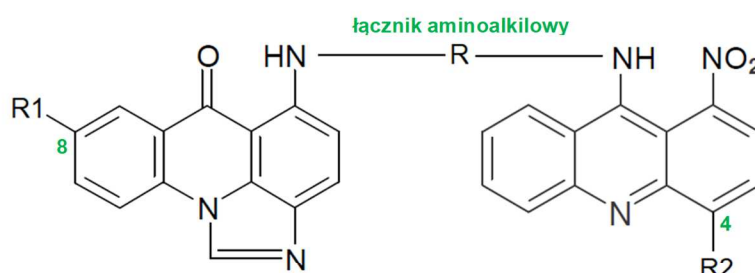


Rys.IV.67. Brak aktywności dla 6- β -hydroksylacji wobec homogenatów otrzymanych z komórek HepG2 w zależności od A - stężenia białek w homogenacie HepG2 i B – od stężenia substratu. Aktywność wyznaczana wobec specyficznego substratu dla izoenzymu P450 3A4 (testosteron) oraz w obecności 2 mM NADPH; czas inkubacji 2 godziny. Analiza prowadzona przy 245 nm metodą RP- HPLC (Waters). Wyniki zestawiono z danymi otrzymanymi podczas przeprowadzenia analogicznej reakcji wobec ludzkiego izoenzymu rekombinantowego P450 3A4 po 30 min inkubacji.

V. DYSKUSJA

Badania zrealizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią kontynuację prac prowadzonych od wielu lat w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej zmierzających do zaprojektowania pochodnej akrydyny o silnym działaniu przeciwnowotworowym i jednocześnie niskiej toksyczności ogólnej, co zaowocowałoby otrzymaniem skutecznego i zarazem bezpiecznego leku przeciwnowotworowego. Związki o atrakcyjnych właściwościach otrzymano w Katedrze już wcześniej, jak np. pierwszy polski lek przeciwnowotworowy Ledakrin^R oraz preparat Symadex^R, który został skierowany do II fazy badań klinicznych. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy są kontynuacją powyższych badań, stanowiąc analizę wybranych właściwości fizykochemicznych i biologicznych dla nowej, zsyntetyzowanej w zespole Profesora Jerzego Konopy grupy związków – niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny (UAs) o wykazanej wysokiej aktywności przeciwnowotworowej [Konopa i in. 2019, Paluszkiewicz i in. 2020]. Celem przeprowadzonych badań było określenie podatności tych związków na przemiany metaboliczne oraz ich zdolności do modulacji aktywności katalitycznej wybranych enzymów metabolizujących leki (DME), w tym leki przeciwnowotworowe, w układach modelowych i w komórkach nowotworowych.

Związki wybrane do badań (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) stanowią grupę pochodnych bisakrydyny, UAs zawierających w swojej strukturze dwa pierścienie: imidazoakrydonu i 9-amino-1-nitroakrydyny połączone łańcuchem aminoalkilowym. Struktury chemiczne tych związków różnią się między sobą obecnością grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia 1-nitroakrydyny, obecnością grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu lub strukturą łańcucha aminoalkilowego wiążącego pierścienie pochodnych imidazoakrydonu oraz 1-nitroakrydyny (Rys.V.1.).



C-2028:	R1 = H	R = (CH ₂) ₃ NCH ₃ (CH ₂) ₃	R2 = H
C-2041:	R1 = H	R = (CH ₂) ₃ piperazynyl(CH ₂) ₃	R2 = H
C-2045:	R1 = OH	R = (CH ₂) ₃ NCH ₃ (CH ₂) ₃	R2 = CH ₃
C-2053:	R1 = H	R = (CH ₂) ₃ NCH ₃ (CH ₂) ₃	R2 = CH ₃

Rys.V.1. Struktury chemiczne badanych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny [Konopa i in. 2019, Paluszkiewicz i in. 2020]

Przyjęte różnice w strukturze związków pozwalają na przeprowadzenie badań nad zależnością pomiędzy strukturą chemiczną a zdolnością niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny do m. in. tworzenia soli rozpuszczalnych w roztworach wodnych, ale przede wszystkim do ulegania przemianom metabolicznym w komórkach nowotworowych oraz do modulacji aktywności katalitycznej enzymów metabolizujących leki. Dowiedziono bowiem już wcześniej, że zarówno w przypadku monomerycznych pochodnych akrydyny, jak i symetrycznych bisakrydyn nawet niewielkie zmiany w strukturze prowadziły do radykalnych zmian we właściwościach biologicznych tych związków [Cholody i in. 1995 i 1996, Hariprasha i in. 2007, Dopierała i in. 2011].

V.1. Właściwości fizykochemiczne niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny

Określenie rozpuszczalności nowego związku, mającego szansę stać się w przyszłości lekiem, wymaga m. in. informacji o właściwościach kwasowo-zasadowych, potencjalnego leku [Chmiel i in. 2019]. Zastosowanie wybranych rozpuszczalników nie jest przypadkowe, gdyż docelowo potencjalny lek musi rozpuszczać się w płynach fizjologicznych o właściwościach zbliżonych do wody o odpowiednim pH [Arnott i in. 2013]. Określenie rozpuszczalności badanych związków w wodnych roztworach o odpowiednim pH zmierzało, więc do opracowania najlepszej procedury ich rozpuszczania, którą następnie stosowano do dalszych etapów badań niniejszej pracy.

Wykazano, że wszystkie badane związki (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) były rozpuszczalne w wodzie redestylowanej, 50% etanolu i DMSO do stężenia 10 mM. Ponadto bardzo łatwo rozpuszczały się w 0,05 M buforze mrówczanu amonu (pH ok. 3,4), który jest jednym z dwóch, oprócz metanolu eluentem stosowanym w analizie HPLC. Zatem wykazano, że związki te nie będą osadzać się na stosowanej kolumnie chromatograficznej. Jednak badane pochodne bisakrydyny wykazały niższą rozpuszczalność w roztworach buforowych o pH 7,4 tj. w 0,1 M buforze fosforanowo-potasowym oraz w buforach: 0,05 M Tris-zasada i 0,1 M HEPES, które często stosowane są w eksperymentach związanych z przemianami metabolicznymi leków. Na tej podstawie do dalszych badań metabolizmu badanych związków zastosowano trój etapową procedurę rozpuszczania: (i) sporządzenie 10 mM roztworu preparatu w DMSO, (ii) rozcieńczenie roztworu DMSO w buforze HEPES, pH 7,4 dla otrzymania 1 mM roztworu podstawowego oraz (iii) przygotowanie końcowych roztworów związku o stężeniu 0,001-0,05 mM w buforze HEPES, pH 7,4, które stosowano bezpośrednio do inkubacji związków. Należy również nadmienić, iż najlepszą rozpuszczalnością w tych warunkach odznaczał się związek C-2045 (pochodna z grupą hydroksylową w pierścieniu imidzoakrydonu), najłagodniejszą zaś C-2041 (pochodna z dodatkowym pierścieniem piperazynowym w łańcuchu łączącym monomery).

Rozpuszczalność leków jest czynnikiem decydującym o ich dostępności farmaceutycznej [Lipinski i in. 1997, Chmiel i in. 2019]. Lek o charakterze zasadowym lepiej wchłania się w górnym odcinku układu pokarmowego ze względu na kwaśne środowisko tworząc sole. Leki o charakterze kwasowym lepiej rozpuszczać się będą w dolnym odcinku układu pokarmowego,

gdzie panuje środowisko zasadowe [Abuhelwa i in. 2017]. Wartość pKa pozwala oszacować przewidywaną przyswajalność leku w danym środowisku fizjologicznym [Chmiel i in. 2019].

Właściwości kwasowo-zasadowe badanych związków określono metodą miareczkowania spektrofotometrycznego. Zależność między maksymalną absorbancją molową (mAU) a wartościami pH dla trzech związków (C-2028, C-2041 i C-2045) wskazała na dwie ostre zmiany absorbancji dla każdego związku. Zmiany te odpowiadają równowagom kwasowo-zasadowym heterocyklicznych atomów azotu i pozwoliły określić wartości pKa (Rys. IV.12.). Wartości te wskazują, że druga równowaga kwasowo-zasadowa (wartości pKa w zakresie pH 6,3 – 6,8) odgrywać będzie kluczową rolę w zachowaniu badanych związków w warunkach fizjologicznych. Przy pH > 7 będą one ulegać deprotonowaniu, co zmniejsza rozpuszczalność w wodzie. Będą więc wykazywały różną rozpuszczalność w warunkach fizjologicznych o zmiennym środowisku pH: we krwi (pH 7,4), w wątrobie (pH 7,2), w żołądku (pH w zakresie 1-3), w jelicie cienkim (pH ok. 5-7), w jelicie krętym i grubym (pH ok. 7-8). Co najważniejsze, pH różnych typów komórek nowotworowych jest bardzo często niższe niż 7, dlatego rozpuszczalności tych związków powinny być lepsze w komórkach nowotworowych niż w komórkach zdrowych.

Stabilność badanych związków w 0,05 mM roztworach wodnych inkubowanych w temperaturze 4°C, pokojowej i w 37 °C do 24 godzin była wysoka, wykazano natomiast, że nie należy przechowywać pochodnych bisakrydyny w czystym DMSO, lecz za każdym razem sporządzać ten roztwór na świeżo. Jednak roztwór związku sporządzony najpierw w DMSO, a potem 100-200 razy rozcieńczony wodą redestylowaną jest trwały. Wykazano również, że nieodpowiednie przechowywanie roztworów badanych związków, w roztworze wodnym lub DMSO sprawia, że związki w niewielkim stopniu ulegają hydrolizie, w wyniku której następuje rozerwanie wiązania C9-N w strukturze 9-amino-1-nitroakrydyny, a w efekcie N-dealkilacja prowadząca do monomerów. Produkty rozpadu zidentyfikowano jako pochodne imidazoakrydonu (Z₁) i 1-nitro-9-akrydonu (Z₂).

V.2. Metabolizm badanych pochodnych bisakrydyny w układach bezkomórkowych

Analiza metabolizmu potencjalnego leku, w szczególności leku przeciwnowotworowego stanowi nieodłączny element badań przedklinicznych, czyli na wczesnych etapach wdrażania na rynek nowych leków [Andrade i in. 2016]. Poznanie szlaków przemian metabolicznych nowych związków, między innymi z udziałem izoenzymów cytochromu P450, monoooksygenaz flawinowych oraz UDP-glukuronylotransferaz umożliwia przewidywanie indukowanych przez nie efektów toksycznych. Ponadto określenie ilości i aktywności powstających metabolitów pozwala na wykazanie, która z form leku odpowiedzialna jest za właściwy efekt terapeutyczny [Ortiz 2015, Tang i in. 2017, Xiao i in. 2018].



V.2.1. Metabolizm I fazy pochodnych bisakrydyny

We wstępnych badaniach metabolizmu pochodnych bisakrydyny wobec enzymów mikrosomalnych różnego pochodzenia, stwierdzono, że były one reaktywne zarówno wobec szczurzych, jak i ludzkich aktywowanych mikrosomów wątroby inkubowanych z kofaktorem NADPH (I faza metabolizmu). Najefektywniej przemiany badanych związków zachodziły wobec enzymów frakcji mikrosomalnej, aktywowanej deksametazonem, DEX czyli o podwyższonej ekspresji izoenzymów cytochromu P450 3A. Ponadto wykazano, że związek C-2028 był metabolizowany znacznie szybciej niż C-2045. Zatem wydaje się, że obecność grupy hydroksylowej w strukturze badanej bisakrydyny chroni przed degradacją enzymatyczną wobec izoenzymów cytochromu P450. Wynik ten jest nieoczekiwany, biorąc pod uwagę generalną możliwość enzymatycznego utleniania grup hydroksylowych do rodników alkoksylowych i dalszych przemian utleniających do chinonów [Smythies i in. 1998, Cosa i in. 2008]. Jednak ten wniosek jest zgodny z wcześniejszymi wynikami otrzymanymi w naszym zespole, które wskazywały, że grupa hydroksylowa w monomerze imidazoakrydynonu C-1311 nie ulegała bezpośrednio metabolicznemu utlenianiu w obecności izoenzymów P450 [Mazerska i in. 2003, Potęga i in. 2011, Pawłowska i in. 2014].

Określono również udział rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450 2C19 i 3A4 w metabolizmie badanych pochodnych. Stwierdzono, że wszystkie związki były wrażliwe wobec badanych izoenzymów, chociaż ich zdolność do transformacji była zróżnicowana. W porównaniu z C-2028 (analog demetylowy) i C-2053 (analog nie zawierający grupy hydroksylowej) związek C-2045 wykazał najniższą podatność na metabolizm. Natomiast związek C-2041 (analog z pierścieniem piperazynom w łączniku) najszybciej ulegał metabolizmowi wobec P450 2C19 i 3A4, dając jeden główny produkt o bardzo wysokiej intensywności. Otrzymane produkty zidentyfikowano na podstawie analizy ESI-MS, a następnie ESI-QTOF-MS jako cztery typy metabolitów:

- **M1:** produkt redukcji grupy nitrowej do aminowej (dimery z liniowym łącznikiem),
- **M2:** N-tlenek z dodatkowym 5-członowym pierścieniem (dimery z liniowym łącznikiem)
- **M3:** produkt demetylacji w łańcuchu łączącym monomery (dimery bez grupy hydroksylowej w pierścieniu imidazoakrydonu lub bez pierścienia piperazynowego w łączniku),
- **M4:** monomeryczna pochodna imidazoakrydonu (analogi bez CH₃ w pierścieniu 1-nitroakrydyny).

Modyfikacje w strukturze większości badanych związków nastąpiły w pierścieniu 1-nitroakrydyny, co potwierdza znane wcześniej z literatury informacje wskazujące, że monomeryczne pochodne 1-nitroakrydyny wykazują podatność na metabolizm wobec enzymów P450 [Gorlewska i in. 2001, Wiśniewska i in. 2008 i 2012, Potęga i in. 2011, Fedejko-Kap i in.

2011b]. Należy również wnioskować, że obecność grupy hydroksylowej w pierścieniu imidazoakrydonu i/lub metylowej w pierścieniu 1-nitroakrydyny skutkuje obniżeniem podatności bisakrydyn na metabolizm wobec cytochromu P450. Dane te również są zgodne z dostępną literaturą, bowiem monomery 1-nitroakrydonu posiadające grupę metylową w pozycji 4 pierścienia były mniej podatne na metabolizm I fazy [Wiśniewska i in. 2012], a hydroksy pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu tj. C1311 oraz C1305 nie metabolizowały wobec izoenzymów P450 [Fedejko-Kap i in. 2011b, Potęga i in. 2011]. Ponadto obecność pierścienia piperazynowego w łączniku aminoalkilowym powoduje, że pochodna bisakrydyny metabolizuje dużo szybciej i inaczej w porównaniu z analogiczną pochodną posiadającą łącznik liniowy. W tym przypadku następuje ograniczenie ilości powstających metabolitów do jednego produktu, a przemiana zachodzi w wyniku N-demetylacji, a nie modyfikacji w pierścieniu 1-nitroakrydyny.

Przebadano również podatność badanych związków na przemiany metaboliczne wobec drugiej, ważnej, lecz nieczęsto branej pod uwagę grupy enzymów należących do I fazy metabolizmu i obecnych we frakcji mikrosomalnej wątroby tj. monooksygenaz flawinowych, FMO. Udało się wykazać, że badane pochodne bisakrydyny, ale tylko te posiadające w swojej strukturze liniowy łącznik (C-2028/C2045 i C-2053) metabolizują wobec ludzkiego rekombinantowego izoenzymu FMO1 do N-tlenku na atomie azotu w łączniku (M5). Ponieważ ekspresja FMO1 w wątrobie człowieka zostaje wyciszona w momencie narodzin, a więc i wkład tego izoenzymu w metabolizm badanych związków u człowieka dorosłego będzie ograniczony do tkanek poza wątrobą m. in. nerek i jelita cienkiego [Phillips i in. 2008]. Ponadto żaden z badanych związków nie ulegał bezpośredniej biotransformacji wobec izoenzymu FMO3 i FMO5. Brak reaktywności wobec FMO5 jest zgodny z danymi literaturowymi, które podają, że ludzka izoforma FMO5 wykazuje nietypowe cechy aktywności dla FMO [Fiorentini i in. 2017]. Natomiast brak bezpośredniego metabolizmu związków C-2028, C-2045 i C-2053 wobec FMO3 odróżnia je od wcześniej przebadanych w naszym zespole monomerycznych pochodnych akrydyny [Fedejko-Kap i in. 2011b, Potęga i in. 2011]. Może to wynikać z faktu, iż izoenzym FMO1 charakteryzuje się szerszym zakresem substratowym w porównaniu z FMO3 [Phillips i in. 2008]. Dodatkowa analiza otrzymanych wyników wykazała, że zarówno wobec FMO1, jak i FMO3 dla trzech badanych związków (C-2028, C-2045 i C-2053) otrzymano jednak dodatkowy metabolit, przy jednoczesnym zaniku opisywanego wcześniej monomerycznego produktu hydrolizy - Z₁. Przeprowadzono analiza ESI-MS wykazała, że powstał N-tlenek produktu Z₁. Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie we wcześniejszych pracach naszego zespołu, gdzie wykazano, że monomeryczne pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu wykazują podatność na metabolizm z udziałem FMO1 i FMO3 w przeciwieństwie do FMO5 [Fedejko-Kap i in. 2011b, Potęga i in. 2011].

W niniejszej dyskusji należy dodać, że monooksygenazy flawinowe, będąc enzymami z grupy I fazy, pełnią funkcję detoksykacyjną. Są zaangażowane w metabolizm wielu leków, pestycydów i substancji toksycznych, poprzez przekształcanie lipofilowych ksenobiotyków w polarne i łatwo wydalone metabolity z dodatkowym atomem tlenu [Fiorentini i in. 2017]. Wkład ten

był przez długi czas niedoceniany. Nieślusnie sądzono, iż jest on incydentalny, a oznaczanie zakresu substratu izoenzymów FMO jest zbędne wobec roli cytochromu P450 [Krueger i in. 2005, Siddens i in. 2014]. Nie brano też pod uwagę, że w przeciwieństwie do aktywności cytochromów P450 aktywność FMO nie jest zazwyczaj modyfikowana przez leki [Philips i in. 2008 i 2019]. Zatem stosowanie leków metabolizowanych przez monooksygenazy flawinowe w terapii wielolekowej może nie dawać, jak w obecności innych enzymów niekorzystnych interakcji lek-lek.

V.2.2. Metabolizm II fazy pochodnych bisakrydyny wobec UDP-glukuroniltransferaz

Kolejną grupą enzymów mikrosomalnych komórek wątroby, mogących uczestniczyć w przemianach metabolicznych badanych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny (C-2028/C-2041/C-2045/C-2053) są enzymy drugiej fazy - UDP-glukuroniltransferazy, UGT stanowiące rodzinę enzymów detoksykacyjnych [Rowland i in. 2013, Yang i in. 2017]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że spośród 9 przetestowanych ludzkich izoenzymów rekombinantowych UGT, jedynie związek C-2045 (analog z grupą hydroksylową) metabolizuje wobec wybranych izoenzymów UGT1A tj. UGT1A1, UGT1A9 i UGT1A10, dając jeden produkt o zmienionym w stosunku do substratu widmie UV-vis (M6). Natomiast żaden z badanych izoenzymów z podrodziny UGT2B nie przejawiał aktywności wobec tego i pozostałych związków. Wynikało to najprawdopodobniej z braku potencjalnego miejsca glukuronidacji w ich strukturze, a dokładnie z nieobecności grupy hydroksylowej w pierścieniu imidazoakrydonu. Wykazano bowiem, że otrzymany metabolit związku C-2045 jest produktem O-glukuronidacji, czyli podstawienia grupy hydroksylowej resztą kwasu glukuronowego (analiza ESI-MS produktu).

Wykazana podatność związku C-2045 na glukuronidację stanowi ważny element poznania szlaku przemian metabolicznych tego związku w aspekcie jego aktywności biologicznej, bowiem glukuronidacja jest jedną z głównych ścieżek detoksykacji wielu leków, w tym leków przeciwnowotworowych m.in. irinotekanu, belinostautu, czy epirubicyny [Mróz i in. 2015, Goey i in. 2016, Wang i in. 2017, Allain i in. 2020]. Co ciekawe, w prezentowanych badaniach najwyższą aktywność wobec związku C-2045 wykazywał izoenzym UGT1A10, którego ekspresja ma miejsce głównie w jelicie cienkim i grubym [Ohno i in. 2009, Court i in. 2012]. Pozwala to przypuszczać, że głównym miejscem glukuronidacji związku C-2045 u pacjenta byłoby jelito. Analogiczne właściwości wykazano w naszym zespole wcześniej podczas badań nad metabolizmem związków C-1311 i C-1305, czyli monomerycznych, hydroksylowych pochodnych imidazo- i triazoloakrydonu [Fedejko-Kap i in. 2012]. Należy dodać, że z powyższych powodów aktywność enzymów UGT często przyczynia się do zmniejszenia biodostępności podanego leku, gdyż pochodne glukuronidów są łatwo wydalane z organizmu. Jednak istnieją wyjątki od tej reguły, bowiem glukuronidy morfiny, czy tamoksyfenu wykazują niezmienną, a nawet wyższą aktywność biologiczną w stosunku do substratu [Paul i in. 1989, Ogura i in. 2006]. Także glukuronidacja „naszego” związku monomerycznego, C-1305 skutkowałą wzrostem jego aktywności cytotoksycznej [Pawłowska i in. 2013].

V.3. Metabolizm pochodnych bisakrydyny w komórkach nowotworowych jelita

Podatność C-2045 na glukuronidację, w szczególności wobec UGT1A10, zbadano również w komórkach nowotworowych linii HCT116, HCT116-1A10 i HT-29, czyli niewykazujących, jak i wykazujących sztuczną, oraz naturalną ekspresję izoenzymów UGT, głównie izoenzymu UGT1A10 [Pawłowska i in. 2020]. Dla porównania takie same badania przeprowadzono dla związków nie wykazujących podatności na glukuronidację tj. C-2028, C-2041 i C-2053 w celu przeprowadzenia analizy kinetycznej penetracji badanych związków z pożywki komórkowej do wnętrza komórki.

Dla realizacji powyższych zadań w pierwszej kolejności oznaczono cytotoksyczność badanych związków (C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053) wobec komórek wymienionych linii. Wyniki wykazały bardzo wysoką aktywność cytotoksyczną tych związków (zakres IC_{50} : 0,007-0,07 μ M). Natomiast obecność grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia 1-nitroakrydyny obniżyła cytotoksyczność pochodnej bisakrydyny, co zbieżne jest z danymi dostępnymi w literaturze [Wiśniewska i in. 2012]. Zaskakujący był wynik dla związku C-2045 (analogu zawierającego grupę metylową i hydroksylową) w porównaniu z tym otrzymanym dla związku C-2053 (analogu zawierającego tylko grupę metylową). Okazało się bowiem, że obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu w strukturze dimeru bisakrydyny spowodowała nieznaczny spadek aktywności cytotoksycznej, natomiast w przypadku monomerycznych pochodnych imidazoakrydonu grupa hydroksylowa indukowała efekt odwrotny, czyli podwyższenie aktywności cytotoksycznej związku [Cholody i in. 1992 i 1996].

W następnym etapie komórki HCT116, HCT116-1A10 lub HT-29 inkubowano ze związkiem C-2045 (pochodną hydroksylową) przez określony czas. Po ekspozycji komórek na związek analizowano zarówno składy ekstraktów komórkowych, jak i pożywek po hodowli, ponieważ według danych literaturowych zarówno leki, jak i metabolity mogą być w komórce magazynowane, bądź wyrzucane na zewnątrz. [Raynal i in. 2010, Wiśniewska i in. 2012, Pawłowska i in. 2013, Mróz i in. 2018]. W obu liniach komórkowych wykazujących aktywność izoenzymów UGT (HCT116-1A10, ok. 2,5 % i HT-29 ok. 55%) wykazano obecność O-glukuronidu związku C-2045, powstającego z różną wydajnością. Najefektywniej przemiana zachodziła w komórkach HT-29, wykazujących ponad 50% aktywność izoenzymów UGT. Ponadto stężenie otrzymanego glukuronidu było znacznie wyższe w pożywce niż w ekstraktach komórkowych, co świadczy o efektywnym usuwaniu metabolitu poza komórkę.

Należy podkreślić, że zdolność leku do glukuronidacji jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w chemioterapii nowotworów [Mazerska i in. 2016]. Podwyższona dezaktywacja leku w wyniku wysokiej aktywności/ekspresji UGT w komórkach nowotworowych utrudnia osiągnięcie stężenia terapeutycznego aktywnej formy leku w komórkach nowotworowych i przyczynia się do występowania tzw. lekooporności tkanek guza [Raynal i in. 2010, Fujii i in. 2019, Allain i in. 2020]. Zatem obserwowane obniżenie aktywności cytotoksycznej związku C-2045 w porównaniu do innych badanych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny może być

związane z podatnością tego związku na glukuronidację. Zwraca to uwagę na możliwość wystąpienia w niektórych przypadkach nowotworów jelita grubego i płuc oporności związanej z detoksykacją [Raynal i in. 2010, Mróz i in. 2018]. Z drugiej strony związek C-2045 byłby odpowiednim lekiem dla osób, u których ekspresja izoenzymu UGT1A10 jest wyższa w tkance zdrowej niż w tkance nowotworowej. Glukuronidacja chroniłaby komórki prawidłowe przed toksycznym działaniem związku, natomiast komórki nowotworowe wykazujące brak dostatecznej ochrony, byłyby bardziej podatne na działanie potencjalnego leku C-2045. Wykazano na przykład, że UGT1A10 ulega różnej ekspresji w komórkach prawidłowych i nowotworu złośliwego. Była ona istotnie niższa w rakach piersi w porównaniu z próbkami prawidłowymi [Starland-Davenport i in. 2008].

Pozostałe badane związki tj. C-2028, C-2041 i C-2053 nie wykazały podatności na glukuronidację w komórkach nowotworowych badanych powyżej linii HCT116, HCT116-1A10 i HT-29. Natomiast penetracja związków z wnętrza komórki do pożywki inkubacyjnej wykazała różną kinetykę dla każdego związku. W przypadku niepodstawionego C-2028 niezależnie od zastosowanej linii komórkowej (HCT116/HT-29) i stężenia związku (5/25/50 μM), w miarę wydłużania czasu inkubacji (do 24 godzin) następował znaczny spadek stężenia związku C-2028 w pożywce komórkowej. Natomiast po traktowaniu komórek HT-29 stężeniem 5 μM zaobserwowano, iż po 48 godzinach związek powrócił do składu pożywki komórkowej. Tak więc stężenie leku w ekstrakcie komórkowym było wysokie do 24 godzin i znacznie spadło po 48 godzinach. W przypadku następnego związku C-2053 (pochodna z grupą metylową w pozycji 4 pierścienia 1-nitroakrydyny), zaobserwowano po krótkim czasie inkubacji niskie stężenie substratu w pożywce komórkowej, natomiast wysoki poziom C-2053 stwierdzono w ekstraktach komórkowych. Wynik wskazuje, że związek ten jest bardzo szybko dostarczany do komórki i później, do 24 godzin, jego poziom nadal wzrasta, a po kolejnych 24 godzinach tylko nieznacznie spada. Można zatem przypuszczać, że obecność grupy metylowej w pierścieniu 1-nitroakrydyny związku C-2053 podwyższa jego liofilowość na tyle, że potencjalny lek zostaje zatrzymany wewnątrz komórki. Natomiast w przypadku C-2041 (pochodnej z dodatkowym pierścieniem w łączniku) jego stężenie w pożywce hodowlanej do 17 godzin jest wysokie, natomiast po tym czasie następuje gwałtowny spadek. Wynika stąd, że związek ten wnika do komórki najwolniej spośród badanych UAs, co wskazuje, iż obecność nieliniowego łącznika w strukturze bisakrydyny zmienia na tyle jej właściwości fizykochemiczne, że utrudnione jest wnikanie leku do komórki.

Podczas inkubacji związków w komórkach zaobserwowano również śladowe ilości produktów monomerycznych (M4). Wydaje się jednak, że nie są to produkty bezpośredniego metabolizmu pochodnych bisakrydyny. Bardziej prawdopodobnym jest, iż w wyniku inkubacji w 37°C badane związki w pewnym stopniu uległy hydrolizie do produktów Z₁ i Z₂, a następnie produkt Z₁ uległ N-demetylacji do metabolitu M4. Jednakże wniosek ten wymagałby przeprowadzenia głębszych badań. Wobec powyższego, wnioskuję, że za efekt cytotoksyczny trzech badanych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny bez grupy hydroksylowej

w pierścieniu imidazoakrydonu odpowiada niezmienną formą związków, a więc, aby wykazać efekt przeciwnowotworowy nie wymagają one wcześniejszej enzymatycznej aktywacji.

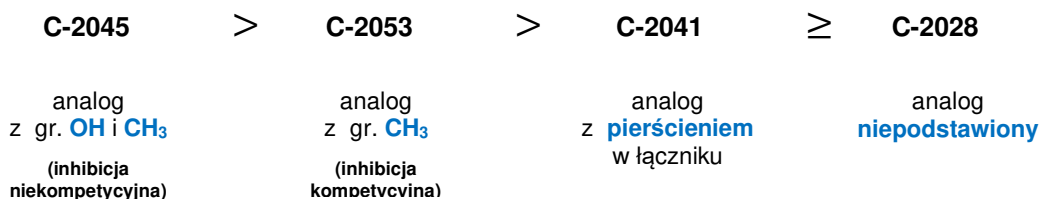
V.4. Modulacje aktywności katalitycznej enzymów metabolizujących leki

Działanie chemioterapeutyków może polegać również na indukcji zmian aktywności enzymów metabolizujących, które wynikają z ich bezpośredniego oddziaływania z białkami enzymatycznymi lub z indukowanych przez nie modulacji ekspresji odpowiednich genów, w tym szlaków sygnałowych receptorów jądrowych [Yang i in. 2017, Bejowska i in. 2018]. Elementem ważnym w tym aspekcie jest fakt, iż schematy terapii przeciwnowotworowych często opierają się na przyjmowaniu kilku leków jednocześnie. Może to być powodem wystąpienia u pacjenta skutków niepożądanych, w tym wynikających z interakcji lek-lek. Mają one miejsce wówczas, gdy jeden lek obniża lub podwyższa aktywność drugiego leku poprzez wpływ na enzymy metabolizujące. Dużym utrudnieniem w doborze odpowiedniego leku dla terapii jest również niejednorodność tkanki nowotworowej pod względem aktywności i ekspresji enzymów metabolizujących [Pawłowska i in. 2020]. Skutkuje to odmienną odpowiedzią różnych rodzajów komórek nowotworowych na terapię, jak i występowaniem różnic międzyosobniczych w zdolności do metabolizowania leków. Te ostatnie różnice wynikają m.in. z polimorfizmów genetycznych (SNP) [Ekhart i in. 2009, Li i in. 2011]. Dlatego też w terapii przeciwnowotworowej planowanie schematu leczenia wymaga nie tylko uwzględnienia możliwych zmian w aktywności danego leku w organizmie lecz również dopasowania indywidualnej terapii do danego pacjenta [Indelman-Sundberg i in. 2005, Husznoi in. 2011, Allain i in. 2020].

Wobec powyższego, wszystkie cztery związki zostały przebadane pod kątem ich zdolności ich modulacji aktywności katalitycznej wybranych izoenzymów z rodziny cytochromów P450 2C19 i 3A4 oraz UGT: 1A1, 1A4, 1A6, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15 i 2B17.

V.4.1. Modulacja aktywności izoenzymu P450 3A4 w układach bezkomórkowych

Wpływ związków C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 na aktywność izoenzymu P450 3A4 zbadano wobec ludzkiego izoenzymu rekombinantowego w dwóch etapach, (i) stosując różne stężenie badanej bisakrydyny (0,002-0,05 mM) i stałe stężenie specyficznego substratu (testosteronu) – 0,1mM oraz (ii) stosując zmienne stężenie specyficznego substratu (0,02-0,2 mM) i wybrane stężenia badanej bisakrydyny (0,005 i 0,001 lub 0,01 mM). Analiza otrzymanych wyników wykazała, że badane związki w dużym stopniu hamują aktywność izoenzymu P450 3A4. Zaobserwowano ich zróżnicowany wpływ na aktywność izoenzymu P450 3A4 w zależności od struktury (Rys.V.1.). Zdecydowanie wyróżniającym okazał się związek C-2045, który już przy najniższych stężeniach wykazał znaczny spadek aktywności katalitycznej P450 3A4, nawet o 90%. Hamowanie izoenzymu P450 3A4 obserwowano niezależnie od zastosowanego stężenia specyficznego substratu, natomiast wzrost stężenia badanej bisakrydyny powodował dalszy wzrost inhibicji.



Rys.V.1. Wpływ badanych niesymetrycznych bisakrydyn na aktywność izoenzymu P450 3A4 w zależności od struktury związków.

Zarówno obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu, jak i metylowej w pozycji 4 pierścienia 1-nitroakrydyny powoduje wzmożenie efektu inhibicji. Otrzymane wyniki wydają się zgodne z dotychczasowymi danymi literaturowymi, ponieważ wcześniej wykazano, że hydroksylowe pochodne akrydonów (C-1311 i C-1305) hamują aktywność katalityczną izoenzymu P450 3A4 [Niemira i in. 2013, Potęga i in. 2016a i 2016b]. Ponadto pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny (C-1748) powodowała również znaczny spadek aktywności P450 3A4 [Borowa-Mazgaj i in. 2017]. W literaturze poza tym istnieją informacje, że związki zawierające w swojej strukturze pierścień piperazynowy posiadają również zdolności do modulacji aktywności izoenzymów P450, a w szczególności P450 3A4 [Nagy i in. 2011, Bolles i in. 2014]. Wydaje się, iż wywierany przez badane UAs wpływ na aktywność P450 3A4 może mieć istotne znaczenie kliniczne, szczególnie w przypadku terapii wielolekowych. Biorąc pod uwagę fakt, iż izoenzym P450 3A4 metabolizuje ok. 70% stosowanych obecnie leków [Bolles i in. 2014], badane związki mogą mieć wpływ na stopień metabolizmu tych leków, a w konsekwencji na końcowy efekt stosowanych z ich udziałem terapii [Indelman-Sundberg i in. 2005, Li i in. 2011, Manikandan i in. 2018].

V.4.2. Modulacja aktywności izoenzymu UGT1A1 i UGT2B7 w układach bezkomórkowych

Zdolność badanych pochodnych bisakrydyny, C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 do modulacji aktywności ludzkich rekombinantowych izoenzymów UGT1A1 i UGT2B7 również zbadano dwuetapowo, (i) stosując różne stężenie badanej bisakrydyny (0,01-0,05 mM) i stałe stężenie (0,1 mM) specyficznego substratu dla UGT1A1 (SN-38) i UGT2B7 (EPI) oraz (ii) stosując zmienne stężenie standardowego substratu - TFK (0,02-0,2 mM) i wybrane stężenia badanej bisakrydyny (0,005 i 0,01 mM). Pierwszy etap analizy wyników wykazał, że, badane związki w dużym stopniu hamują aktywność katalityczną zarówno izoenzymu UGT1A1, jak i UGT2B7, niezależnie od zastosowanego stężenia bisakrydyny (w zakresie stężeń 0,01mM do 0,05 mM). Zatem dodatek badanych związków zmienia aktywność tych izoenzymów lecz wzrost ich stężenia nie zawsze powoduje wzmocnienie tego efektu. Podobny efekt, odnotowano wcześniej dla monomerycznej pochodnej triazoloakrydonu, C1305, zawierającej grupę hydroksylową. Związek ten wykazywał zdolność inhibicji izoenzymów UGT1A1, jak i 2B7 [Bejrowska i in. 2018, Fedejko i in. 2012]. Również inne wcześniejsze badania nad pochodnymi manometrycznymi wykazały, że związki C-1311 (pochodna imidazoakrydonu z grupą hydroksylową) i C-1748 (pochodna

4-metylo-1-nitroakrydyny) obniżały aktywność izoenzymu UGT2B7 [Bejrowska i in. 2018, Mróz i in. 2018].

Natomiast w przypadku zastosowania dużo niższego stężenia (0,005 mM) trzech badanych pochodnych bisakrydyny tj. C-2028, C-2045 i C-2053 przy zmiennym stężeniu standardowego substratu, TFK odnotowano różnice w porównaniu z powyższymi wynikami (Rys.V.2.).

UGT1A1			
	0,005 mM UA	< 0,1 mM TFK	> 0,1 mM TFK
C-2028	analog niepodstawiony	↑ indukcja w całym zakresie stężeń	
C-2045	analog z gr. CH ₃ i OH	↑ indukcja	↓ inhibicja
C-2053	analog z gr. CH ₃		
UGT2B7			
	0,005 mM UA	< 0,1 mM TFK	> 0,1 mM TFK
C-2028	analog niepodstawiona	↑ indukcja w całym zakresie stężeń	
C-2045	analog z gr. CH ₃ i OH	↓ inhibicja w całym zakresie stężeń	
C-2053	analog z gr. CH ₃	↑ indukcja w całym zakresie stężeń	

Rys.V.2. Wpływ 0,005 mM roztworu niesymetrycznych bisakrydyn na aktywność izoenzymu UGT1A1 i UGT2B7 w zależności od struktury badanego związku i stężenia standardowego substratu.

Wyraźnie widać, iż niepodstawiona pochodna bisakrydyny, C-2028 w bardzo niskich zakresach stężeń (< 0,01 mM) powoduje indukcję obu izoenzymów. Natomiast to samo stężenie pochodnych posiadających w swojej strukturze grupę metylową w pozycji 4 pierścienia 1-nitroakrydyny (C-2045 i C-2053) wykazują wzrost aktywności izoenzymu UGT1A1 w ograniczonym zakresie stężeń standardowego substratu, tj. do 0,1 mM TFK. Powyżej tego stężenia związki C-2045 i C-2053 hamują aktywność izoenzymu UGT1A1. Należy również nadmienić, że efekt hamowania tego izoenzymu był zdecydowanie silniejszy w przypadku analogu zawierającego dodatkową grupę hydroksylową (C-2045). W przypadku izoenzymu UGT2B7 przy stężeniu bisakrydyny niższym niż 0,01 mM tylko dla analogu hydroksylowego zaobserwowano silną inhibicję jego aktywności, natomiast w przypadku analogów nie posiadających grupy hydroksylowej w pozycji 8 pierścienia imidazoakrydonu zaobserwowany efekt był odwrotny. Za pomocą programu GraphPad Prism 5 określono mechanizm inhibicji izoenzymów UGT1A1 i UGT2B7 przez badane związki. Najlepiej dopasowanym modelem inhibicji UGT1A1 dla C-2028, C-2045 i C-2053 okazała się inhibicja substratowa. Modulacja aktywności UGT2B7 dla związków C-2028 i C-2053 przebiega również według modelu inhibicji substratowej, lecz dla C-2045 odpowiednim modelem okazał się model inhibicji kompetycyjnej.

Ciekawym okazał się również fakt, iż przy stężeniu 0,01 mM badanych związków otrzymano dwa rozbieżne wyniki, bowiem dla większości AUs raz wskazywały one na inhibicję, a raz na indukcję aktywności badanych izoenzymów UGT1A1 i UGT2B7 przez UAs (Rys.V.3.).

UGT1A1/UGT2B7

Dla 0,1 mM TFK

0,005 mM AU	0,01 mM AU	0,02 mM AU	0,05 mM AU
↑ indukcja	↑ indukcja / ↓ inhibicja	↓ inhibicja	↓ inhibicja

Rys.V.3. Wpływ stałego stężenia standardowego substratu (0,1 mM TFK) na aktywność katalityczną izoenzymu UGT1A1 i UGT2B7 w zależności od stężenia AU.

Wiadomo bowiem, że dwa roztwory mogą zawierać te same związki, ale mogą wykazywać odmienne właściwości, jeśli proporcje tych związków w roztworze są różne. Dowiedziono również, że niektóre substancje w roztworach o niskim stężeniu występują jako pojedyncze cząsteczki, natomiast konsekwentne zwiększanie stężenia w roztworze prowadzi do ich spontanicznej organizacji w agregaty [Zia i in. 2016, Jiang i in. 2017]. W zależności od środowiska roztworu grupują się tak, aby z fazą rozpraszającą kontaktowały się tylko grupy hydrofilowe bądź grupy polarne są wewnątrz cząstki. Właściwości układu wówczas ulegają znaczącej zmianie. Mamy do czynienia z pewnego rodzaju nieciągłością właściwości fizykochemicznych roztworu. [Duley i in. 2000, Evans i in. 2000]. Na tej podstawie można przypuszczać, iż stężenie 0,01 mM badanych związków jest stężeniem „przejściowym”, w którym być może następuje zmiana uporządkowania układu, przez co związek występuje częściowo w formie zagregowanej i częściowo w postaci pojedynczych cząsteczek. Ze względu na fakt, iż stopień agregacji nie zawsze jest dokładnie taki sam, to przy 0,01 mM stężeniu bisakrydyny w mieszaninie raz przeważa dostępność dla enzymu fragmentów bisakrydyny odpowiedzialnych za hamowanie, a raz za indukowanie aktywności danego izoenzymu.

Należy dodać, że wykazane modulowanie aktywności izoenzymów UGT1A1 i UGT2B7 jest istotne nie tylko ze względu na możliwe oddziaływania lek-lek, ale również oddziaływania lek-substancje naturalne. Izoenzym UGT1A1 jako jedyny, odpowiedzialny jest za glukuronidację bilirubiny, natomiast aktywność UGT2B7 odpowiedzialna jest na metabolizm m.in. związków o aktywności hormonalnej: androsteronu, estradiolu, epitestosteronu i kwasów tłuszczowych [Yang i in. 2017, Korprasertthaworn i in. 2019]. Obniżona aktywność UGT1A1 powoduje zaburzenia w metabolizmie bilirubiny, co związane jest występowaniem chorób takich jak zespół Criglera-Najjara i zespół Gilberta. Problem ten dotyczy głównie pacjentów posiadających allel UGT1A1*28, charakteryzujący się obniżoną transkrypcją genu [Strassburg 2008, Yang i in. 2017]. Do leków, których stosowanie prowadzi do hiperbilirubinemii, czyli podwyższonego poziomu bilirubiny w osoczu należą m.in. inhibitory proteazy HIV oraz inhibitory kinazy tyrozynowej [Abou-

Alfa i in. 2011, Peer i in. 2012, Croom i in. 2009, Qosa i in. 2018, Patal i in. 2020]. Natomiast UGT2B7 uczestniczy również w metabolizmie ok. 35% leków podlegających glukuronidacji. Glukuronidacja katalizowana przez UGT2B7 jest główną ścieżką metabolizmu m.in. przeciwnowotworowej epirubicyny, antyretrowirusowej zydowudyny oraz opioidów, takich jak morfina i kodeina [Yang i in. 2017, Fortenberry i in. 2019].

Innym aspektem jest obserwacja w praktyce klinicznej różnic w ekspresji UGT pomiędzy tkanką prawidłową, a nowotworową. Doniesienia literaturowe wskazują na niższy poziom ekspresji i aktywności katalitycznej izoenzymu UGT2B7 w tkankach nowotworu wątroby oraz nerek w porównaniu do tkanek prawidłowych [Lu i in. 2015, Margaillan i in. 2015]. Zatem łączenie w terapii badanych niesymetrycznych pochodnych z chemioterapeutykami ulegającymi detoksykacji z udziałem UGT2B7 pozwoliłoby na osiągnięcie wyższych stężeń aktywnych form tych chemioterapeutyków w tkance nowotworowej, niż w otaczającej tkance prawidłowej. Byłby to więc efekt poprawiający selektywność terapii przeciwnowotworowej. Ponadto wydaje się, iż konieczny jest dobór optymalnego stężenia badanych związków aby wyeliminować ryzyko wystąpienia pod ich wpływem efektów ubocznych, jak wspomniana powyżej hiperbilirubinemia. Dla niższych stężeń związków C-2028, C-2045 i C-2053 nie zaobserwowano bowiem obniżenia aktywności izoenzymu UGT1A1, a EC_{50} tych związków w porównaniu z ich monomerami jest 10-krotnie niższe.

V.4.3. Modulacja aktywności enzymów UGT w układach komórkowych

Badania nad zdolnością wybranych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny (C-2028, C-2045 i C-2053) do modulacji aktywności izoenzymów UGT przeprowadzono w homogenatach z komórek linii HepG2 (nowotwór wątroby) oraz w komórkach raka jelita – HT-29. Obie linie odznaczają się wysoką ekspresją enzymów UGT, choć zróżnicowaną pod względem ilości izoenzymów UGT1A1, 1A9, A10 i 2B7 (Rys.IV.61). W przypadku homogenatu komórek HepG2 wykazano, że obecność w mieszaninie reakcyjnej zarówno 0,005 mM, jak i 0,02 mM związków C-2028, C-2045 i C-2053 skutkowałą wzrostem aktywności katalitycznej izoenzymów UGT do 200%. Zatem badane związki wykazały znaczącą indukcję aktywności izoenzymów UGT względem standardowego substratu, TFK. Wzrost wydajności badanej O-glukuronidacji w komórkach linii HepG2 obserwowano wcześniej również po traktowaniu komórek związkiem C-1311 lub C-1305, czyli monomerycznymi pochodnymi hydroksy akrydonu [Bejrowska i in. 2018].

Natomiast po 24 godzinnej inkubacji komórek HT-29 ze związkiem C-2028, C-2045 lub C-2053 obserwowano wyraźny spadek udziału procentowego glukuronidu TFK wraz z rosnącym stężeniem badanych związków, co świadczy o hamowaniu aktywności katalitycznej izoenzymów UGT obecnych w komórkach HT-29. Najsilniejszy efekt obserwuje się przy stężeniu powyżej 1 μ M. Natomiast przy niższych stężeniach hamowanie zdolności glukuronidacyjnej dla większości związków nie jest już tak intensywne. Dla związku niepodstawionego, czyli C-2028 przy najniższych stężeniach ($\leq 0,1 \mu$ M) inhibicja wynosiła 10 - 15 %, zaś przy wyższych stężeniach

aż 80%. Związek C-2053, analog metylowy znacząco hamował aktywność badanych izoenzymów w całym zakresie stężeń: 0,001; 0,01; 0,1; 1 i 5 μM . Inny natomiast efekt na aktywność izoenzymów UGT wywarł związek C-2045 (analog metylowy z dodatkową grupą hydroksylową). Dla najwyższego stężenia, 5 μM , nastąpił spadek aktywności enzymów UGT o 55%, zaś dla pozostałych stężeń, przeciwnie, indukcja wynosiła 30-40%. Dla porównania, w przypadku monomerycznych pochodnych akrydonu 10 μM stężenie związku C-1311 i C-1305 powodowało indukcję izoenzymów UGT w komórkach HT-29, a wyższe stężenia powodowały hamowanie działania enzymów [Bejrowska i in. 2018]. Natomiast monomeryczna pochodna 1-nitroakrydyny, C-1748 w zakresie stężeń 1-100 μM obniżała zdolność katalityczną UGT [Mróz i in. 2018].

Wykazano więc, że w zależności od charakteru tkanki, a właściwie poziomu ekspresji izoenzymów UGT w danej tkance, badane związki mogą powodować odmienny efekt. Zatem szczegółowe analizy ekspresji i aktywności izoenzymów UGT pełnią ważną rolę w wyborze odpowiedniej procedury chemioterapii dla danego pacjenta.

V.5. Podsumowanie

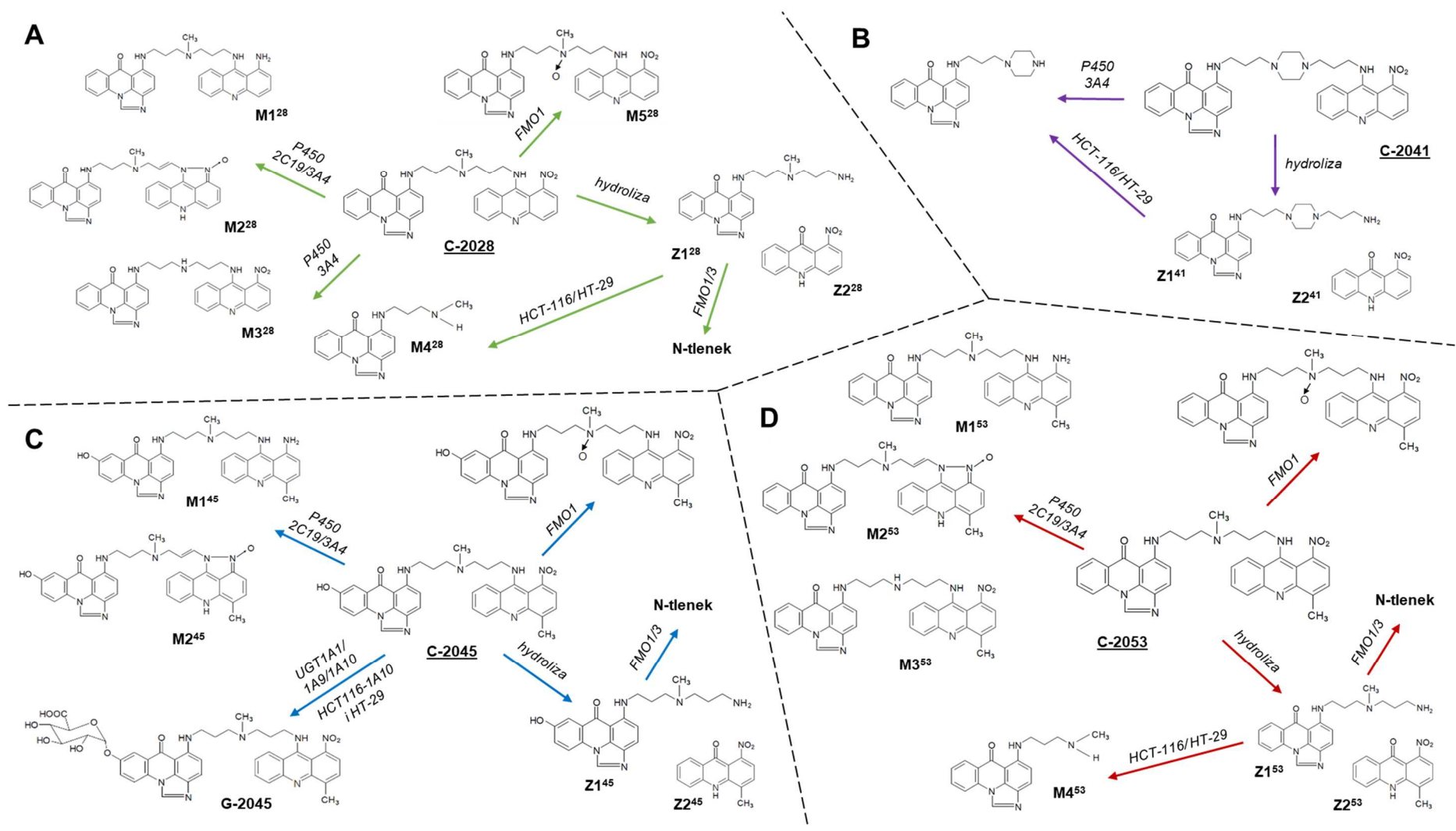
Przedstawione po raz pierwszy w niniejszej pracy wyniki badań przemian metabolicznych nowej grupy dimerycznych pochodnych akrydyny – niesymetrycznych bisakrydyn (UAs) o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej pozwoliły poznać unikalne właściwości tych związków. Wykazano, że:

1. **Badane związki wykazują w porównaniu z monomerycznymi pochodnymi akrydyny zupełnie inne właściwości fizykochemiczne** takie jak stabilność, rozpuszczalność, czy pKa, co wymagało optymalizacji bądź opracowania nowych metod badawczych.
2. Wykazano, że **związki C-2028, C-2041, C-2045 i C-2053 w pewnym stopniu ulegają przemianom metabolicznym I fazy wobec izoenzymów cytochromu P450 2C19 oraz 3A4**. Brak reaktywności na grupie hydroksylowej wobec P450 wydaje się być unikalną cechą 8-hydroksyimidzoakrydynonu zarówno w strukturach monomerycznych (np. C-1311), jak i dimerycznych (C-2045). Fakt ten należy wziąć pod uwagę w analizie zależności pomiędzy aktywacją potencjalnego leku UA i/lub jego dezaktywacją a finalnym efektem biologicznym.
3. **Trzy spośród badanych pochodnych: C-2028, C-2045 i C-2053 (analogi z liniowym łańcuchem łączącym) wykazały podatność na przemiany metaboliczne wobec FMO1**, w przeciwieństwie do związku C-2041, który posiada dodatkowy pierścień piperazynowy w łączniku i nie jest wrażliwy na FMO.
4. Natomiast **związek C-2045 (pochodna z grupą hydroksylową) jako jedyny ulegał metabolizmowi II fazy, glukuronidacji, wobec izoenzymów UGT1A1, UGT1A9 i 1A10**.

Glukuronid związku C-2045 otrzymano **również w komórkach nowotworowych jelita** tj. liniach HCT116-1A10 oraz HT-29.

5. **Pochodne bez grupy hydroksylowej, związki (C-2028, C-2041 i C-2053)** nie wykazały istotnej podatności na metabolizm w komórkach HCT116-1A10 oraz HT-29, co wskazuje że **dla wywołania efektu cytotoksycznego nie wymagają one uprzedniej aktywacji i nie ulegają też detoksykacji II fazy**. Co więcej, wykazano, że związki te po wnikięciu do komórki i następującej dłuższej inkubacji były ponownie wyrzucane do pożywki hodowlanej w formie niezmetabolizowanej.
6. **Za słabą podatność badanych związków na metabolizm z udziałem izoenzymów P450 i w komórkach nowotworowych odpowiada prawdopodobnie obecność pierścienia imidazoakrydonu**, bowiem badane wcześniej monomeryczne pochodne imidazoakrydonu bez grupy hydroksylowej nie były wrażliwe na działanie tego enzymu
7. Należy również podkreślić, że **otrzymane metabolity pochodzące od badanych niesymetrycznych bisakrydyn generalnie zachowały strukturę dimerów** (Rys.V.3.).
8. Zaobserwowano poza tym, że **wszystkie cztery związki wykazały zdolność do modulacji aktywności katalitycznej wybranych rekombinantowych izoenzymów I i II fazy: P450 3A4, UGT1A1 oraz UGT2B7**.
9. **Indukcję zmian aktywności izoenzymów UGT zaobserwowano też w homogenatach komórek HepG2 oraz w komórkach linii HT-29**.

Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki będące realizacją postawionego powyżej celu pracy mają przede wszystkim znaczenie poznawcze, ale jednocześnie przyczynią się do opracowania w przyszłości nowych, skutecznych, ale też bezpiecznych schematów terapii przeciwnowotworowych, w których stosowane będą niesymetryczne pochodne bisakrydyny.



Rys.V.4. Proponowane szlaki biotransformacji i struktury metabolitów związków A - C-2028, B - C-2041, C - C-2045 i D - C-2053 powstające wobec enzymów metabolizujących w układach bezkomórkowych i komórkach HCT116, HCT116-1A10 oraz HT-29.

WYKAZ LITERATURY

Abou-Alfa GK, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Lathia C, Voloitis D, Sanderson S, Moscovici M, Ricci S (2011) Safety and efficacy of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and Child-Pugh A versus B cirrhosis, *Gastrointest. Cancer Res.*, 4, s. 40-44.

Abuhelwa AY, Williams DB, Upton RN, Foster DJ (2017) Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption, *Eur J Pharm Biopharm*, 112, s. 234-248.

Agarwal V, Kommaddi RP, Valli K, Ryder D, Hyde TM, Kleinman JI, 3, Strobel HW, Ravindranath V (2008) Drug Metabolism in Human Brain: High Levels of Cytochrome P4503A43 in Brain and Metabolism of Anti-Anxiety Drug Alprazolam to Its Active Metabolite, *PLOS ONE* 3(6), s. e2337

Allain EP, Rouleau M, Lévesque E, Guillemette C (2020) Emerging roles for UDP-glucuronosyltransferases in drug resistance and cancer progression, *Br J Cancer*, 122, s. 1277–1287.

Andrade EL, Bento AF, Cavalli J, Oliveira SK, Freitas CS, Marcon R, Schwanke RC, Siqueira JM, Calixto JB (2016) Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies, *Braz J Med Biol Res*, 49, s. 1-9.

Antonini I, Polucci P, Magnano A, Gatto B, Palumbo M, Menta E, Pescalli N, Martelli S (2003) Design, synthesis, and biological properties of new bis(acridine-4-carboxamides) as anticancer agents, *J. Med. Chem.* 46, 3109-3115.

Antonini I, Polucci P, Magnano A, Sparapani S, Martelli S (2004) Rational design, synthesis, and biological evaluation of bis(pyrimido[5,6,1-de]acridines) and bis(pyrazolo[3,4,5-k]acridine-5-carboxamides) as new anticancer agents, *J. Med. Chem.* 47, s. 5244-5250.

Arnott JA, Kumar R, Planey SL (2013) Lipophilicity indices for drug development, *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.*, 1, s. 31-36.

Bachmann K (2009) *Drug Metabolism, Pharmacology Principles and Practice*, Academic Press, s. 131-173.

Baghban R, Farajnia S., Rajabibazl M. Ghasemi Y, Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances, *Mol Biotechnol*, 61, s. 365–384

Basseville A, Preisser L, de Carné Trécesson S, Boisdron-Celle M, Gamelin E, Coqueret O, Morel A (2011) Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells, *Mol Cancer*, 6, s. 10-80.

Bejrowska A, Pawłowska M, Mróz A, Mazerska Z (2018) Modulation of UDP-glucuronidation by acridinone antitumor agents C-1305 and C-1311 in HepG2 and HT29 cell lines, despite slight impact in noncellular systems, *Pharmacol. Rep.*, 70, s. 470–475.

Berger B, Marquardt H, Westendorf J (1996) Pharmacological and toxicological aspects of new imidazoacridinone antitumor agents, *Cancer Res.*, 56(9), s. 2094-2104.

Bock K.W. (2003) Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects, *Biochem Pharmacol*, 66, s. 691-696.

Bolles AK, Fujiwara R, Briggs ED, Nomeir AA, Frurge LL (2014) Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochrome P450 3A4 by two Piperazine-containing Compounds, *Drug Metab Dispos*, 42 s. 2087-2096.

Borowa-Mazgaj B, Mróz A, Augustin E, Paluszkiwicz E, Mazerska Z (2017) The overexpression of CPR and P450 3A4 in pancreatic cancer cells changes the metabolic profile and increases the cytotoxicity and pro-apoptotic activity of acridine antitumor agent, C-1748. *Biochem. Pharmacol.*, 142, s. 21–38.

Budin-Ljøsne I, Harris J.R. (2015) Ask Not What Personalized Medicine Can Do for You – Ask What You Can Do for Personalized Medicine. *Public Health Genom.*, 18, s. 131– 138.

Buters JT, Korzekwa KR, Kunze KL, Omata Y, Hardwick JP, Gonzalez FJ (1994) cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus, *Drug Metab Dispos.*, 22, s. 688-692.

Chamberlain F, Cojocar E, Scaranti M, Noujaim J, Constantinou A, Thway K, Fisher C, Messiou C, Strauss DC, Miah A, Zaidi S, Benson C, Gennatas S, Jones RL (2020) Adult soft tissue myoepithelial carcinoma: treatment outcomes and efficacy of chemotherapy, *Med Oncol*, 37, 13.

Chanawong A, Mackenzie PI, McKinnon RA, Hu DG, Meech R (2017) Exemestane and Its Active Metabolite 17-Hydroxexemestane Induce UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B17 Expression in Breast Cancer Cells, *J Pharmacol Exp Ther*, 361, s. 482-491.

Chen R (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond, *Biotechnol Adv.*, 30(5), s. 1102-1107.

Cheng J, Wan D, Gu J, Gong Y, Yang S, Hao D, Yang L (2006) Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: Application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro, *Protein Expr Purif.*, 47 s. 467-76.

Chmiel T, Mieszkowska A, Kempieńska-Kupczyk D, Kot-Wasik A, Namieśnik J, Mazerska Z (2019) The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components, *Microchem J*, 146, s. 393-406.

Cho HJ, Cho HY, Kim KJ, Kim MH, Kim SW, Kang BS (2011) Structural and functional analysis of bacterial flavin-containing monooxygenase reveals its ping-pong-type reaction mechanism, *J Struct Biol.* 175(1), s. 39-48.

Cholody WM, Martelli S, Konopa J (1992) Chromophore-modified antineoplastic imidazoacridinones. Synthesis and activity against murine leukemias, *J. Med. Chem.*, 35, s. 378–382.

Cholody WM, Hernandez L, Hassner L, Scudiero DA, Djurickovic DB, Michejda CJ (1995) Bisimidazoacridones and Related Compounds: New Antineoplastic Agents with High Selectivity against Colon Tumors, *J. Med. Chem.*, 38, s. 3043 – 3052.

Cholody WM, Horowska B, Paradziej-Łukowicz J, Martelli S, Konopa J (1996) Structure-activity relationship for antineoplastic imidazoacridinones: synthesis and antileukemic activity in vivo, *J. Med. Chem.*, 39, s. 1028–1032.

Chung F, Mai CW, Ng PY, Leong CO (2016) Cytochrome P450 2W1 (CYP2W1) in Colorectal Cancers, *Curr Cancer Drug Tar*, 16, s. 71-78.

Cosa G, Scaiano JC (2008) Reactivity of adrenaline toward alkoxy radicals and carbonyl triplet states, *Org Biomol Chem*, 6, s. 4609-4614.

Court MH, Zhang X, Ding X, Yee KK, Hesse LM, Finel M (2012) Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues, *Xenobiotica*, 42, s. 266-277.

Crespi CL, Penman BW (1997) Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug–drug interactions, *Adv Pharmacol.*, 43, s. 171-188.

Croom KF, Dhillon S, Keam SJ (2009) Atazanavir. A Review of its use in the management of HIV-1, *Infection. Drugs*, 69 s. 1107-1140.

Dai P, Luo F, Jiang H, Wang L, Zhang G, Zhu L, Hu M, Wang X, Lu L, Liu Z (2015) Species- and gender-dependent differences in the glucuronidation of a flavonoid glucoside and its aglycone determined using expressed UGT enzymes and microsomes, *Biopharm Drug Dispos*, 36, s. 622–635.

de Man FM, Goey AKL, van Schaik RHN, Mathijssen RHJ, Bins S (2018) Individualization of irinotecan treatment: A review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics, *Clin Pharmacokinet*, 57, s. 1229-1254.

Denny WA, Atwell GJ, Baguley BC, Wakelin LPG (1985) Potential antitumor agents. 44. Synthesis and antitumor activity of new classes of diacridines: importance of linker chain rigidity for DNA binding kinetics and biological activity, *J. Med. Chem.* 28, s. 1568 – 1574.

Dates CR, Fahmi T, Pyrek SJ, Yao-Borengasser A, Borowa-Mazgaj B, Bratton SM, Kadlubar SA, Mackenzie PI, Haun RS, Radomska-Pandya A (2015) Human UDP-Glucuronosyltransferases: Effects of altered expression in breast and pancreatic cancer cell lines, *Cancer Biol Ther.*, 16(5), s. 714-23.

Dhers L, Ducassou L, Boucher JL, Mansuy D (2017) Cytochrome P450 2U1, a very peculiar member of the human P450s family, *Cell. Mol. Life Sci.*, 74, s. 1859–1869.

Dopierala A, Wrosz P, Mazerski J (2011) Acridines as antitumor drugs, *Postepy Hig Med Dosw*, 65, s. 263-269.

Ducassou L, Jonasson G, Dhers L, Pietrancosta N, Ramassamy B, Xu-Li Y, Loriot MA, Beaune P, Bertho G, Lombarda M, Mansuya D, André F, Boucher JL (2015) Expression in yeast, new substrates, and construction of a first 3D model of human orphan cytochrome P450 2U1: Interpretation of substrate hydroxylation regioselectivity from docking studies, *BBA*, 1850, s. 1426–1437

Duley WW (2000) Chemistry in grain aggregates: a source of complex molecules?, *Mon. Notices Royal Astron. Soc.*, 319(3), s. 791-796.

Ekhart C, Rodenhuis S, Smits P, Beijnen J, Huitema A, (2009) An overview of the relations between polymorphism in drug metabolizing enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment, *Cancer Treat Rev*, 35, s.18-31.

Eswaramoorthy S, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase, *PNAS*, 103(26), s. 9832-9837.

Evans GT, Vaida V (2000) Aggregation of water molecules: Atmospheric implications, *J. Chem. Phys* 113(16), s. 6652-6659.

Fahmi OA, Ripp SL (2010) Evaluation of models for predicting drug-drug interactions due to induction, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 6(11), s.1399-416.

Fedejko B, Mazerska Z (2011a) UDP-glukuronylotransferazy, białka siateczki śródplazmatycznej – struktura i mechanizm działania. *Post. Bioch.*, 57, s. 41-48.

Fedejko-Kap B, Niemira M, Radomska-Pandya A, Mazerska Z (2011b) Flavin Monooxygenases, FMO1 and FMO3, Not Cytochrome P450 Isoenzymes, Contribute to Metabolism of Anti-Tumour Triazoloacridinone, C-1305, in Liver Microsomes and HepG2 Cells, *Xenobiotica*, 41(12), s. 1044-1055.

Fedejko-Kap B, Bratton SM, Finel M, Radomska-Pandya A, Mazerska Z (2012) The role of human UDP-glucuronosyltransferases in the biotransformation of the triazoloacridinone and imidazoacridinone antitumor agents C-1305 and C-1311: highly selective substrates for UGT1A10. *Drug Metab Dispos*, 40, 1736-1743.

Fekry MI, Xiao Y, Berg JZ, Guengerich FP (2019) A Role for the Orphan Human Cytochrome P450 2S1 in Polyunsaturated Fatty Acid w-1 Hydroxylation Using an Untargeted Metabolomic Approach, *Drug Metab Dispos*. 47(11), s. 1325-1332.

Fennema D, Phillips IR, Shephard EA (2016) Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease, *Drug Metab Dispos*, 44, s. 1839–50.

Ferguson LR, Turner PM, Denny WA (1987) Mutagenicity of Nitracridine analogues in *Salmonella typhimurium*: mutational specificity and activation by bacterial enzymes and rat liver S-9, *Mutation Res.*, 187, s. 1-9.

Ferrer-Miralles N, Villaverde A (2013) Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue, *Microb Cell Fact.*, 12, 113, DOI: 10.1186/1475-2859-12-113.

Florentini F, Romero E, Fraaije MW, Faber K, Hall M, Mattevi A (2017) Baeyer-Villiger Monooxygenase FMO5 as Entry Point in Drug Metabolism, *ACS Chem. Biol.* 12(9), s. 2379-2387.

Flaten HK, Kim HS, Campbell , Hamilton L, Monte AA (2016) CYP2C19 drug-drug and drug-gene interactions in ED patients, *Am J Emerg Med*. 34(2), s. 245-249.

- Fronczak A** (2016) Medycyna personalizowana. Mity, fakty, rekomendacje, Łódź, s. 7, 62
- Fujii H, Yamada Y, Watanabe D, Matsuhashi N, Takahashi T, Yoshida K, Suzuki A** (2019) Dose adjustment of irinotecan based on UGT1A1 polymorphisms in patients with colorectal cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, 83, s. 123–129.
- Fujiwara R, Yokoi T, Nakajima M** (2016) Structure and Protein–Protein Interactions of Human UDP-Glucuronosyltransferases, *Front Pharmacol.*, 7, 388, s. 1-15.
- Futunde OA, Brown S** (2020) The Role of CYP450 Drug Metabolism in Precision Cardio-Oncology, *Int J Mol Sci*, 21, 604, doi:10.3390/ijms21020604.
- Gabriel I** (2020) 'Acridines' as New Horizons in Antifungal Treatment, *Molecules*, 25, 1480, doi:10.3390/molecules25071480
- Gamage SA, Spicer JA, Atwell GJ, Finlay GJ, Baguley BC, Denny WA** (1999) Structure–Activity Relationships for Substituted Bis(acridine-4-carboxamides): A New Class of Anticancer Agents, *J. Med. Chem.* 42, s. 2383-2393.
- Garg R, Denny WA, Hansch C** (2000) Comparative QSAR Studies on Substituted Bis-(acridines) and Bis-(phenazines)-Carboxamides: A New Class of Anticancer Agents, *Bioorg. Med. Chem*, 8, s. 1835 – 1839.
- Gillam EM** (2008) Engineering cytochrome P450 enzymes, *Chem Res Toxicol.*, 21, s. 220-31.
- Gniazdowski M, Filipski J, Chorąży M** (1979) Nitracridine, Mechanisms of Action of Antieukaryotic and Antiviral Compounds, *Antibiotics*, 5 / Springer, Berlin, Heidelberg.
- Goey AK, Figg WD** (2016) UGT genotyping in belinostat dosing, *Pharmacol Res.*, 105, s. 22-27.
- Gomez-Lechón MJ, Donato MT, Lahoz A, Castell JV** (2008) Cell lines: A tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab.* 9: 1-11.
- Gonzalez FJ, Tukey RH** (2006) Drug metabolism. In Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Eleventh edition New York, McGraw-Hill: Medical Publishing Division., s. 71-91
- Gorlewska K, Mazerska Z, Sowiński P, Konopa J** (2001) Products of Metabolic Activation of the Antitumor Drug Ledakrin (Nitracrine) in Vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, 14(1), s. 1–10.
- Guengerich FP, Tang Z, Salamanca-Pinzón SG, Cheng Q** (2010) Characterizing proteins of unknown function: orphan cytochrome P450 enzymes as a paradigm, *Mol Interv.*, 10(3), s. 153-63
- Guengerich FP, Cheng Q** (2011) Orphans in the Human Cytochrome P450 Superfamily: Approaches to Discovering Functions and Relevance in Pharmacology, *Pharmacol Rev* 63, s. 684–699
- Guengerich FP** (2020) A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs, *Toxicol Res*, <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00056-z>
- Guillemette C, Lévesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V** (2010) UGT genomic diversity: beyond gene duplication, *Drug Metab Rev*, 42, s. 22-42.
- Guthrie L, Gupta S, Daily J, Kelly L** (2017) Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism, *npj Biofilms and Microbiomes*, 27, s. 1-8.
- Hajjar ER, Cafiero AC, Hanlon JC** (2007) Polypharmacy in Elderly Patients, *Am J of Geriatric Pharmacotherapy*, 5(4), s. 345-351.
- Han J, Kima DH, Seo JS, Kimc IIC, Nelson DR, Puthumana J, Lee JS** (2017) Assessing the identity and expression level of the cytochrome P450 20A1 (CYP20A1) gene in the BPA-, BDE-47, and WAF-exposed copepods, *Tigriopus japonicus* and *Paracyclopsina nana*, *Comp Bioch Phys C*, 193, s. 42–49.
- Hanioka N, Yamamoto M, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S** (2010) Functional characterization of human cytochrome P450 2E1 allelic variants: In vitro metabolism of benzene and toluene by recombinant enzymes expressed in yeast cells, *Arch Toxicol.*, 84, s. 363-371.

Hanlon SP, Friedberg T, Wolf CR, Ghisalba O, Kittelmann M (2007) Recombinant yeast and bacteria that express human P450s: Bioreactors for drug discovery, development, and biotechnology, *Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications*, 10, s. 231-52.

Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB (2006) In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy, *Toxicol. In Vitro*, 20, s.135–153.

Hariprakash HK, Kosakowska-Cholody T, Meyer C, Cholody WM, Stinson SF, Tarasova NI, Michejda CJ (2007) Optimization of Naphthalimide-imidazoacridone with Potent Antitumor Activity Leading to Clinical Candidate (HKH40A, RTA 502), *J. Med. Chem.* 50, s. 5557 – 5560.

Hrycay EG, Bandiera SM (2008) *Cytochrome P450 Enzymes, Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties*, Wiley, New York.

Hu DG, Mackenzie PI, Lu L, Meech R, McKinnon RA (2015) Induction of Human UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 Gene Expression by Cytotoxic Anticancer Drugs in Liver Cancer HepG2 Cells, *Drug Metab. Dispos.*, 43, s. 660-668.

Hu DG, Rogers A, Mackenzie PI (2014) Epirubicin upregulates UDP-glucuronosyltransferase 2B7 expression in liver cancer cells via the p53 pathway, *Mol. Pharmacol.*, 85, s. 887-897

Huszno J, Nowara E, Suwiński R (2011) Znazenie polimorfizmów genowych w chemioterapii nowotworów, *Nowotwory J. Oncol.*, 61(2), s. 141-149.

Indelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C (2005) Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy, *Phil Trans R Soc B*, 360, s. 1563-1570.

Isambert N, Campone M, Bourbouloux E, Drouin M, Major A, Yin W, Loadman P, Capizzi R, Grieshaber C, Fumoleau P (2010) Evaluation of the safety of C-1311 (SYMADEX) administered in phase 1 dose escalation trial as a weekly infusion for 3 consecutive weeks in patients with advanced solid tumours, *Eur J Cancer*, 46(4), s. 729-734.

Isambert N, Campone M, Bourbouloux E, Drouin M, Major A, Loadman P, Capizzi R, Grieshaber C, Fumoleau P (2006) Evaluation of the safety of C-1311 administered in a phase 1 dose escalation trial as a weekly infusion for 3 consecutive weeks in patients with advanced solid tumours, *J. Clin. Oncol.*, 24(18), 2069.

Isin EM, Guengerich FP (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1770, s. 314-329.

Jiang L, Cao S, Cheung P, Zheng X, Leung C, Peng Q, Shuai Z, Tang BZ, Yao S, Huang X (2017) Real-time monitoring of hydrophobic aggregation reveals a critical role of cooperativity in hydrophobic effect, *Nat Commun* 8, 15639.

Kalsotra A, Turman CM, Kikuta Y, Strobel HW (2004) Expression and characterization of human cytochrome P450 4F11: Putative role in the metabolism of therapeutic drugs and eicosanoids, *Toxicol Appl Pharm*, 199, s. 295– 304.

Kamataki T (2006) Genetic polymorphism of CYP2A6 and tobacco-related cancer risk: from the establishment of genetically engineered Salmonella to large scale epidemiology, *Genes Environ.*, 28 s. 77-83.

Kato H (2020) Computational prediction of cytochrome P450 inhibition and induction, *Drug Metab Pharmacokinet*, 35, s. 30-44

Katzung B (2012) *Basic & Clinical Pharmacology* 12e, McCraw-Hill, s. 53-68, 731, 955, 960, 1149.

King C, Rios G, Green M, Tephly T (2000) UDP-glucuronosyltransferase, *Curr. Drug Metab.*, 1 (2), s. 143–161.

Konopa J, Wysocka-Skrzela Tiwari RK (1981) 9-Alkilamino-1-nitroacridine derivatives, European patent, 01910914.9-2101-US0105199, US patent, 6.589.961 B2.

Konopa, JK, Horowska B, Paluszkiewicz E, Borowa-Mazgaj B, Augustin E, Skwarska A, Mazerska Z (2017) Asymmetric bis-acridines with antitumor activity and use thereof. European Patent No, EP 3 070 078 B1, 04.10.2017.

Konopa, JK, Horowska B, Paluszkiewicz E, Borowa-Mazgaj B, Augustin E, Skwarska A, Mazerska Z (2019) Asymmetric bis-acridines with antitumor activity and their uses. US Patent No. 10,202,349 B2, 12.02.2019.

Korprasertthaworn P, Chau N, Nair PC, Rowland A, Miners JO (2019) Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzymes by kinase inhibitors: Effects of dabrafenib, ibrutinib, nintedanib, trametinib and BBF 1202, *Biochem. Pharmacol.*, 169, 113616, doi: 10.1016/j.bcp.2019.08.018..

Krueger SK, Williams DE (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism, *Pharmacol. Therap.*, 106, s. 357– 387.

Kumar GN, Surapaneni S (2001) Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev.* 21:397-411.

Kumar S (2015) Computational identification and binding analysis of orphan human cytochrome P450 4X1 enzyme with substrates, *BMC Res. Notes*, 8(9) s. 1-10.

Kuśnierczyk H, Cholody WM, Paradziej-Lukowicz J, Radzikowski C, Konopa J (1994) Experimental antitumor activity and toxicity of the selected triazolo- and imidazoacridinones, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 42, s. 415–423.

Lai WG, Farah N, Moniz GA, Wong YN (2011) A Baeyer-Villiger oxidation specifically catalyzed by human flavin-containing monooxygenase 5, *Drug. Metab. Dispos.*, 39, s. 61-70.

Landmann H, Proia DA, He S, Ogawa LS, Kramer F, Beißbarth T, Grade M, Gaedcke J, Ghadimi M, Moll U, Dobbstein M (2014) UDP-glucuronosyltransferase 1A expression levels determine the response of colorectal cancer cells to the heat shock protein 90 inhibitor ganetespib, *Cell Death Dis.*, 5, e1411

Lee CA, Kost TA, Serabjit-Singh CJ (1996) Recombinant baculovirus strategy for coexpression of functional human cytochrome P450 and P450 reductase, *Methods Enzymol.*, 272, s. 86-95.

Leow, JWH, Chan ECY (2019) Atypical Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450 enzymes: A focus on substrate inhibition, *Biochem. Pharmacol.* ,169, 113615, doi:10.1016/j.bcp.2019.08.017.

Li J, Martin H Bluth (2011) Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy, *CPPM*, 4, s. 11-33.

Lino Cardenas CL, Renault N, Farce A, Cauffiez C, Allorge G, Lo-Guidice J, Lhermitte M, Chavatte P, Broly F, Chevalier D (2011) Genetic polymorphism of CYP4A11 and CYP4A22 genes and in silico insights from comparative 3D modelling in a French population, *Gene*, 487, s. 10-20.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Freeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, s. 3-25.

Liu X, Testa B, Fahr A (2011) Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, *Pharm. Res.*, 28, s. 962-977.

Lorente A, Vazquez YG, Fernandez MJ, Ferrandez A (2004) Bisacridines with aromatic linking chains. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, s. 4307-4312.

Lu L, Zhou J, Shi J, Peng XJ, Qi X, Wang Y, Li FY., Zhou FY, Liu L, Liu ZQ (2015) Drug-metabolizing activity, protein and gene expression of UDP-glucuronosyltransferases are significantly altered in hepatocellular carcinoma patients, *PLOS ONE*, 10, e0127524.

Manikandan P, Nagini S (2018) Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review, *Current Drug Targets*, 19, s. 38-54.



Margaillan G, Rouleau M, Fallon JK, Caron P, Villeneuve L, Turcotte V, Smith PC, Joy MS, Guillemette C (2015) Quantitative profiling of human renal UDP-glucuronosyltransferases and glucuronidation activity: a comparison of normal and tumoral kidney tissues, *Drug Metab. Dispos.*, 43, s. 611-619.

Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2012) Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae, *Comp Biochem Phys C*, 155(2), s. 333-343.

Mazerska Z, Augustin A, Sładanowski A, Bibby MC, Double JA, Konopa J (1998) C-1311, *Drugs of the Future*, 23(7), 702.

Mazerska Z, Sowiński P, Konopa J (2003) Molecular mechanism of the enzymatic oxidation investigated for imidazoacridinone entitumor drug, C-1311, *Biochem Pharmacol*, 66(9), s. 1727-1736.

Mazerska Z, Mróz A, Pawłowska M, Augustin E (2016) The role of glucuronidation in drug resistance, *Pharmacol Ther.*, 159, s. 35-55

Mączka W, Zółnierczyk A, Grabarczyk M, Wińska K (2016) β -jonon jako potencjalny lek przeciwnowotworowy, *Acta Sci. Pol.*, 15(1), s. 27-36.

Meng J, Zhong D, Li L, Yuan Z., Yuan, H., Xie, C., Zhou, J., Li, C., Gordeev, M.F., Liu, J., Chen, X. (2015) Metabolism of MRX-I, a novel antibacterial oxazolidinone, in humans: the oxidative ring opening of 2,3-Dihydropyridin-4-one catalyzed by non-P450 enzymes, *Drug. Metab. Dispos.*, 43, s. 646-659.

Michaels AY, Keraliya AR, Tirumani SH, Shinagare AB, Ramaiya NH (2016) Systemic treatment in breast cancer: a primer for radiologists, *Insights Imaging*, 7, s. 131–144.

Miley MJ, Zielinska AK, Keenan JE, Bratton SM, Radominska-Pandya A, Redinbo MR (2007) Crystal structure of the cofactor-binding domain of the human phase II drug-metabolism enzyme UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *J. Mol. Biol.*, 369, s. 498-511.

Miners JO, Rowland A, Novak JJ, Lapham K, Goosen TC (2020) Evidence-based strategies for the characterisation of drug and chemical glucuronidation in vitro and UDP-glucuronosyltransferase reaction phenotyping, *Pharmacol Ther*, PANDT-D-20-00010

Mohamed MR, Ramsdale E, Loh KP, Arastu A, Xu H, Obrecht S, Castillo D, Sharma M, Holmes HM, Nightingale G, Juba KM, Mohile SG (2020) Associations of Polypharmacy and Inappropriate Medications with Adverse Outcomes in Older Adults with Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Oncologist.*, 25(1), s. e94–e108.

Monostory K, Vereczkey L (1994) The effect of phenobarbital and dexamethasone coadministration on the activity of rat liver P450 system, *Bioch Bioph Res Co*, 203(1), s. 351-358.

Mrizova I, Moserova M, Milichovsky J, Sulc M, Kizek R, Kubacka K, Arlt VM, Stiborova M (2016) Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in *Escherichia coli* and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine, *Monatsh Chem*, 147, s. 881–888.

Mróz A, Mazerska Z (2015) Glucuronidation of antitumour therapeutics– detoxification, mechanism of resistance or prodrug formation?, *Postepy Hig Med Dosw*, 69, s. 1462-1477.

Mróz A, Ryska I, Sominko H, Bejrowska A, Mazerska Z (2018) Drug-drug interaction potential of antitumor acridine agent C-1748: The substrate of UDP-glucuronosyltransferases 2B7, 2B17 and the inhibitor of 1A9 and 2B7, *Pharmacol Rep*, 70, s. 972–980.

Murray R, Bender DA (2009) Metabolism of Xenobiotics, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 28e, McGraw Hill, s. 626-633.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schafer-Korting M . *Farmakologia i toksykologia podręcznik*. MedPharm Polska, 2010.

Nagai H, Kim YH (2017) Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns, *J Thorac Dis.*, 9(3), s. 448–451.

Nagy LD, Mocny CS, Diffenderfer LE, Hsi DJ, Butler BF, Arthur EJ, Fletke KJ, Palamanda JR, Nomeir AA, Furge LL (2011) Substituted Imidazole of 5-Fluoro-2-[4-[(2-phenyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-1-piperazinyl]pyrimidine Inactivates Cytochrome P450 2D6 by Protein Adduction, *Drug Metab Dispos*, 39, 974-983.

Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE (2012) CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: Ocular Localization, Metabolism of ω -3-Polyunsaturated Fatty Acids, and Functional Deficit of the p.H331P Variant, *Mol Pharmacol*, 82, s. 679-686.

Nelson DR (2009) The cytochrome P450 homepage, *HuGo* 4, s. 59 – 65.

Niemira M, Dastych J, Mazerska Z. (2013) Pregnane X receptor dependent up-regulation of CYP2C9 and CYP3A4 in tumor cells by antitumor acridine agents, C-1748 and C-1305, selectively diminished under hypoxia, *Biochem Pharmacol*, 86, s. 231-41.

Nowak K (2017) Chemical structures and biological activities of bis- and tetrakisacridine derivatives: A review, *J. Mol. Struct.*, 1146, s. 562 – 570.

Ogura K, Ishikawa Y, Kaku T, Nishiyama T, Ohnuma T, Muru K, Hiratsuka A (2006) Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4, *Biochem, Pharmacol*, 71, s. 1358-1369.

Ohno S, Nakajin S (2009) Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.*, 37, s. 32-40.

Ortiz de Montellano P. R. (2015) *Cytochrome P450: structure, mechanism and bio-chemistry*, Springer International Publishing, Switzerland, 33-69.

Paluszkiewicz E, Horowska B, Borowa-Mazgaj B, Peszyńska-Sularz G, Paradziej-Łukowicz J, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z (2020) Design, synthesis and high antitumor potential of new unsymmetrical bisacridine derivatives towards human solid tumors, specifically pancreatic cancers and their unique ability to stabilize DNA G-quadruplexes, *Eur. J. Med. Chem.*, 204, 112599.

Pastwa E, Ciesielska E, Studzian K, Szmigiero L (1993) DNA-protein crosslinks induced in HeLa cells by bis-1-nitroacridines, *Acta Biochim. Pol.* 40, S. 69-71.

Patana A, Kurkela M, Finel M, Goldman A (2008) Mutation analysis in UGT1A9 suggests a relationship between substrate and catalytic residues in UDP-glucuronosyltransferases, *Protein Eng. Des. Sel.*, 21, s. 537-543.

Patal P, Xue Z, King KS, Parham L, Ford S, Lou Y, Bakshi KK, Sutton K, Margolis D, Hughes AR, Spreen WR (2020) Evaluation of the effect of UGT1A1 polymorphisms on the pharmacokinetics of oral and long-acting injectable cabotegravir, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(8), s. 2240-2248.

Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE, Pasternak GW (1989) Pharmacological characterization of morphine-6- β -glucuronide, a very potent morphine metabolite, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251, s. 477-483.

Pawlak K, Pawlak J, Konopa J (1984) Cytotoxic and antitumor activity of 1-nitroacridines as an after effect of their interstrand DNA cross-linking, *Cancer Res.*, 44, s. 4289-4296.

Pawłowska M, Augustin E (2011) Expression systems of cytochrome P450 proteins in studies of drug metabolism in vitro, *Postepy Hig Med Dosw*, 65, s. 367-376.

Pawłowska M, Chu R, Fedejko-Kap B, Augustin E, Mazerska Z, Radomska-Pandya A, Chambers TC (2013) Metabolic transformation of antitumor acridinone C-1305 but not C1311 via selective cellular expression of UGT1A10 increases cytotoxic response: implications for clinical use, *Drug Metab. Dispos.*, 41, s. 414-421.

Pawłowska M, Augustin E, Mazerska Z (2014) CYP3A4 overexpression enhances apoptosis induced by anticancer agent imidazoacridinone C-1311, but does not change the metabolism of C-1311 in CHO cells, *Acta Pharmacol Sin*, 35(1), s. 98-112.

Pawłowska M (2014) Zmiany w odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych indukowanej przez pochodne akrydonu C-1311 i C-1305 wobec podwyższonej ekspresji izoenzymów CYP3A4 i UGT1A10, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska

Pawłowska M, Kwaśniewska A, Mazerska Z, Augustin E (2020) Enhanced Activity of P4503A4 and UGT1A10 Induced by Acridinone Derivatives C-1305 and C-1311 in MCF-7 and HCT116 Cancer Cells: Consequences for the Drugs' Cytotoxicity, Metabolism and Cellular Response, *Int J Mol Sci*, 21(11): 3954.

Peer CJ, Sissung TM, Kim A, Jain L, Woo S, Gardner ER, Kirkland CT, Troutman SM, English BC, Richardson ED, Federspiel J, Venzon D, Dahut W, Kohn E, Yarchoan Y, Giaccone G, Widerman B, Figg WD (2012) Sorafenib is an inhibitor of UGT1A1 but is metabolized by UGT1A9: implications of genetic variants on pharmacokinetics and hyperbilirubinemia, *Clin. Cancer Res.*, 18, s. 2099-2107.

Phillips IR, Shephard EA (2008) flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response, *Trend Pharmacol sciences* 29(6), s. 294-301.

Phillips IR, Shephard EA (2019) Flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3): genetic variants and their consequences for drug metabolism and disease, *Xenobiotica*, DOI: 10.1080/00498254.2019.1643515

Pilch J, Matysiak-Brynda E, Kowalczyk A, Bujak P, Mazerska Z, Nowicka AM, Augustin E (2020) New Unsymmetrical Bisacridine Derivatives Noncovalently Attached to Quaternary Quantum Dots Improve Cancer Therapy by Enhancing Cytotoxicity toward Cancer Cells and Protecting Normal Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12, s. 17276-17289.

Piotrowska-Sowińska J (1976) Clinical observations of the Ledakrin effects in treatment of patients with malignant neoplasms, *Mater. Med. Pol.*, 8, s. 266-272.

Plant N (2004) Strategies for using in vitro screens in drug metabolism, *Drug Discov Today*, 9(7), 328–336.

Potęga A (2010) Przemiany metaboliczne in vitro przeciwnowotworowej pochodnej imidazoakrydonu, C-1311, i jej wpływ na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska

Potęga A, Dabrowska E, Niemira M, Kot-Wasik A, Ronseaux S, Henderson CJ, Wolf CR, Mazerska Z (2011) The Imidazoacridinone Antitumor Drug, C-1311, Is Metabolized by Flavin Monooxygenases but Not by Cytochrome P450s, *Drug Metab Dispos*, 39(8), s. 1423-1432.

Potęga A, Fedejko-Kap B, Mazerska Z (2016a) Imidazoacridinone antitumor agent C-1311 as a selective mechanism-based inactivator of human cytochrome P450 1A2 and 3A4 isoenzymes, *Pharmacol Rep*, 68, s. 663-670.

Potęga A, Fedejko-Kap B, Mazerska Z (2016b) Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 1A2 and 3A4 isoenzymes by anti-tumor triazoloacridinone C-1305, *Xenobiotica* 46(12):s. 1-10.

Product Catalog, Recombinant Supersome™ Enzymes, Corning.

Qosa H, Avaritt BR, Hartman NR, Volpe DA (2018) In vitro UGT1A1 inhibition by tyrosine kinase inhibitors and association with drug-induced hyperbilirubinemia, *Cancer Chemother Pharmacol*, 82, s. 795–802.

Quan E, Wang H, Dong D, Zhang X, Wu B (2015) Characterization of chrysin glucuronidation in UGT1A1-overexpressing HeLa cells: elucidating the transporters for efflux of glucuronide, *Drug Metab. Dispos.*, 43 s. 433-443.

Radzikowski C (1974) Compound C-283, a survey of collaborative clinical and preclinical studies. United Pharmaceutical Industry "Polfa", Center of Scientific.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower R, Raug and Dale's Pharmacology, Churchill Livingstone, 2007, s. 113-118.

Raynal C, Pascussi JM, Leguelinel G, Breuker C, Kantar J, Lallemand B, Poujol S, Bonnans C, Joubert D, Hollande F, Lumbroso S, Brouillet JP, Evard A (2010) Pregnane X Receptor (PXR)

expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation, *Mol. Cancer*, 9, 46.

Ren Z, Chen S, Ning B, Guo L (2018) Use of Liver-Derived Cell Lines for the Study of Drug-Induced Liver Injury, Use of Liver-Derived Cell Lines for the Study of Drug-Induced Liver Injury, *Methods in Pharmacology and Toxicology*, s. 151-177

Rieger MA, Ebner R, Bell DR i inni (2004) P450, CYP4Z1, with Overexpression in Breast Carcinoma Identification of a Novel Mammary-Restricted Cytochrome, *Cancer Res* 64, s. 2357–2364.

Richardson SJ, Bai A, Kulkarni AA, Moghaddam MF (2016) Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay a Screen for Metabolic Stability, *Drug Metab Letters*, 10 s. 83-90.

Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45, s. 1121-1132

Salomon E, Berg L, Martin D (2007), Zmienność genetyczna w populacjach, *Biologia*, wg VII wyd. amerykańskiego, MULTICO, s. 279, 294-295, 361.

Schroer K, Kittelmann M, Lutz S (2010) Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis, *Biotechnol Bioeng.*, 106, s. 699-706.

Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hutotb JS, Thornc CF, Altman RB, Klein TE (2012) PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19, *Pharmacogenet. Genomics*, 22, s. 159–165.

Sequeira DJ, Strobel HW (1995) High-performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Imipramine Metabolism in Vitro by Liver and Brain Microsomes, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 673(2), s. 251-258.

Shephard EA, Treacy EP, Phillips IR. (2015) Clinical utility gene card for: trimethylaminuria – update 2014, *Eur J Hum Genet*, 23, doi: 10.1038/ejhg.2014.226

Shu YZ, Johnson BM, Yang TJ (2008) Role of Biotransformation Studies in Minimizing Metabolism-Related Liabilities in Drug Discovery, *The AAPS Journal*, 10, s. 178-192.

Smythies J, Galzigna L (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review, *Biochim Biophys Acta*, 1380, 159-162.

Siddens LK, Krueger SK, Henderson MC, Williams DE (2014) Mammalian flavin-containing monooxygenase (FMO) as a source of hydrogen peroxide, *Biochem Pharmacol*, 89(1), s. 141-7.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020) Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J Clin*, 70(1), s. 7-30.

Siller M, Goyal S, Yoshimoto FK, Xiao Y, Wei S, Guengerich FP (2014) Oxidation of Endogenous N-Arachidonoylserotonin by Human Cytochrome P450 2U1, *J. Biol. Chem.*, 289(15), s. 10476–10487.

Silverman RB (1995) Mechanism-based enzyme inactivators, *Methods Enzymol.*, 249, 240–283.

Sondhi SM, Kumar S, Rani R, Chakraorty A, Roy P (2013) Synthesis of Bis-acridine Derivatives Exhibiting Anticancer and Anti-inflammatory Activity, *Adv Heterocycl Chem*, 50, s. 252 – 260.

Starland-Davenport A, Lyn-Cook B, Radomska-Pandya A (2008) Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1a10 in non-malignant and malignant human breast tissues, *Steroids*, 73(6), s. 611–620.

Stiborová M, Indra R, Moserová M, Borek-Dohalska L, Hodek P, Kopka K, Schmeiser HH, Arlt VM (2017) Comparison of human cytochrome P450 1A1-catalysed oxidation of benzo[a]pyrene in prokaryotic and eukaryotic expression systems, *Monatsh Chem*, 148(11), s. 1959-1969.

Strassburg CP (2008) Pharmacogenetics of Gilbert's synfrome, *Pharmacogenimocs*, 9, s. 703-715.

Szaefer H, Licznarska B, Cykowiak M, Baer-Dubowska W (2019) Expression of CYP2S1 and CYP2W1 in breast cancer epithelial cells and modulation of their expression by synthetic methoxy stilbenes, *Pharmacol Rep*, 71, s. 1001-1005.

Tan D, Lynch H (2013) Principles of molecular diagnostics and personalized cancer medicine, Lippincott Williams & Wilkins.

Tang Y-J, Hu K, Huang W-H i inni. (2017) Effects of FMO3 polymorphisms on pharmacokinetics of sulindac in Chinese healthy male volunteers, *BioMed Res Int*, s. 1–7.

Targovnik AM, Arregui MB, Bracco LF, Urtasun N, Baieli MF, Segura MM, Simonella MA, Fogar M, Wolman FJ, Cascone O, Miranda MV (2016) Insect Larvae: A New Platform to Produce Commercial Recombinant Proteins, *Curr Pharm Biotechnol.*, 17, s.431-438.

Thomas AL, Anthony A, Scott E, Ahmed S, Lundberg AS, Major A, Capizzi RL, Twelves CJ (2008) C1311, a novel inhibitor of FLT3 and topoisomerase II: A phase 1 trial of a once every three week schedule in patients with advanced solid tumors, *Journal of Clinical Oncology*, 26(15), s. 2576.

Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, Benjamin B, Tandon R, Saini KS, Sahday S (2010) Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector, *Mol Biotechnol*, 46, s. 80–89

Tomaszewski P, Kubiak-Tomaszewska G, Pachecka J (2008) Cytochrome P450 polymorphism – molecular, metabolic and pharmacogenetic aspects. II. Participation of CYP isoenzymes in the metabolism of endogenous substances and drugs, *Acta Pol Pharm*, 65, s. 307-318.

Wakelin PGL, Bu X, Eleftheriou A, Parmar A, Hayek C, Stewart BW (2003) Bisintercalating threading diacridines: Relationships between DNA binding, cytotoxicity, and cell cycle arrest, *J. Med. Chem.* 46, s. 5790-5802.

Wang L, Wang L, Chan C, Wong A, Wong F, Lim S, Chinnathambi A, Alharbi S, Lee L, Soo R, Yong W, Lee S, Ho P, Sethi G, Goh B (2017) Combined use of irinotecan with histone deacetylase inhibitor belinostat could cause severe toxicity by inhibiting SN-38 glucuronidation via UGT1A1, *Oncotarget*, 8, s. 41572-41581.

WHO Chronicle (1976) Geneva: World Health Organization, 30(3), s. 11.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios, *Drug Metab Dispos*, 32, s. 1201-1208.

Wilkinson G R (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response, *NEJM*, 352, s. 2211-2221.

Wiśniewska A, Niemira M, Jagiełło K, Potęga A, Świst M, Henderson C, Skwarska A, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z (2012) Diminished toxicity of C-1748, 4-methyl 9-hydroxyethylamino-1-nitroacridine, compared with its demethyl analog, C-857, in HepG2 cells, correspond to its resistance to metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, 84, s. 30-42.

Wojnarowski JM, McNamee H, Szmigiero L, Beerman TA, Konopa J (1989) Induction of DNA-protein crosslinks by antitumor 1-nitro-9-aminoacridines in L1210 leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.*, 38, s. 4095-4101.

Veeramah KR (2008) The potentially deleterious functional variant flavin-containing monooxygenase 2*1 is at high frequency throughout sub-Saharan Africa, *Pharmacogenet Genomics* 18(10), s. 877-886.

Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models, *J Clin Pharmacol.*, 41, s. 1149-1179.

Xiao Y, Shinkyo R, Guengerich FP (2011) Cytochrome P450 2S1 is reduced by NADPH-cytochrome P450 reductase, *Drug Metab Dispos*, 39, s. 944–946.

Xiao L, Zhu I, Li W, Conghu L, Cao Y, Ge G, Sun X (2018) New insights into SN-38 glucuronidation: Evidence for the important role for UDP glucuronosyltransferase 1A9, BCPT, 122, s. 424-428.

Yang N, Sun R, Liao X, Jiye A, Wang G (2017) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic cross-talk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine, *Pharmacol Res*, 121, s.169–183.

Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Ohta M, Sakaki T (2010) Metabolism of sesamin by cytochrome P450 in human liver microsomes, *Drug Metab Dispos.*, 38, s. 2117-2123.

Yoon KS, Nelson JO, Clark JM (2002) Selective induction of abamectin metabolism by dexamethasone, 3-methylcholanthrene, and phenobarbital in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Pestic Biochem Physiol* 73, s. 74–86.

Zheng S, Qiu X, Chen B, Yu X, Lin K, Bian M, Liu Z, Huang H, Yu W (2011) Toxicity evaluation of benzo[a]pyrene on the polychaete *Perinereis nuntia* using subtractive cDNA libraries, *Aquat. Toxicol.*, 105(3–4), s. 279–291.

Zia Q, Azhar A, Kamal MA, Aliev G, Owais M, Ashraf G (2016) Super aggregated form of Amphotericin B: a novel way to increase its therapeutic index, *Curr Pharm Des*, 22(7), s. 792-803.