

Stanovení stability léčiv v lidském těle pomocí metod kapilární elektroforézy

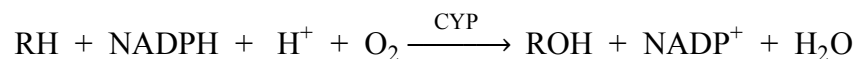
C9320 Metody biochemického výzkumu - laboratorní cvičení

Každý organismus je ve svém životním prostředí vystaven působení mnoha chemických látek. Proto se v průběhu evoluce vytvořil obranný enzymový mechanismus, který pomocí metabolické přeměny zvyšuje polaritu lipofilních látek a umožňuje tak jejich vyloučení z těla. Z pohledu člověka je významné, že stejným procesem prochází také aktivní složky léčiv, tedy látky záměrně aplikované, kdy aktivita obranných enzymů vede především ke snížení účinku těchto sloučenin. Cytochromy P450 představují základní pilíř enzymového aparátu zodpovědného za biotransformaci, proto je vztah kandidátní látky a hlavních lidských isoform cytochromů P450 testován již v raných fázích vývoje nových léčiv. Cílem této úlohy je prezentace rychlého, univerzálního stanovení stability modelové sloučeniny vůči jaterním cytochromům P450 a stanovení hlavních isoform zodpovědných za její metabolismus metodami kapilární elektroforézy.

1. Teoretický úvod

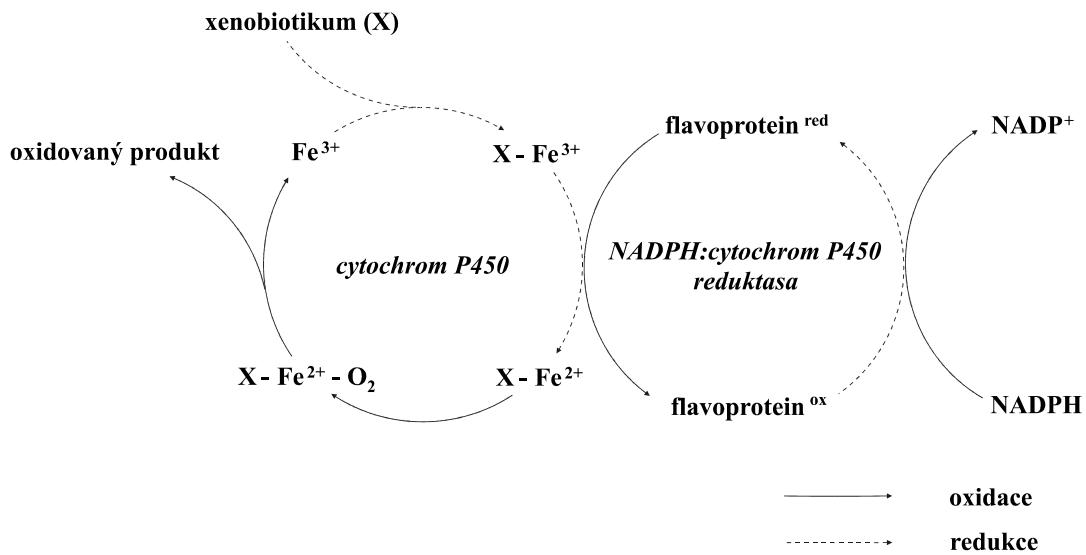
Cytochromy P450 (CYP)

CYP představují početnou skupinu enzymů, které byly nalezeny téměř ve všech živých organismech. Jedná se o membránově vázané enzymy, které jsou u člověka v rámci buňky lokalizovány v endoplazmatickém retikulu. V těle je jejich nejvyšší množství v játrech, v menší míře se pak nacházejí v dalších orgánech, jako jsou např. střeva nebo plíce. Zodpovídají za metabolismus jak endogenních (např. steroidních hormonů, vitamínu D, žlučových kyselin, atd.), tak i exogenních látek (např. léčiva, xenobiotika, atd.). Obecná rovnice jejich funkce je popsána níže, avšak kromě hydroxylace mohou také katalyzovat celou řadu dalších oxidačních, oxygenačních a redukčních reakcí s využitím molekulárního kyslíku jako oxidačního substrátu:



V průběhu reakce CYP štěpí molekulu kyslíku, kdy jeden ze získaných atomů je inkorporován do molekuly substrátu (RH) a druhý do molekuly vody. Hydroxylovaný produkt reakce (ROH) je poté buď již dostatečně polární a tedy rozpustný ve vodě, aby mohl být z těla vyloučen přímo, nebo postupuje do dalších fází biotransformace, kdy je na funkční -OH skupinu vázána malá molekula endogenního původu, která dále zvyšuje polaritu konjugátu a usnadňuje tak jeho vyloučení. Po reakci dochází k regeneraci aktivního místa enzymu, kdy je oxidovaný atom železa hemu redukován elektronem z NADPH, který na CYP přenáší

NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Celý tento proces lze zjednodušeně znázornit následujícím schématem:



Unikátní schopnost CYP, tedy aktivovat a štěpit molekulu kyslíku, vychází z thiolové vazby mezi atomem železa hemu a cysteinového zbytku apoproteinu. Přestože se jedná o stejný hem jako např. u hemoglobinu, zde je centrální atom vázán silněji, čímž umožňuje přenos elektronů na dvojnou vazbu molekulu kyslíku a její rozštěpení.

Na základě rozdílů v primární struktuře apoproteinu bylo u člověka doposud stanoveno 57 různých isoform CYP. Nejdůležitější isoformy z pohledu farmakokinetiky představují CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4, které zodpovídají za metabolismus až 90 % běžně předepisovaných léčiv. Farmakologický profil léčiva přímo závisí na aktivitě CYP. Proto tvoří stanovení stability kandidátní sloučeniny vůči působení CYP již rutinní součást časných fází vývoje nových léčiv. Pro *in vitro* studie lze využít několik zdrojů CYP: a) rekombinantní CYP, b) lidské jaterní mikrosomy, c) celé hepatocyty nebo d) plátky jaterní tkáně. Jelikož jsou během časných fází vývoje nových léčiv testovány až desetitisíce různých látek, je kromě validity také kladen velký důraz na rychlost stanovení. Z tohoto důvodu je časově náročná práce s celými hepatocyty nebo vzorky jaterní tkáně nevhodná. Naopak, přestože práce s rekombinantními CYP umožňuje implementaci rychlých analýz, její schopnost napodobit *in vivo* podmínky biotransformace testovaných látek je nízká. Použití lidských jaterních mikrosomů (human liver microsomes, HLM), tak představuje určitý kompromis mezi rychlými analýzami a dostatečnou mírou simulace podmínek metabolismu v lidských játrech. HLM tvoří vezikuly o průměru přibližně 150 nm získané z endoplazmatického retikula jaterních buněk. Při výrobě je homogenát jaterní tkáně centrifugován při 9000 až 12000 × g, HLM jsou poté odděleny s jednou ze získaných frakcí.

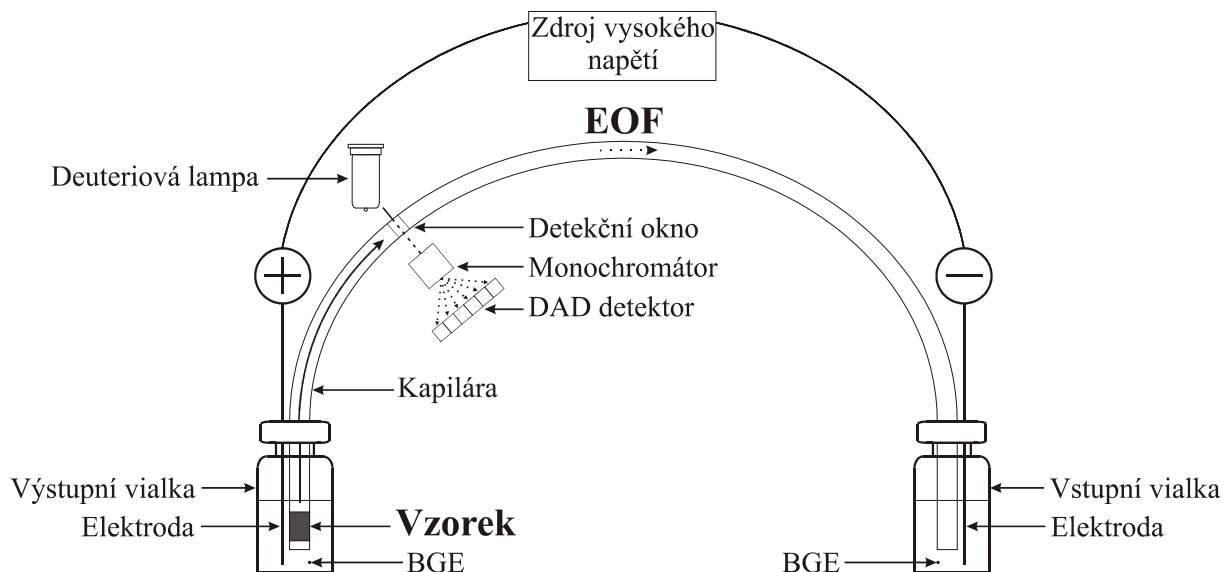
Kapilární elektroforéza (CE)

Metody CE využívají k separaci jednotlivých složek vzorku pohyb nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Směr tohoto pohybu je dán celkovým nábojem částice, jeho

rychlost roste s intenzitou aplikovaného elektrického pole a elektroforetickou mobilitou analytu. Ta v daném prostředí roste s celkovým nábojem molekuly a klesá s odporem kladeným okolním prostředím, který závisí na viskozitě prostředí a velikosti molekuly. Prostředí kapiláry s průměrem v řádu desítek μm zaručuje, že nedochází k opětovnému promíchání separovaných látek konvektivním prouděním. Tavený křemen, ze kterého je stěna kapiláry vyrobena, navíc obsahuje silanolové skupiny SiO^- , stojící tvorbou nabitých dvojvrstvy s kationy ze základního elektrolytu (BGE) u vzniku elektroosmotického toku (EOF). Při tomto elektrokinetickém jevu dochází vlivem pohybu solvatovaných kationů k toku celého objemu kapaliny v kapiláře směrem ke katodě. Skutečná (efektivní) mobilita látky je poté dána součtem vlastní elektroforetické mobility analytu a elektroforetické mobility EOF. V případě, že mobilita EOF je vyšší než mobilita anionů migrujících proti směru EOF, lze detektorem umístěným na katodickém konci kapiláry během jedné analýzy detekovat jak kationy, tak i aniony.

Metody CE nabízí separace s účinností v řádu až několika milionů teoretických pater. Lze s nimi separovat široké spektrum analytů od jednotlivých iontů až po celé buňky. Jelikož jsou do kapiláry při analýze dávkovány řádově desítky nI vzorku a spotřeba promývacích roztoků se počítá v desítkách ml týdně, umožňují metody CE snížit provozní náklady na minimum. Úplná automatizace analýz navíc zrychluje a zjednodušuje celý proces provedení experimentů. Z těchto důvodů představuje CE výhodnou techniku pro studium enzymových reakcí. Při práci s HLM je významná zejména malá spotřeba vzorku, neboť se v zásadě jedná o vzácný a drahý materiál, u něhož je z ekonomických i morálních důvodů nezbytné zamezit jakémukoliv plýtvání.

U komerčních přístrojů není možné libovolně zkracovat délku separační kapiláry. Jelikož je detektor v systému zabudován asymetricky, nekratší možnou separační dráhu představuje kapilára o délce vzdálenosti detekčního okna a výstupního konce kapiláry. Při použití této části kapiláry hovoříme o tzv. metodách z krátkého konce, kdy vzorek je do kapiláry dávkován aplikací podtlaku na vstupní vialku a pro separaci je polarita elektrod otočena. Funkci takového systému znázorňuje následující obrázek:

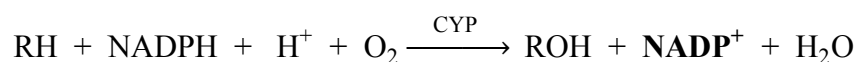


2. Cíle úlohy

Cílem tohoto cvičení je praktické seznámení se s technikami CE, studiem enzymových reakcí pomocí metod CE, možnostmi stanovení stability léčiv v lidském těle a významem CYP při metabolismu léčiv. Podmínkou úspěšného absolvování úlohy bude stanovení stability lidokainu vůči HLM, identifikace hlavních isoformů CYP, zodpovědných za jeho metabolismus, a zodpovězení otázek, vycházejících z experimentální části cvičení.

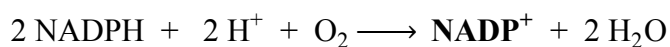
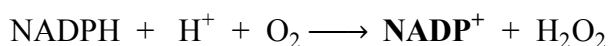
3. Princip úlohy

Jak již bylo uvedeno výše, v rámci screeningu kandidátních sloučenin jsou testovány enormní počty různých chemických látek. Proto klasický postup studia enzymových reakcí, při kterém je v reakční směsi sledován úbytek substrátu nebo vznik produktu, není pro tyto účely vhodný. Pro každou z testovaných látek by v takovém případě musela být optimalizována vlastní metoda, což by celý proces neudržitelně prodlužovalo. Vraťme se tedy k obecné rovnici funkce CYP:



Jak je vidět, substráty a produkty reakce jsou u každé testované látky jiné, avšak NADPH slouží jako zdroj elektronu u všech reakcí bez rozdílu. Tato úloha tak bude založena na stanovení aktivity CYP pomocí sledování produkce NADP^+ v reakční směsi. Jedná se o univerzální přístup, kdy není nutné znát elektroforetickou mobilitu testované látky nebo jejího metabolitu. NADP^+ je dobře měřitelné standardním UV-VIS detektorem s absorpčními maximy při vlnové délce 200 a 280 nm.

Při vyhodnocování výsledků musí být vzato v potaz, že NADP^+ je produkováno i nespecificky bez přítomnosti substrátu:



Z tohoto důvodu budou analyzovány dvě sady vzorků. V první bude reakční směs tvořena pouze HLM a NADPH. Množství NADP^+ v této sérii bude představovat blank zohledňující nespecifickou produkci. V druhé pak bude analyzována plná reakční směs složená z HLM, NADPH a substrátu. Rozdíl v produkci NADP^+ mezi sadami bude statisticky vyhodnocen, kdy významně vyšší produkce ve druhé sérii analýz prokazuje biotransformaci substrátu aktivitou CYP.

Reakční směsi budou inkubovány v tzv. off-line uspořádání. To znamená ve vialce na třepače, kdy vzniklé produkty budou nadávkovány do kapiláry a analyzovány až po ukončení reakce přidávkem acetonitrilu. Spolu s acetonitrem bude do roztoku přidáván i ftalát draselný, který bude sloužit jako interní standard, jehož použití významně zvyšuje

opakovatelnost stanovení. Při vyhodnocování výsledků tedy bude měřena relativní plocha píků NADP⁺ stanovená jako podíl absolutních ploch píků NADP⁺ a interního standardu.

4. Pracovní postup

A. Stanovení stability lidokainu

Chemikálie:

inkubační pufr (10 mM fosfátový pufr pH 7,4)

separační pufr (20 mM fosfátový-tetraborátový pufr pH 8,6)

0,1 M NaOH, vodný roztok

4 mg/ml HLM, roztok připravený v inkubačním pufru

4 mM NADPH, roztok připravený v inkubačním pufru

20 mM lidokain, roztok připravený v inkubačním pufru

150 μM ftalát draselný, roztok připravený v acetonitrilu

Postup:

Označte 6 mikrozkušavek, kdy 3 z nich budou použity pro inkubaci blanků (B) a 3 na inkubaci plných reakčních směsí (RS). Roztoky jednotlivých složek reakčních směsí rozpipetujte do mikrozkušavek podle následující tabulky:

	B	RS	Výsledná koncentrace
HLM	25 μl	25 μl	1 mg / ml
Lidokain	×	25 μl	5 mM
Inkubační pufr	50 μl	25 μl	×

Mikrozkušavky uzavřete a nechte 5 minut preinkubovat na třepačce při teplotě 37 °C a rychlosti míchání 450 rpm. Poté spusťte reakci přidavkem 25 μl NADPH (finální koncentrace 1 mM) a nechte za výše uvedených podmínek inkubovat 30 minut.

Během této doby spusťte podle instrukcí obsluhy přístroj, vložte do karuselu vialky naplněné potřebnými roztoky, promyjte kapiláru 10 minut roztokem 0,1 M NaOH, 10 minut deionizovanou vodou, 10 minut BGE a 5 minut deionizovanou vodou, a nahrajte metodu CVICENI_NADP.M. Zkontrolujte, že nastavení metody odpovídá následujícím hodnotám: celková délka kapiláry 48,5 cm, efektivní délka kapiláry 8,5 cm, teplota kapiláry 37 °C, dávkování vzorku 3 sekundy tlakem -50 mbar, separační napětí -30 kV, detekce při 200 a 280 nm. Poté bude CE systém připraven k měření.

Reakci ukončete přidavkem 100 μl 150 μM roztoku ftalátu draselného v acetonitrilu. Získanou směs dobře promíchejte na vortexu a potom 10 minut centrifugujte při 12 100 × g. Z každé mikrozkušavky odeberte po 50 μl supernatantu a přeneste do kónických vialek, které

uschovejte v chladicí lázni při 2 °C. Tímto způsobem bude minimalizován rozklad NADPH a tedy tvorba NADP⁺ během měření.

Každý vzorek změřte dvakrát. Ze získaných záznamů určete plochy píků analytů a výsledky запиšte do tabulky, která bude připravena na počítači v laboratoři. Pomocí statistického programu GraphPad Prism určete shodu rozptylů B a RS. Pokud budou rozptyly vyhodnoceny jako shodné, určete shodu produkce NADP⁺ v B a RS pomocí dvouvýběrového t-testu. V případě, že rozptyly budou významně rozdílné, použijte Welchův t-test.

Na základě získaných výsledků vyplňte příslušné položky v odpovědním archu.

B. Stanovení hlavních isoform CYP zodpovědných za metabolismus lidokainu

Sérií experimentů s přidavkem specifických inhibitorů jednotlivých isoform CYP lze stejnou metodou stanovit, které isoformy se významnou měrou podílejí na metabolismu studované látky. Pokud bude produkce NADP⁺ v reakční směsi s přidavkem inhibitoru testované isoformy významně nižší než produkce v RS z předcházející části úlohy, je daná isoforma (spolu)zodpovědná za metabolismus studované látky. Pokud bude produkce shodná, nehraje žádnou výraznější roli.

Chemikálie:

inkubační pufr (10 mM fosfátový pufr pH 7,4)

separační pufr (20 mM fosfátový-tetraborátový pufr pH 8,6)

0,1 M NaOH, vodný roztok

4 mg/ml HLM, roztok připravený v inkubačním pufru

4 mM NADPH, roztok připravený v inkubačním pufru

20 mM lidokain, roztok připravený v inkubačním pufru

20 μM α-naftoflavon (inhibitor CYP1A2), roztok připravený v inkubačním pufru

1 mM diethyldithiokarbamát (inhibitor CYP2A6), roztok připravený v inkubačním pufru

6 μM sulfafenazol (inhibitor CYP2C9), roztok připravený v inkubačním pufru

20 μM metoklopramid (inhibitor CYP2D6), roztok připravený v inkubačním pufru

4 μM Ketakonazol (inhibitor CYP3A4), roztok připravený v inkubačním pufru

150 μM ftalát draselný, roztok připravený v acetonitrilu

Postup:

Označte 2 mikrozkušavky pro každou testovanou isoformu CYP. Do všech poté napipetujte 25 μl roztoku lidokainu, 25 μl roztoku HLM a 25 μl roztoku příslušného inhibitoru. Mikrozkušavky vložte do třepačky a nechte 5 minut preinkubovat při teplotě 37 °C a rychlosti míchání 450 rpm. Reakci spusťte přidavkem 25 μl roztoku NADPH, směs v mikrozkušavce řádně promíchejte na vortexu a nechte inkubovat při výše popsáných podmínkách 30 minut. Reakci ukončete přidavkem 100 μl 150 μM roztoku ftalátu draselného

v acetonitrilu. Výslednou směs promíchejte na vortexu a 10 minut centrifugujte při $12100 \times g$. Z každé mikrokumavky odeberte po 50 μl supernatantu a přeneste do kónických vialek, které uschovejte v chladicí lázni při $2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nastavení CE metody bude stejné jako při předcházejícím stanovení stability lidokainu vůči HLM.

Každý vzorek změřte dvakrát, stanovené plochy píků NADP^+ zapište do připravené tabulky, která bude k dispozici na počítači v laboratoři. Stejným způsobem jako v předcházejícím experimentu stanovte, zda byla produkce NADP^+ v jednotlivých vzorcích významně odlišná od dříve stanovené produkce NADP^+ v RS bez přídavků inhibitorů. Ze získaných výsledků stanovte, které isoformy CYP zodpovídají za metabolismus lidokainu, a vyplňte otázky v odpovědním archu.