

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Metabolická studie sibutraminu**

Disertační práce

2007

Ing. Marek Link

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat mému školiteli, Doc. Ing. Vladimíru Wsólvi, PhD., za to, že mi umožnil studovat postgraduální studium na katedře biochemických věd, za jeho podporu a vedení v průběhu celého postgraduálního studia, a že svými schopnostmi vytvořil velmi dobré technické zázemí, ve kterém se dobře pracovalo. Dále si velmi cením toho, že mne vedl k samostatné tvůrčí činnosti.

Dále bych chtěl poděkovat paní Doc. Ing. Barboře Szotákové, PhD. a paní Doc. RNDr. Lence Skálové, PhD., za jejich cenné rady a ochotu, se kterou mi pomáhaly při řešení problémů. Dále bych jim chtěl poděkovat za pomoc při přípravě biologických vzorků a za cenné rady při publikování odborných článků.

Chtěl bych poděkovat Alence Pakostové za její neobyčejnou laskavost, podporu a ochotu, se kterou mi vycházela vstříc v průběhu celého postgraduálního studia.

Děkuji také celému kolektivu katedry biochemických věd, který vytvořil velmi přátelské prostředí, čehož si hodně vážím.

Děkuji Mgr. Romaně Novotné a Mgr. Heleně Raisové za pečlivé provedení některých experimentů, které byly součástí jejich diplomových prací.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Radanu Schillerovi, PhD. za syntézu standardů *rac*-sibutraminu a jeho metabolitů a slečně Mgr. Janě Klimentové, PhD. za pomoc při syntéze standardů ethylkarbamátů metabolitů M1, M2 a M2-OH.

Také bych chtěl poděkovat kolegům Kati Suzan Hakale, Raimo Ketolovi a Risto Kostiainenovi, kteří byliými školiteli v průběhu stáže ve Finsku a podíleli se na společném projektu, který je součástí disertační práce.

Velké poděkování patří mé rodině za podporu a porozumění nejen ve chvílích pohody, ale i v době dlouhých hodin věnovaných práci a studiu. Ten samý dík patří i mým kamarádům.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	3
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	4
2.1. Biotransformační enzymy a metabolismus xenobiotik .....	5
2.1.1. Enzymatické reakce I. fáze biotransformace .....	6
2.1.1.1. Oxidace .....	6
2.1.1.2. Hydrolýza .....	9
2.1.1.3. Hydratace .....	9
2.1.1.4. Redukce .....	10
2.1.2. Enzymatické reakce II. fáze biotransformace .....	12
2.1.2.1. Glukuronidace .....	12
2.1.2.2. Sulfatace .....	13
2.1.2.3. Methylace .....	13
2.1.2.4. Acetylace .....	14
2.1.2.5. Konjugace s aminokyselinami .....	14
2.1.2.6. Konjugace s glutathionem .....	15
2.1.3. Stereochemická hlediska biotransformace xenobiotik .....	15
2.2. Studium metabolismu léčiv pomocí LC/MS .....	19
2.2.1. Ionizační techniky .....	19
2.2.2. Detekce metabolitů .....	21
2.2.3. Identifikace metabolitů .....	22
2.3. Sibutramin .....	26
2.3.1. Farmakologické vlastnosti .....	26
2.3.1.1. Zpětné vychytávání monoaminů .....	26
2.3.1.2. Inhibice monoaminoxidázy .....	29
2.3.1.3. Účinek na receptory .....	29
2.3.1.4. Vliv na příjem potravy .....	30
2.3.1.5. Termogenese .....	31
2.3.1.6. Enantioselektivní účinek metabolitů sibutraminu .....	32
2.3.2. Klinické studie .....	33
2.3.3. Farmakokinetika .....	35

3. CÍL PRÁCE .....	39
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY, DISKUSE .....	41
4.1. Metabolismus sibutraminu v jaterních mikrosomech potkana a v primární kultuře hepatocytů potkana .....	43
4.1.1. Experimentální část .....	43
4.1.2. Výsledky.....	49
4.1.3. Diskuse .....	59
4.2. Metabolismus sibutraminu v lidských mikrosomech .....	61
4.2.1. Experimentální část .....	61
4.2.2. Výsledky.....	66
4.2.3. Diskuse .....	75
4.3. Metabolický profil sibutraminu v lidské moči .....	78
4.3.1. Experimentální část .....	78
4.3.2. Výsledky a diskuse .....	82
5. ZÁVĚR .....	95
5.1. Metabolismus sibutraminu v jaterních mikrosomech potkana a v primární kultuře hepatocytů potkana .....	96
5.2. Metabolismus sibutraminu v lidských mikrosomech .....	97
5.3. Metabolický profil sibutraminu v lidské moči .....	98
6. SUMMARY .....	99
7. LITERATURA .....	102
8. PŘÍLOHY .....	109
8.1. Seznam publikací, prezentací a grantů .....	110
8.2. Příloha I.....	111
8.3. Příloha II .....	118

# 1. ÚVOD

V průběhu posledních 2-3 desetiletí došlo k výraznému rozšíření obezity ve vyspělých a rozvojových zemích. Zdravotní důsledky obezity jsou tak značné, že obezita byla klasifikována jako celosvětový zdravotnický problém. Tato skutečnost podnítila potřebu bezpečného a efektivního léku pro léčbu obezity. Sibutramin je jedním z mála zavedených a dobře ověřených léků pro léčbu obezity. Použití sibutraminu by mělo být uvažováno při léčbě pacientů, kteří potřebují farmakoterapii jako součást kombinovaného přístupu ke ztrátě hmotnosti.

Sibutramin je terciární amin, který indukuje ztrátu tělesné hmotnosti. Tento efekt je způsoben dvojitým mechanismem zahrnujícím inhibici zpětného vychytávání monoaminů na receptorových místech ovlivňujících příjem potravy a zamezením poklesu energetického výdeje, který je spojen s poklesem tělesné hmotnosti. Farmakologický efekt sibutraminu je zcela nebo do značné míry připisován jeho farmakologicky aktivním metabolitům M1 a M2. Znalost dalšího metabolického osudu metabolitů M1 a M2 a způsobu jejich eliminace z těla by měla tedy být důležitou součástí charakterizace tohoto léčiva. Navíc jsou sibutramin a metabolity M1 a M2 chirální sloučeniny, což přináší další rozměr do farmakologického i metabolického pohledu.

Základní myšlenkou této práce bylo přinést nové informace o biotransformaci sibutraminu na nechirální i chirální úrovni.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. Biotransformační enzymy a metabolismus xenobiotik

Živé organismy během svého života přicházejí do neustálého kontaktu s chemickými látkami z okolního prostředí. Sloučeniny, které slouží jako zdroj energie, prekurzory pro syntézu makromolekul, vitamíny a další životně nezbytné složky potravy označujeme jako „látky tělu vlastní“ neboli eobiotika. Do organismů však vstupují i látky více či méně nežádoucí a tělu cizí, tzv. xenobiotika, z nichž velká řada může být živým organismům nebezpečná. Jako ochranu před nežádoucím působením chemických sloučenin si organismy během svého vývoje vytvořily enzymatické systémy, které dokáží xenobiotika chemicky přeměnit a tím často snížit až úplně zastavit jejich působení. Tento proces se nazývá metabolismus xenobiotik či biotransformace a enzymy účastníci se tohoto pochodu enzymy biotransformačními. Výsledný produkt (metabolit) bývá derivát původního xenobiotika, který je zpravidla snadněji z organismu vylučován (Krishna *et al.* 1994). Nejčastějšími xenobiotiky, s kterými se lidský organismus setkává, jsou léčiva, potravní aditiva, agrochemikálie, průmyslové chemikálie a chemické zplodiny lidské civilizace.

Biotransformace se klasicky dělí do dvou fází. Během první fáze biotransformace dochází většinou ke změně polaritě a biologického efektu xenobiotika. Lipofilní molekula se stává lépe rozpustnou ve vodě v důsledku zavádění nových nebo odkrývání již přítomných hydrofilních skupin. V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci s endogenními substráty. Konjugační reakce jsou směřovány na funkční skupiny, které často vznikly v předchozí fázi biotransformace. Vzniklé konjugáty jsou většinou mnohem lépe rozpustné ve vodě než látky parentní a jsou tedy z organismu snadněji vyloučeny. Pokud dojde k dostatečné změně polaritě v první fázi, může být metabolit vyloučen z organismu přímo.

Biotransformační enzymy se vyskytují prakticky ve všech buňkách organismu, v některých orgánech je však jejich aktivita vyšší. Kromě jater, která jsou hlavním orgánem biotransformace, jsou významnými metabolizujícími orgány plíce, ledviny, kůže, gastrointestinální trakt, krev, placenta a mozek. Na biotransformaci xenobiotik se významnou měrou podílí i bakteriální intestinální mikroflóra. Z hlediska subcelulární lokalizace je možno biotransformační enzymy nalézt jak rozpuštěné v cytoplasmě, tak vázané na buněčné organely, nejčastěji na endoplasmatické retikulum, dále na

mitochondrie, na lysosomy, na jadernou membránu nebo na plasmatickou membránu (Testa 1995).

Důsledkem biotransformační přeměny xenobiotika je změna ve struktuře molekuly, která má u různých látek rozdílný vliv na jejich biologický efekt. Biotransformace může vést k deaktivaci a ztrátě účinku, ke kvalitativní změně účinku, ale také k aktivaci nebo zvýšení toxického efektu látky.

### 2.1.1. Enzymatické reakce I. fáze biotransformace

I. fáze biotransformace zahrnuje různé typy reakcí jako např. oxidaci, hydrolýzu, redukci a hydrataci. Na tyto reakce je často pohlíženo jako na „přípravné reakce“, poněvadž všeobecně vedou k zavádění nebo odkrývání důležitých funkčních skupin (např. OH, COOH, NH<sub>2</sub>, SH), které mohou usnadnit buď přímo nebo skrze konjugaci s polárními endogenními substráty odstranění xenobiotika z těla.

#### 2.1.1.1. Oxidace

##### *Cytochromy P450*

Velmi významnou skupinou enzymů účastnících se biotransformace xenobiotik jsou cytochromy P450 (CYP). Cytochromy P450 hrají klíčovou úlohu v metabolismu řady léčiv a jiných xenobiotik, mají však také důležitou funkci v endogenním metabolismu - zejména lipofilních látek jako např. žlučových a mastných kyselin, cholesterolu a prostaglandinů (Lewis 2001).

Jelikož se jedná o velmi rozsáhlou skupinu enzymů, byla pro jejich klasifikaci vyvinuta systematická nomenklatura, která je založena na podobnosti aminokyselinové sekvence jednotlivých isoformem. Isoformy se sekvenční homologií větší než 40 procent jsou přiřazeny do stejné rodiny (např. CYP1, CYP2, atd.). Isoformy se sekvenční homologií větší než 70 procent náleží do stejné podrodiny (např. CYP2A, CYP2B, atd.) a každý člen podrodiny, tj. individuální isoforma, je označen číslicí (např. CYP2A1, CYP2A2, atd.) (Gibson and Skett 2001). Mezi isoformy odpovědné za velkou část veškerého metabolismu léků u lidí patří CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 a 3A4/5 (Evans 2004).

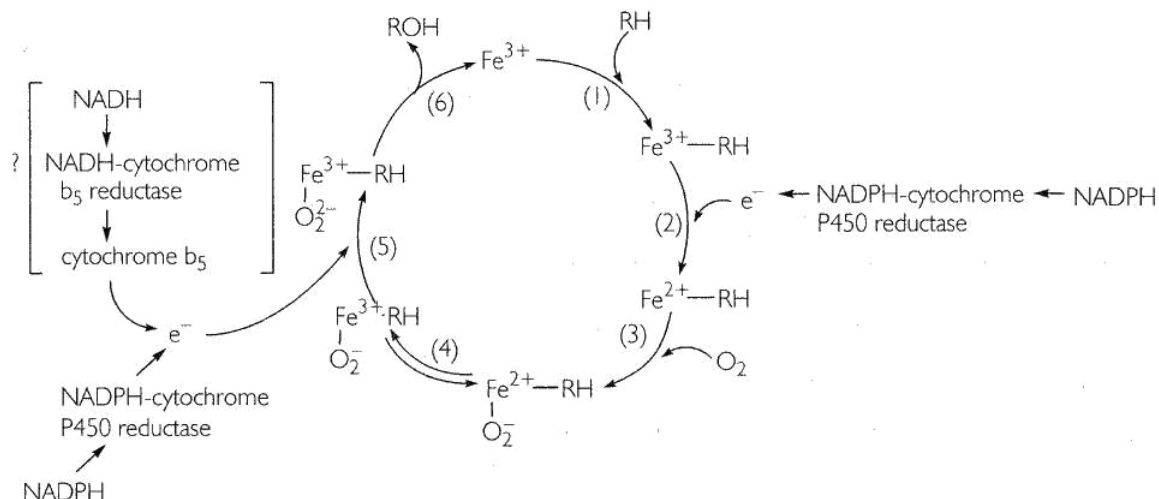
Cytochromy P450, které se podílí na metabolismu léků, jsou většinou vázané v komplexech na membránu hladkého endoplasmatického retikula buněk (Gibson and Skett 2001). Některé zástupce CYP je možno také nalézt na membránách mitochondrií,



kde se podílí zejména na metabolismu steroidních látek. U savců se CYP vyskytují prakticky ve všech tkáních, nejvíce jsou však zastoupeny v játrech, která se tak stávají hlavním místem biotransformace. V menší míře, avšak nezanedbatelně, byly některé isoformy CYP nalezeny v gastrointestinálním traktu, ledvinách, mozku, plicích, kůži, svalech, cévách a dokonce i v krevních destičkách (Krishna *et al.* 1994, Testa 1995). U některých látek tak extrahepatální biotransformace představuje důležitý, až většinový podíl celkového metabolismu.

Na rozdíl od většiny enzymů mají cytochromy P450 zapojené do metabolismu xenobiotik širokou substrátovou specifitu, která jim umožňuje metabolizovat široké spektrum látek, kterému může být organismus vystaven. Navzdory rozdílům ve výstavbě aktivního centra mezi jednotlivými cytochromy P450 je katalytický mechanismus pro všechny isoformy shodný. Cytochromy P450 katalyzují oxidaci navázaného substrátu pomocí redoxního působení hemu a aktivace molekulárního kyslíku (obrázek 1.). Tímto mechanismem jsou cytochromy P450 schopné provádět rozličné aromatické a alifatické hydroxylace, epoxidace, N-, O-, S-dealkylace a N-, S-oxidace. Povaha výsledného produktu je určována sterickými interakcemi mezi enzymem a substrátem, které vymezují oblasti molekuly přístupné pro oxidaci a termodynamickými faktory, které mohou ovlivnit relativní rychlosti konkurenčních reakcí (Evans 2004). Pro katalytickou funkci cytochromů je nezbytný nejen vlastní cytochrom P450, ale i enzym NADPH-cytochrom P450 reduktasa, jehož funkcí je přenos redukčních ekvivalentů z NADPH na hem cytochromu P450 a fosfolipidová frakce membrán – fosfatidylcholin, který pravděpodobně udržuje nativní konformaci obou enzymů (Gibson and Skett 2001).

Z hlediska biotransformace xenobiotik je důležité zmínit, že ačkoliv jsou cytochromy P450 obecně známé jako monooxygenasové systémy, vůči některým xenobiotikům vykazují i reduktasovou aktivitu. Tato aktivita může být doprovázená tvorbou volných radikálů a při metabolismu xenobiotika může mít značný toxikologický význam.



**Obrázek 1.** Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z Gibson and Skett 2001).

### *Flavinové monooxygenasy*

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou přítomny v mnoha tkáních, ale nejvyšší hladiny FMO byly nalezeny v jaterní tkáni. Podobně jako CYP jsou lokalizovány na membránách hladkého endoplasmatického retikula. Působením FMO je metabolizována řada léčiv, např. fenothiaziny, efedrin, N-methylamfetamin a norkokain. Jejich substráty jsou typicky sloučeniny obsahující dusík, síru a fosfor, z nichž mnoho je i substrátem CYP. Produkty FMO se však mohou lišit od produktů reakcí katalyzovaných CYP. Mezi reakce katalyzované FMO patří např. N-oxidace terciárních a sekundárních aminů, hydroxylaminů, iminů a hydrazinů, S-oxidace thiolů, disulfidů, thioamidů, thiomocoviny a analogické reakce na fosforu.

Skupina FMO je nadrodinou enzymů zahrnující řadu isoform, které mají odlišnou primární strukturu a tedy i substrátovou specifitu. Členění FMO je analogické členění CYP. V současné době je rozeznáváno pět isoform FMO1-FMO5, z nichž hlavní jaterní isoformou u člověka je FMO3 (Gibson and Skett 2001).

FMO obsahují flavinadeninnukleotid (FAD) jako prosthetickou skupinu a pro svou funkci vyžadují donor elektronů (NADPH nebo NADH) a molekulární kyslík. V katalytickém cyklu je FAD nejprve redukován donorem elektronů na FADH<sub>2</sub>, který následně reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku meziprojektu hydroperoxidflavinu (FADH-OOH). Poté přistupuje substrát, který je oxidován a FADH-OOH se mění na hydroxidflavin (FADH-OH), který je následně za odštěpení molekuly vody regenerován na FAD (Gibson and Skett 2001).

### *Jiné oxidační enzymy*

Oxidační biotransformace xenobiotik může být v organismu katalyzována řadou dalších enzymů. Tyto enzymy se podílí hlavně na metabolismu endogenních látek, ale mohou být také určitou mírou zapojeny do metabolismu xenobiotik. Jako příklady mohou být uvedeny následující enzymy:

- alkoholdehydrogenasy (ADH) a aldehyddehydrogenasy (ALDH) – nalézají se hlavně v játrech, ale také v ledvinách, plicích a gastrointestinálním traktu, jsou lokalizovány v cytosolu, používají  $\text{NAD}^+$  jako kofaktor, ADH katalyzují oxidaci alkoholů na odpovídající aldehydy, ALDH katalyzují oxidaci aldehydů na odpovídající karboxylové kyseliny
- xanthinoxidasa – flavoprotein, katalyzuje postupnou oxidaci hypoxanthinu na xanthin a kyselinu močovou, metabolizuje sloučeniny obsahující xanthin ve své molekule
- monoaminoxidasa (MAO) – u lidí jsou přítomny dvě formy (MAO-A a MAO-B), vyskytují se v játrech, ledvinách, ve střevech a mozku, jsou lokalizovány v mitochondriích, katalyzují oxidativní deaminaci, MAO-A přednostně oxiduje serotonin (5-hydroxytryptamin), zatímco mezi substráty MAO-B patří arylalkylaminy jako např. fenylethylamin a benzylamin

### 2.1.1.2. Hydrolýza

Hydrolytické enzymy katalyzují rozklad kovalentních vazeb, které vznikly kondenzací, tj. reakcí v jejímž průběhu došlo ke vzniku produktu a odštěpení molekuly vody. Hydrolýzou substrátu často dochází k odštěpení velké části molekuly a tím k rozsáhlé změně jeho struktury. Mezi substráty hydrolytických enzymů patří estery, amidy, hydrazidy, karbamáty, hydroxámové kyseliny a další. Hydrolytické enzymy jsou všudypřítomné a vyskytují se v krevní plasmě, erytrocytech i buňkách tkání. Jako příklady hydrolas mohou být uvedeny arylesterasy, karboxyesterasy, acetylerasy a cholinesterasa (Gibson and Skett 2001).

### 2.1.1.3. Hydratace

Na hydrataci může být pohlíženo jako na zvláštní formu hydrolýzy, kdy zavedení molekuly vody do sloučeniny nezpůsobuje její disociaci.

### *Epoxid hydrolasa (EH)*

EH katalyzuje zavedení molekuly vody do epoxidů a arenoxidů za vzniku diolů. Tyto potenciálně toxické elektrofilní epoxidy často vznikají jako produkty oxidace alkenů a aromatických uhlovodíků katalyzované cytochromy P450. Distribuce EH v těle se velmi podobá distribuci cytochromů P450, kdy nejvyšší koncentrace byly nalezeny v játrech a značné množství EH bylo také nalezeno ve varlatech, ledvinách, plicích a nadledvinkách. Lidská játra obsahují přinejmenším čtyři formy EH.

Mezi substráty EH patří epoxidové metabolity karbamazepinu a různých polycyklických aromatických uhlovodíků. Vedle epoxidů léčiv a jiných xenobiotik EH také katalyzuje hydrataci endogenních epoxidů, mezi které patří např. 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -epoxyandrosten-3-on a 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -epoxyestratrienol (Gibson and Skett 2001).

K hydrolyze epoxidů pomocí EH dochází odtržením protonu z molekuly vody za vzniku nukleofilního hydroxidového iontu, který napadá jeden z uhlíkových atomů epoxidu. K následné protonaci přechodného alkoxidového iontu dochází většinou na opačné straně molekuly a vzniklý produkt má *trans* konfiguraci (Evans 2004).

#### 2.1.1.4. Redukce

V živočišném organismu jako v organismu striktně aerobním jsou obecně preferovány spíše oxidační než redukční procesy. Teprve v posledních letech bylo získáno více informací o významné úloze redukčních reakcí. Bylo zjištěno, že redukce patří k hlavním metabolickým přeměnám řady významných léčiv a jiných xenobiotik.

Redukční enzymy jsou obsaženy nejvíce v membránách hladkého endoplasmatického retikula a v cytosolu. Jako koenzymy vyžadují NADH nebo NADPH. Také bakterie střevní flóry mají významný redukční potenciál. Redukční reakce lze rozřadit podle typu funkční skupiny, na které dochází k přeměně:

- redukce atomů uhlíku – redukce dvojných vazeb mezi atomy uhlíku, deoxygenace arenoxidů, redukce chinonů a hydroperoxidů
- redukční dehalogenace
- redukce skupin obsahujících atom dusíku – redukce N-oxidů, nitro sloučenin, nitroso sloučenin, hydroxylaminů, azo sloučenin
- redukce skupin obsahujících atom síry – sulfoxidy, disulfidy
- redukce anorganických a organokovových sloučenin
- redukce karbonylové skupiny

Z velkého počtu enzymů a enzymových komplexů, které se podílejí na redukčním metabolismu různých chemických sloučenin, mají významné postavení enzymy metabolizující karbonylovou skupinu. Sloučeniny s karbonylovou skupinou (aldehydy, ketony) mohou být exogenního i endogenního původu (meziprodukty metabolismu). Tyto karbonylové sloučeniny (zejména aldehydy) jsou schopné vytvářet s proteiny Schiffovy báze, reagovat s thiolovými skupinami makromolekul a interagovat s DNA. Z důvodu této reaktivity potřebují buňky ochranu proti karbonylovým sloučeninám, které je dosaženo biotransformačními enzymy. Metabolická redukce karbonylové skupiny na odpovídající alkohol vede ke zvýšení polaritě molekuly a vzniku produktu, který může být konjugován s endogenními substráty, čímž usnadňuje eliminaci (Maser and Oppermann 1997).

Hlavní savčí cytosolické enzymy redukující karbonylovou skupinu jsou karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184), aldehydreduktasa (EC 1.1.1.2), aldosareduktasa (EC 1.1.1.21) a dihydrodioldehydrogenasy. Tyto enzymy jsou charakterizovány širokou a překrývající se substrátovou specifitou. Vedle jejich úlohy v reakcích I. fáze biotransformace xenobiotik jsou také zapojeny do metabolismu endogenních sloučenin, např. steroidních hormonů, žlučových kyselin, arachidonové kyseliny. Tato dvojí substrátová specifita je také charakteristická pro jaterní mikrosomální  $11\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasu typu I ( $11\beta$ -HSD-1), která se účastní metabolismu fyziologických steroidních hormonů a také redukuje karbonylovou skupinu nesteroidních aldehydů, ketonů a chinonů. U některých enzymů redukujících karbonylovou skupinu byla nalezena aktivita redukovat chinony, která ukazuje na možnou úlohu při oxidativním stresu (Opperman and Maser 2000).

V současné době náleží většina enzymů redukujících karbonylovou skupinu do dvou odlišných nadrodin proteinů – do nadrodiny aldo-keto reduktas (aldo-keto reduktase (AKR) superfamily) nebo nadrodiny „short-chain“ dehydrogenas/reduktas (short-chain dehydrogenase/reduktase (SDR) superfamily). Do nadrodiny AKR patří např. aldehydreduktasa (EC 1.1.1.2), aldosareduktasa (EC 1.1.1.21) a dihydrodioldehydrogenasy. Systematická nomenklatura nadrodiny AKR je založena na podobnosti aminokyselinové sekvence jednotlivých proteinů a umožňuje členění na rodiny, podrodiny a jednotlivé enzymy, např. AKR1A1 označuje lidskou jaterní aldehydreduktasu (EC 1.1.1.2) (Jez and Penning 2001). Do nadrodiny SDR patří např. cytosolická karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184) nebo mikrosomální  $11\beta$ -HSD-1.

Mezi další enzymy, které hrají důležitou roli při redukci xenobiotik patří např. alkoholdehydrogenasy (ADH), cytochrom P450, NADPH-cytochrom P450 reduktasa, NADH-cytochrom b5 reduktasa, xanthinoxidasa, chinonreduktasa, peroxidasy (Testa 1995).

## 2.1.2. Enzymatické reakce II. fáze biotransformace

II. fáze biotransformace je zprostředkována řadou konjugačních enzymů, které napadají funkční skupiny jako -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH přirozeně se vyskytující v cílové molekule nebo vytvořené během I. fáze biotransformace. Při reakcích II. fáze biotransformace, jejichž produktem je konjugát substrátu s endogenním činidlem, vznikají převážně polárnější, snadněji vylučitelné sloučeniny, které většinou postrádají významnější farmakologickou nebo toxikologickou aktivitu.

### 2.1.2.1. Glukuronidace

Glukuronidace je hlavní metabolickou cestou II. fáze biotransformace a zahrnuje přenos  $\alpha$ -D-glukuronové kyseliny na cílový substrát. Tyto konjugační reakce jsou katalyzovány rodinou enzymů nazývaných uridindifosfát (UDP)-glukuronosyltransferasy, které vyžadují kofaktor UDP- $\alpha$ -D-glukuronovou kyselinu (UDPGA). UDP-glukuronosyltransferasy jsou membránově vázané proteiny lokalizované v endoplasmatickém retikulu a jaderné membráně buněk. Nacházejí se hlavně v játrech, ale jsou přítomny také v ledvinách, plicích, střevech a kůži. UDP-glukuronosyltransferasy mají širokou a překrývající se substrátovou specifitu pro xenobiotika, ale vykazují větší specifitu pro endogenní sloučeniny (steroidní hormony, katecholaminy, bilirubin), které všeobecně reagují s jednou specifickou formou UDP-glukuronosyltransferasy (Evans 2004). Podle typu funkční skupiny, která podléhá konjugaci, můžeme glukuronidy rozdělit na:

- O-glukuronidy: alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny a hydroxylaminy
- N-glukuronidy: aminy (alifatické i aromatické), amidy, sulfoamidy, terciární aminy
- S-glukuronidy: thioly
- C-glukuronidy: 1,3-dikarboonylové sloučeniny

Pro klasifikaci UDP-glukuronosyltransferas byla vyvinuta systematická nomenklatura, která je založena na podobnosti aminokyselinové sekvence jednotlivých

isoformem. Isoformy se sekvenční homologií větší než 50 procent jsou přiřazeny do stejné rodiny (např. UGT1, UGT2, atd.). Isoformy se sekvenční homologií větší než 60 procent náleží do stejné podrodiny (např. UGT1A) a každý člen podrodiny, tj. individuální isoforma, je označen číslicí (např. UGT1A1, UGT1A3, atd.). U člověka bylo zatím identifikováno přibližně 15 UDP-glukuronosyltransferas (Gibson and Skett 2001).

#### 2.1.2.2. Sulfatace

Sulfotransferasy tvoří rozsáhlou rodinu enzymů, které katalyzují přenos sulfátu z kofaktoru 3'-fosoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na cílový substrát. Tyto enzymy hrají důležitou úlohu v metabolismu a vylučování jak endogenních sloučenin tak xenobiotik. Sulfotransferasy zapojené do metabolismu xenobiotik jsou cytosolické enzymy a nacházejí se především v játrech, ledvinách, gastrointestinálním traktu a krevních destičkách. Sulfatace je hlavní konjugační cestou fenolů, ale může se také vyskytovat u alkoholů, aminů (zejména aromatických aminů) a sulfoamidů. Mezi endogenní substráty sulfotransferas patří např. steroidní hormony, žlučové kyseliny a katecholaminy. Jak je vidět, většina xenobiotik a endogenních sloučenin podléhajících glukuronidaci, může být také sulfatována, což vede k možnosti soutěžení o substrát mezi těmito dvěma cestami. Díky kinetice těchto dvou reakcí a omezené nabídce PAPS oproti UDPGA většinou převládá sulfatace při nízkých koncentracích substrátu a glukuronidace při vysokých koncentracích substrátu.

Podobně jako u cytochromů P450 a UDP-glukuronosyltransferas je nová nomenklatura sulfotransferas založena na podobnosti aminokyselinové sekvence jednotlivých isoformem. U člověka bylo zatím identifikováno přibližně 11 sulfotransferas (Gibson and Skett 2001).

#### 2.1.2.3. Methylace

Methylace je méně významná cesta biotransformace xenobiotik a zapojuje se hlavně do metabolismu endogenních sloučenin. Od ostatních reakcí II. fáze biotransformace se odlišuje tím, že většinou vede ke snížení rozpustnosti xenobiotika ve vodě. Tyto konjugační reakce jsou katalyzovány methyltransferasami a vyžadují kofaktor S-adenosylmethionin. Podle atomu, na který je methylová skupina přenesena, rozlišujeme O-, N- a S- methylaci.

- fenol-O-methyltransferasa – mikrosomální enzym, methylace fenolů
- katechol-O-methyltransferasa – cytosolický enzym, přítomen ve většině tkání, nejvyšší koncentrace v játrech a ledvinách, mezi jeho substráty patří neurotransmitery (adrenalin, noradrenalin a dopamin) a léky obsahující katecholovou skupinou (L-dopa, isoprenalin, dobutamin)
- histamin-N-methyltransferasa – methylace imidazolového kruhu histaminu
- nikotinamid-N-methyltransferasa – methylace sloučenin obsahujících pyridinový kruh (nikotin) nebo indolový kruh (serotonin)
- thiopurinmethyltransferasa
- thiolmethyltransferasa

#### 2.1.2.4. Acetylace

Acetylace je významnou cestou biotransformace xenobiotik obsahujících aromatickou amino ( $R-NH_2$ ) nebo hydrazinovou skupinu ( $R-NH-NH_2$ ), ze kterých vznikají aromatické amidy ( $R-NH-COCH_3$ ) nebo hydrazidy ( $R-NH-NH-COCH_3$ ). Xenobiotika obsahující primární alifatickou amino skupinu nejsou běžné substráty pro N-acetylaci, ačkoli cysteinové konjugáty, které vznikají z konjugátů s glutathionem, podléhají této reakci v ledvinách za vzniku derivátů kyseliny merkapturové. Při N-acetylaci dochází k zavedení neionizované skupiny do molekuly xenobiotika a výsledný metabolit je často méně rozpustný ve vodě než původní látka.

N-acetylace xenobiotik je katalyzována cytoplasmatickým enzymem N-acetyltransferasou za přítomnosti acetyl-koenzymu A jako donoru acetylové skupiny. U lidí byly nalezeny dvě N-acetyltransferasy (NAT) označované jako NAT1 a NAT2. NAT1 je přítomna ve většině tkání, zatímco NAT2 je přítomna v játrech a střevě (Evans 2004).

#### 2.1.2.5. Konjugace s aminokyselinami

Xenobiotika obsahující karboxylovou skupinu mohou konjugovat s amino skupinou endogenních aminokyselin. Mezi substráty pro konjugaci s aminokyselinami patří některé alifatické, aromatické, heterocyklické a aryloctové kyseliny. Tato biotransformace vyžaduje nejprve aktivaci xenobiotika koenzymem A (CoA) za působení mitochondriální acyl-CoA synthasy, jejímž produktem je acyl-CoA. Druhý krok zahrnuje přenos acylu xenobiotika na amino skupinu aminokyseliny a je



katalyzován acyl-CoA: aminokyselina N-acyltransferasou, která je lokalizována v cytosolu a/nebo mitochondriích. Výběr aminokyseliny pro konjugaci je závislý na živočišném druhu a typu xenobiotika. Mezi využívané aminokyseliny patří např. glycin, glutamin, taurin a histidin (Evans 2004).

#### 2.1.2.6. Konjugace s glutathionem

Glutathion-S-transferasy zapojené do metabolismu xenobiotik jsou převážně cytosolické enzymy přítomné ve většině tkání, ale hlavně v játrech, střevě, ledvinách, nadledvinkách a plicích. Konjugaci s glutathionem ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) podléhají různé sloučeniny nebo jejich metabolity, které jsou silnými elektrofilny, např. sloučeniny obsahující aktivovanou dvojnou vazbu (ortho pozice fenolické skupiny), epoxidy, halogenované (nebo nitro) alkany a aromáty a halogenované heterocyklické sloučeniny. Glutathion se váže na substrát skrze nukleofilní atom síry cysteinylu.

Konjugáty s glutathionem mohou být vylučovány přímo do žluči nebo podléhat následné transformaci za vzniku derivátů kyseliny merkapturové (N-acetylcysteinových konjugátů), které jsou vyloučeny do žluči nebo moči. Tento proces zahrnuje postupné odštěpení zbytků kyseliny glutamové a glycinu za vzniku cysteinového konjugátu, který je následně N-acetylován. Cysteinový konjugát xenobiotika může podléhat alternativní metabolické cestě, kdy je štěpen  $\beta$ -lyasou za vzniku metabolitu s thiolovou skupinou, který může podléhat následné methylaci a oxidaci na atomu síry (Gibson and Skett 2001, Evans 2004).

Konjugace s glutathionem hraje také důležitou úlohu při biosynthese leukotrienů. Tyto reakce jsou katalyzovány mikrosomální formou glutathion-S-transferasy (Gibson and Skett 2001).

#### 2.1.3. Stereochemická hlediska biotransformace xenobiotik

Chirální, neboli opticky aktivní látky, představují určitý typ izomerie. Jejich struktura je asymetrická. Molekuly jedné chirální látky, tzv. enantiomery, jsou si navzájem zrcadlovými obrazy. Jsou si strukturně velmi podobné a shodují se téměř ve všech svých fyzikálních a fyzikálně-chemických vlastnostech. Základní vlastností, ve které se liší, je schopnost stáčení roviny polarizovaného světla. Opticky aktivní látky tvoří nedílnou součást našeho života, neboť právě z nich jsou v podstatné míře složeny živé systémy.

Směs, ve které mají enantiomery rovnoměrné zastoupení (50/50), se označuje jako racemát. Kromě stáčení roviny polarizovaného světla se enantiomery ještě liší v reaktivitě s jinými opticky aktivními izomery. Chování levo a pravotočivé formy se může lišit, protože do hry vstupuje specifická geometrie. Jako krajní případy lze uvést enzymy nebo receptory na povrchu buněk, které rozpoznávají pouze jednu (správnou) formu příslušné látky. Obecně lze říci, že afinity optických izomerů jedné látky k místu svého působení mohou být různé.

Mezi chirální látky patří i celá řada léčiv. Nejčastější formou chiralit je přítomnost jednoho nebo více chirálních atomů ve struktuře léčiva. Řadu let přetrvával názor, že se jednotlivé enantiomery liší pouze optickou otáčivostí a reaktivitou s chirálními látkami, a že z farmakologického hlediska mezi nimi není rozdíl. Znalost prostorové orientace chemické struktury léčiva je v dnešní době jedním ze základních kamenů plánování biologických experimentů a klinických zkoušek (Kean *et al.* 1991). Právě rozdílná biologická aktivita jednotlivých enantiomerů představuje jinou dimenzi v chápání účinku chirálních léčiv. Jako příklad lze uvést levodopu, látku určenou k léčbě Parkinsonovy choroby. Protože řada vedlejších účinků je spojena s D-enantiomerem, používá se místo racemátu pouze L-forma (Cotzias *et al.* 1969). Zajímavým případem je propoxyfen, kdy se dextropropoxyfen používá jako analgetikum a levopropoxyfen se používá jako antitusikum.

Enantiomery se liší i svými farmakokinetickými parametry jako jsou absorpce, metabolismus, distribuce a exkrece. Rozdíly v absorpci se týkají pouze léčiv, které podstupují aktivní transport (např. DOPA, methotrexat). Kinetické parametry enantiomerů látek, které prostupují pasivní difúzí se neliší. Rozdíly v distribuci zahrnují vazbu na plasmatické a tkáňové bílkoviny. Stereoselektivně jsou totiž vázána léčiva jak na albumin (převážně látky kyselé povahy), tak na  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein (bazické látky). Stereoselektivní vazbu na bílkoviny lze demonstrovat na příkladu tryptofanu. L-tryptofan se váže na lidský sérový albumin přibližně 100 krát více než D-tryptofan (McMenamy and Oncley 1958). Jde o velmi důležitou charakteristiku látky, neboť výsledný farmakodynamický účinek je závislý na koncentraci volné, nevázané, frakce léčiva. Enantiomery mohou být vylučovány v různé míře, pokud budou stejně jako při absorpci podstupovat aktivní transport.

Biotransformační enzymy, podobně jako receptory, jsou chirální makromolekuly. Z tohoto důvodu mohou být enantiomery chirální molekuly substrátu metabolizovány odlišně jak z kvalitativního, tak kvantitativního hlediska. Stereochemický průběh

biotransformačních reakcí můžeme nalézt na substrátové i na produktové úrovni. Substrátová stereoselektivita vyjadřuje přednostní biotransformaci jednoho stereoisomeru nad druhým. Stereospecifita se vztahuje k přednostní tvorbě jednoho určitého stereoisomeru nad ostatními možnými stereoisomery. Na základě stereochemického průběhu je možné rozdělit biotransformační reakce do pěti tříd (Caldwell 1995).

#### *Prochirální na chirální*

Jestliže nechirální sloučenina obsahuje prochirální skupinu, může vést biotransformace této sloučeniny ke vzniku chirálních metabolitů. Jako příklad lze uvést hydroxylaci ethylbenzenu za vzniku 1-fenylethanolu, aromatickou hydroxylaci fenytoinu za vzniku 4-hydroxyfenytoinu nebo redukci nesymetricky substituovaných ketonů za vzniku sekundárních alkoholů. V případě biotransformace prochirálních substrátů je chiralita vzniklých metabolitů funkcí pouze biologického systému odpovědného za metabolismus a nemůže být ovlivněna podávaným substrátem.

#### *Chirální na chirální*

Enantiomery chirálního léčiva mohou být biotransformovány rozdílnými rychlostmi a/nebo rozdílnými biotransformačními cestami za vzniku metabolitů, které mají zachovanou, s ohledem na substrát, původní stereochemii. Jako příklad lze uvést hydroxylaci warfarinu u člověka, která je stereoselektivní pro *S*-enantiomer substrátu a poskytuje (*S*)-7-hydroxywarfarin.

#### *Chirální na diastereoisomerní metabolity*

Mnoho chirálních léčiv podléhá metabolické přeměně, při které je do molekuly zavedeno druhé chirální centrum a vznikají tedy diastereoisomery. Chirální substráty mohou být metabolizovány za vzniku diastereoisomerů, buď transformací na prochirální skupině nebo konjugací s chirálním endogenním činidlem. Jako příklad biotransformace na prochirálním centru lze uvést biotransformaci warfarinu, který je (vedle aromatické hydroxylace kumarinového kruhu) redukován na ketoskupině postranního řetězce. Tato redukce utváří nové chirální centrum, které má za následek tvorbu diastereoisomerních metabolitů. Dva různé stereochemické průběhy mohou být rozpoznány u konjugačních reakcí. Enantiomery mohou být konjugovány buď s achirálním nebo chirálním konjugačním činidlem, přičemž rychlost konjugace je často různá pro jednotlivé

enantiomery. Mezi achirální konjugační činidla patří methylová a acetylová skupina, sulfát a aminokyseliny glycin a taurin. Chirální konjugační činidla mají neměnnou konfiguraci a patří mezi ně kyselina glukuronová, glukosa, glutathion a glutamin.

#### *Chirální na nechirální*

Ztráta chiralitity může být způsobena oxidativní biotransformací na chirálním centru, např. oxidací sekundárních alkoholů za vzniku ketonů, deaminací amfetaminu za vzniku fenylacetonu a oxidativní aromatizací dihydropyridinového kruhu nilvadipinu.

#### *Metabolická chirální inverze*

Reakce typu metabolické chirální inverze byly nejvíce prostudovány u rozličných derivátů 2-arylpropionové kyseliny (tzv. profenů). Tyto sloučeniny mají chirální atom uhlíku v  $\alpha$ - poloze vzhledem ke karbonylové skupině a za jejich farmakologickou aktivitu jsou zodpovědné hlavně *S*-enantiomery. Tato skupina látek je z metabolického pohledu charakteristická tím, že jejich *R*-enantiomery, které jsou v *in vitro* testech farmakologicky pouze slabě aktivní nebo zcela inaktivní, podléhají metabolické chirální inverzi za vzniku příslušného *S*-enantiomeru. Tato inverzní přeměna jednoho optického isomeru na druhý probíhá přes meziproduct acyl-CoA s příslušnou propionovou kyselinou. Acyl-CoA syntetasa, která katalyzuje tvorbu propionyl-CoA, si selektivně vybírá pouze *R*-enantiomer substrátu a jedná se tedy o vysoce stereoselektivní děj. Rozsah chirální inverze závisí jak na struktuře substrátu, tak na studovaném zvířecím modelu.

Deriváty 2-arylpropionové kyseliny nejsou ale jedinou skupinou léků, u kterých byla nalezena chirální inverze. Chirální inverze jednoho nebo dokonce obou enantiomerů byla popsána pro řadu léčiv, jejichž struktury jsou zcela odlišné od derivátů 2-arylpropionové kyseliny. Chirální inverze byla také popsána u chirálních metabolitů, které vznikly biotransformací chirálního nebo prochirálního léčiva (Wsól *et al.* 2004).

## 2.2. Studium metabolismu léčiv pomocí LC/MS

Studium metabolického osudu léčiva je nezbytnou a důležitou součástí procesu vývoje léčiva. Mezi ADME (absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace) charakteristikami má metabolická charakterizace klíčovou úlohu a je v současné době začleněna do ranné fáze vývoje léčiva. Informace potřebné ke stanovení metabolického osudu léčiva zahrnují detekci metabolitů, jejich strukturní charakterizaci a kvantitativní analýzu. V některých případech mohou být koncentrace metabolitů velmi nízké a je nezbytné použít vysoce specifické a citlivé analytické metody. Mezi metody používané pro analýzu léčiv a jejich metabolitů patří plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (GC/MS) a kapalinová chromatografie (LC) s UV, fluorescenční, radioaktivní a hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí. Zavedením technik ionizace elektrosprejem (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) se LC/MS pro svou specifitu, citlivost a efektivitu, stala ideální a široce používanou metodou v analýze metabolitů (Kostiainen *et al.* 2003). V následujících odstavcích jsou uvedeny některé techniky a přístupy používané k ionizaci, detekci a identifikaci metabolitů léčiv pomocí LC/MS.

### 2.2.1. Ionizační techniky

Zavedení ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (API), mezi které patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), umožnilo efektivní a robustní spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS). Instrumentální řešení API zdrojů a ionizační mechanismy pro ESI a APCI byly popsány v souhrnném článku (Niessen 1999) a knize (Ardrey 2003), a pro APPI v práci Robb *et al.* (2000). ESI umožňuje účinnou ionizaci různých typů molekul, včetně polárních, iontových a labilních sloučenin a molekul s vysokou molekulovou hmotností. APCI nejúčinněji ionizuje sloučeniny s nízkou až středně vysokou polaritou a je v tomto ohledu komplementární k ESI. Hmotnostní limit pro APCI je přibližně uvažován do 2000 Da. Nedávno představená metoda APPI rozšiřuje použitelnost API technik směrem k méně polárním sloučeninám. Ačkoliv ESI, APCI a APPI patří mezi „měkké“ ionizační techniky, volba iontového zdroje pro LC/MS metodu může významně ovlivnit

schopnost detekovat neznámé metabolity, zejména jedná-li se o labilní sloučeniny. Poněvadž ESI je „velmi měkká“ ionizační technika, je nejvhodnější pro studium labilních konjugátů. Stabilita karbamoyl glukuronidu při různých teplotách iontového zdroje byla studována pro ESI a APCI ionizaci (Liu and Pereira 2002). Ionizace ESI při 300°C umožnila detekci karbamoyl glukuronidu (*I-CG*) a byl nalezen pouze nepatrný signál parentní látky (*I*), vznikající fragmentací studovaného karbamoyl glukuronidu ve zdroji. Signál parentní látky (*I*) byl mnohem intenzivnější při zvýšení teploty na 400°C. Při použití APCI nebyl nalezen žádný pík karbamoyl glukuronidu bez ohledu na použitou teplotu (400°C nebo 300°C) a byl detekován pouze signál odpovídající parentní látce (*I*). V této práci byla také porovnána stabilita studovaného karbamoyl glukuronidu a acyl glukuronidu (*Z-AG*) vybrané karboxylové kyseliny (*Z*). V ESI módu byl acyl glukuronid (*Z-AG*) detekován jako hlavní pík při obou studovaných teplotách (300°C nebo 400°C). Intenzivní signál odpovídající fragmentací vzniklému aglykónu (*Z*) byl ale také pozorován. Při použití APCI byla nalezena rozsáhlá fragmentace acyl glukuronidu (*Z-AG*), ale i při teplotě 400°C bylo stále možné detekovat jeho signál. Zdá se tedy, že při použití APCI byl karbamoyl glukuronid více náchylný k fragmentaci ve zdroji než acyl glukuronid. Podobná situace je popsána v práci autorů Constanzer se sp. (2001), kteří se zabývali kvantitativním stanovením tepelně labilního metabolitu ve vzorcích plasmy. Při vývoji metody nejprve vycházeli z LC-APCI MS/MS metody, kterou použili pro stanovení plasmatických hladin parentního léčiva (*S-NH<sub>2</sub>*). Tato metoda, využívající k ionizaci APCI nastaveném na teplotu 500°C, se ale ukázala jako nevhodná pro analýzu N-hydroxylovaného metabolitu (*S-NHOH*), což bylo charakterizováno vysokými hodnotami pro přesnost stanovení *S-NHOH* (RSD > 20%, pro čistý standard). Použitím ESI namísto APCI bylo dosaženo dobré přesnosti stanovení (RSD < 3%, pro čistý standard) a teplotní nestabilita *S-NHOH* byla hlavní příčinou špatné reprodukovatelnosti při použití APCI. Využitelnost různých ionizačních technik (ESI, APCI a APPI) pro identifikaci metabolitů II. fáze biotransformace apomorfínu, dobutaminu a entacaponu byla porovnávána v práci autorů Keski-Hynnälä se sp. (2002). Použití ESI vedlo k detekci největšího počtu konjugátů (22), zatímco pomocí APCI bylo nalezeno pouze 12 konjugátů a pomocí APPI pouze 14 konjugátů. Konjugáty s methylem byly detekovány všemi ionizačními metodami. Glukuronidy byly nejúčinněji ionizovány ESI a pouze některé z nich byly detekovány pomocí APCI a APPI. Sensitivita APPI pro detekci glukuronidů byla o 1-3 řády nižší ve srovnání s ESI. Detekce konjugátů se sulfátem byla možná pouze při použití ESI.

Výsledky ukázaly, že ESI v pozitivním módu je vhodnější pro detekci termolabilních konjugátů studovaných sloučenin než APCI a APPI (také v pozitivním módu).

### 2.2.2. Detekce metabolitů

Společný postup při identifikaci metabolitů zahrnuje tvorbu metabolitů v *in vitro* nebo *in vivo* experimentech, kolekci vzorků v různých časových intervalech, včetně vzorku v čase nula (slepý vzorek) a jejich MS analýzu v plném skenu (full-scan). Následná identifikace metabolitů je založena na porovnání iontových chromatogramů mezi slepým vzorkem a ostatními vzorky. Detekované píky v iontových chromatogramech odpovídají potenciálním metabolitům s danou hodnotou poměru hmota/náboj ( $m/z$ ). U sloučenin obsahujících ve své molekule jeden nebo více atomů Cl nebo Br, jejichž hmotnostní spektra obsahují abundantní  $M+2$  isotopické ionty o známém poměru intenzit, se této vlastnosti nechá využít pro zvýšení spolehlivosti identifikace metabolitů z plného skenu. Pro zpracování dat byly vyvinuty speciální softwary pro identifikaci metabolitů. Dvě analýzy, jedna v pozitivním a druhá v negativním módu by měly být provedeny pro zajištění detekce basických a kyselých metabolitů.

Velká část prací, zabývajících se analýzou metabolitů, je provedena pomocí trojitého kvadrupólu (QQQ), jehož tandemové hmotnostně spektrometrické (MS/MS) skenovací techniky jsou velmi užitečné při identifikaci metabolitů a poskytují požadovanou specifitu a sensitivitu. Sensitivita identifikace metabolitů pomocí QQQ v plném skenu je ale nižší než u iontové pasti (IT) a hmotnostního spektrometru na principu doby letu (TOF), které poskytují vysokou sensitivitu v plném skenu. API-TOF hmotnostní spektrometry navíc poskytují analýzy s vysokým rozlišením a přesností určení hmoty lepší než 10 ppm, což umožňuje stanovení elementárního složení metabolitů a vysokou specifitu jejich detekce.

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) nabízí více specifickou detekci metabolitů ve složitých maticích než MS analýza v plném skenu s jednotkovým rozlišením. Metabolity jsou deriváty parentního léčiva a je tedy možné předpokládat, že mnoho metabolitů bude mít stejné produktové ionty nebo neutrální ztráty jako parentní látka. Z tohoto důvodu jsou MS/MS techniky skenu prekurzorových iontů a skenu neutrální ztráty obzvláště vhodné pro detekci skupin metabolitů s určitým strukturním motivem. Např. metabolity II. fáze, jako glukuronidy a sulfáty, mohou být selektivně

detekovány pomocí skenu neutrální ztráty, a to 176 a 80 Da, v pozitivním ESI módu. V negativním ESI módu, konjugáty se sulfátem poskytují abundantní produktové ionty o  $m/z$  80 ( $\text{SO}_3^-$ ) a  $m/z$  97 ( $\text{HSO}_4^-$ ), kdežto glukuronidy poskytují produktové ionty o  $m/z$  175 ( $[\text{Glu} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$ ) a  $m/z$  113 ( $[\text{Glu} - \text{H} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2]^-$ ). Tyto specifické ionty se nechají využít pro selektivní detekci sulfátů a glukuronidů ve skenu prekurzorových iontů. Sken neutrální ztráty a prekurzorových iontů lze také navrhnout na základě charakteristických neutrálních ztrát a produktových iontů vybraných z MS/MS spekter parentních sloučenin (Steen *et al.* 2001). Dva produktové ionty o  $m/z$  358 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]^+$ ) a  $m/z$  288 ( $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} - 2\text{Cl}]^+$ ) byly vybrány ze spektra produktových iontů studovaného pesticidu fenchlorazol-ethylu. Za použití skenu prekurzorových iontů byly v chromatogramu celkového iontového proudu detekovány dva transformační produkty pesticidu a následně identifikovány jako fenchlorazol-methyl a fenchlorazol. Obdobně byl pomocí skenu neutrální ztráty 131 u detekován transformační produkt pesticidu furathiocarbu. Ačkoliv oba typy skenů poskytují vysokou selektivitu pro identifikaci metabolitů v biologických matricích, identifikace metabolitů z chromatogramu celkového iontového proudu nemusí být vždy přímočará, zejména v případě nízkých koncentrací metabolitů a složitých maticí jako je např. moč (Link *et al.* 2006). Dále je nutné mít na paměti, že metody skenu prekurzorových iontů a neutrální ztráty jsou založeny na předpokládaném fragmentačním chování metabolitů a metabolity s nepředvídanou fragmentací nemusí být odhaleny.

### 2.2.3. Identifikace metabolitů

Identifikace metabolitů pomocí hmotnostní spektrometrie se spoléhá na interpretaci spekter produktových iontů získaných pomocí techniky skenu produktových iontů na některém z tandemových hmotnostních spektrometrů. Mezi tandemové hmotnostní spektrometry, které se rutinně používají ke strukturní analýze metabolitů patří QQQ, IT a hybridní přístroje kombinující kvadrupól s iontovou pastí (Q-TRAP) a kvadrupól s hmotnostním spektrometrem na principu doby letu (Q-TOF). Posledně zmíněný hmotnostní spektrometr umožňuje měření spekter produktových iontů s vysokou citlivostí a stanovení elementárního složení produktových iontů pomocí přesného určení hmoty. K získání informace o struktuře metabolitu lze také využít vícenásobnou tandemovou hmotnostně spektrometrickou analýzu ( $\text{MS}^n$ ) na iontové pastí. Produktové ionty vzniklé např. během MS/MS mohou být selektivně izolovány a



podrobeny další fragmentaci, což vede ke zužování možných míst modifikace a poskytnutí kompletnější charakterizace struktury metabolitu. Tyto experimenty jsou velmi vhodné pro strukturní analýzu konjugátů, poněvadž umožňují rozlišení produktových iontů intaktního konjugátu a nekonjugované sloučeniny, tj. metabolitu I. fáze (Levsen *et al.* 2005).

Strukturní charakterizace metabolitů pomocí MS/MS (nebo MS<sup>n</sup>) začíná porovnáním spekter produktových iontů metabolitů se spektrem produktových iontů parentní látky a podrobnou interpretací fragmentačních cest. Tento postup poskytuje strukturní informaci ohledně typu a místa metabolické modifikace a většinou vede ke stanovení nebo návrhu struktury metabolitu. Anari *et al.* (2004) použili úspěšně tuto metodu pro stanovení místa biotransformace indinaviru s použitím IT. Metabolismus indinaviru lidskými jaterními mikrosomy vedl k tvorbě 2 dealkylovaných, 11 monooxidovaných, 3 dioxidovaných a 2 dealkylovaných/monooxidovaných metabolitů. Ačkoliv nebylo možné přesně stanovit místo jednotlivých oxidací, určení struktury fragmentů indinaviru a jejich přiřazení k produktovým iontům metabolitů umožnilo jejich částečnou lokalizaci a stanovení struktury dealkylovaných metabolitů. Také Keski-Hynnälä *et al.* (2002) byli schopni lokalizovat, pomocí strukturně charakteristických produktových iontů, místo methylace dobutaminu. Stejní autoři zároveň ukázali, že místo glukuronidace nebo sulfonace nebylo možné stanovit z MS/MS experimentů, poněvadž primární štěpení vedlo ke ztrátě konjugované skupiny (kyselina glukuronová nebo SO<sub>3</sub>) a strukturně charakteristické produktové ionty nebyly utvořeny. MS/MS spektra metabolitů II. fáze, zejména konjugátů s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetylem a aminokyselinami, velmi často neobsahují strukturně charakteristické produktové ionty a neumožňují tedy určení místa biotransformace (Levsen *et al.* 2005). Z uvedeného je vidět, že informace obsažené v MS/MS spektrech metabolitů nemusí postačovat k určení jejich struktury, a že strukturní analýza metabolitů není vždy přímočará.

K účinným nástrojům strukturní charakterizace metabolitů patří spojení LC-MS/MS s technikami jako jsou chemická derivatizace a on-line H/D (hydrogen/deuterium) výměna (Liu and Hop 2005). Biotransformace xenobiotik často zahrnuje zavedení jedné nebo více polárních funkčních skupin a následnou konjugaci s kyselinou glukuronovou, sulfátem, glycinem atd. Zavedení polárních funkčních skupin obvykle zvyšuje počet vyměnitelných vodíků (měřitelné H/D výměnou) a přináší funkční skupiny pro derivatizaci. Na druhé straně, konjugační reakce blokují tyto

aktivní místa pro chemickou derivatizaci. On-line H/D výměna a chemická derivatizace tedy nabízejí velkou podporu pro strukturní charakterizaci metabolitů. Důležité také je, že díky selektivitě a sensitivitě LC/MS mohou být tyto experimenty provedeny s malým množstvím surového vzorku, což umožňuje vyvarovat se časově a technicky náročné purifikaci malých množství metabolitů ze složitých biologických maticí.

Velmi cenné informace o struktuře metabolitů mohou být získány analýzou MS a MS/MS dat před a po chemickém zásahu. Metody chemické derivatizace byly využity např. při stanovení místa hydroxylace (odlišení primární a sekundární hydroxylové skupiny), při identifikaci S-oxidovaných a N-oxidovaných metabolitů a také při stanovení místa konjugace s kyselinou glukuronovou. Schaefer se sp. (1992) použili strategii selektivní acetylce pro určení místa glukuronidace karvedilolu. Karvedilol obsahuje alifatickou hydroxylovou skupinu, alifatickou amino skupinu a karbazolovou amino skupinu, které jsou všechny potenciální skupiny pro glukuronidaci. Použitý přístup spoléhá na selektivní acetylaci hydroxylové a amino skupiny za odlišných podmínek. V nevodném roztoku, v přítomnosti base (jako pyridin), jsou amino a hydroxylová skupina snadno acetylovány pomocí acetanhydridu. Ve vodném roztoku, pouze nukleofilnější amino skupiny jsou acetylovány pomocí acetanhydridu (acetylce hydroxylové skupiny je bráněna přítomností vody). Vedle toho, pokud jsou amino a hydroxylová skupina konjugovány s kyselinou glukuronovou, jsou blokovány a tedy nepřístupné acetylaci. Pro určení počtu připojených acetylových skupin byla reakční směs po derivatizaci analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. Místo glukuronidace bylo stanoveno na základě počtu acetylových skupin připojených v nevodném a vodném prostředí.

Stanovení počtu vyměnitelných atomů vodíku v dané struktuře může poskytnout dodatečné informace pro její identifikaci. Biotransformace xenobiotik obvykle zahrnuje zavedení polárních funkčních skupin, jako např. hydroxylové skupiny, nebo blokování určitých funkčních skupin a vede tedy ke změnám počtu vyměnitelných atomů vodíku, které při střetnutí s deuterovaným rozpouštědlem nebo reagensy podléhají výměně za deuterium. Účinnost H/D výměny pro různé ionizační techniky a způsoby zavedení vzorku byla popsána v práci autorů Ohashi se sp. (1998). Ve spojení s LC-ESI/MS lze H/D výměnu provést on-line použitím D<sub>2</sub>O (oxidu deuteria) namísto H<sub>2</sub>O, jako vodné složky mobilní fáze (Karlsson 1993). Počet vyměnitelných vodíků je stanoven na základě porovnání hmotnostních spekter metabolitů zaznamenaných během LC/MS analýzy s použitím H<sub>2</sub>O nebo D<sub>2</sub>O v mobilní fázi. Liu se sp. (2001) použili tuto

techniku pro strukturní charakterizaci metabolitů nového potenciálního léčiva. Metabolit M1, který patřil mezi hlavní metabolity studovaného léčiva, poskytl protonované molekuly o 16 Da vyšší, než byly protonované molekuly parentní látky. M1 bylo tedy možné považovat za (mono)oxidovaný metabolit. Spektrum produktových iontů M1 ukázalo, že molekula parentní látky byla oxidována v části obsahující atom síry. M1 mohl tedy být hydroxylovaný nebo S-oxidovaný metabolit. Ačkoliv oba metabolity mají atom kyslíku ve své molekule, pouze hydroxylovaný metabolit bude zvyšovat (v porovnání s parentní látkou) počet vyměnitelných vodíků (o jeden) při provedení H/D výměny. Experimenty H/D výměny ukázaly, že oxidace parentní látky nezvýšila počet vyměnitelných vodíků ve struktuře a podporují možnost (vyloučily hydroxylovaný metabolit), že jde o S-oxidovaný metabolit. Znalost počtu vyměnitelných vodíků byla také využita při identifikaci metabolitů M2 (S-dioxid), M3 (karbamoyl glukuronid), M4 (N-glukuronid) a M5 (N-glukosid).

## 2.3. Sibutramin

V současné době je sibutramin hydrochlorid monohydrát schválen k léčbě obezity přibližně ve 40 zemích po celém světě. V listopadu 1997 byl sibutramin schválen americkým úřadem FDA (Food and Drug Administration) a poté byl v únoru 1998 uveden ve Spojených státech na trh. Sibutramin byl vyvinut a je v současné době prodáván na trh společností Knoll Pharmaceuticals, dceřinou společností Abbott Laboratories, pod obchodním názvem Meridia™ nebo Reductil™. V září 2005 bylo v České republice uvedeno na trh generické léčivo sibutraminu, obsahující sibutramin hydrochlorid monohydrát, pod obchodním názvem Lindaxa (Zentiva, a.s., Praha, Česká republika).

Díky ověřeným mechanismům účinku byl sibutramin původně vyvíjen jako potenciální antidepresivum. Klinická účinnost sibutraminu pro léčbu depresí ale nebyla buď nikdy zcela určena nebo klinické výstupy nebyly nikdy publikovány pravděpodobně kvůli špatným výsledkům. Během testování sibutraminu pro léčbu depresí byl zcela náhodně pozorován jeho účinek na snížení tělesné hmotnosti. Toto pozorování pravděpodobně vedlo ke změně směru vývoje sibutraminu a jeho konečné aplikaci pro léčbu obezity. Nyní je sibutramin zavedený a dobře ověřený lék pro léčbu obezity a jeho použití by mělo být uvažováno při léčbě pacientů, kteří potřebují farmakoterapii jako součást kombinovaného přístupu ke ztrátě hmotnosti.

V následujících částech této kapitoly jsou uvedeny základní farmakologické, farmakokinetické a klinické údaje sibutraminu.

### 2.3.1. Farmakologické vlastnosti

#### 2.3.1.1. Zpětné vychytávání monoaminů

*5-hydroxytryptamin (5-HT, serotonin)*

*In vitro* je sibutramin méně účinný inhibitor zpětného vychytávání [<sup>14</sup>C]5-HT v mozkové tkáni potkana ve srovnání s jeho sekundárním, M1 (desmethylsibutramin), a primárním, M2 (didesmethylsibutramin), aminovým metabolitem (tabulka 1, Luscombe *et al.* 1989). Vazba sibutraminu, M1 a M2 do místa zpětného vychytávání 5-HT byla

prokázána pomocí selektivního a vysoce afinitního inhibitoru zpětného vychytávání 5-HT, [<sup>3</sup>H]paroxetinu (Cheetham *et al.* 1993). Sibutramin a jeho dva metabolity inhibovaly vazbu [<sup>3</sup>H]paroxetinu a zpětné vychytávání [<sup>3</sup>H]5-HT v mozkové tkáni potkana. Inhibiční konstanty ( $K_i$ ) pro vazbu [<sup>3</sup>H]paroxetinu byly 2135, 19 a 18 nM pro sibutramin, M1 a M2. Inhibiční konstanty pro zpětné vychytávání [<sup>3</sup>H]5-HT byly 3132, 18 a 26 nM pro sibutramin, M1 a M2. Také byla prokázána vysoká korelace mezi inhibicí vazby paroxetinu a inhibicí zpětného vychytávání 5-HT. Schopnost inhibovat zpětné vychytávání [<sup>3</sup>H]5-HT krevními destičkami neléčených dobrovolníků byla stanovena u vzorků plasmy, odebrané dobrovolníkům po podání sibutraminu hydrochloridu (Luscombe *et al.* 1990). Inhibice zpětného vychytávání [<sup>3</sup>H]5-HT byla maximální 3 h po jednorázovém podání 12,5 mg sibutraminu hydrochloridu a poté klesala během 24 h k nízkým hodnotám. Počáteční nárůst inhibice, který se ustálil na přibližně konstantní hladině 20-30% (po 6 dnech) a 40% (po 3-5 dnech) byl pozorován po opakovaném podání 20 mg (1x denně, po 14 dnů) a 15 mg (2x denně, po 6 dnů) sibutraminu hydrochloridu.

*In vivo* jsou sibutramin a jeho dva metabolity, M1 a M2, stejně účinné inhibitory zpětného vychytávání 5-HT (tabulka 1, Luscombe *et al.* 1989). Mikrodializační studie *in vivo* ukázaly, že sibutramin v závislosti na podané dávce zvyšuje extracelulární koncentraci 5-HT v hypothalamu a striatum potkana a byly podány důkazy, že toto zvýšení je způsobeno inhibicí zpětného vychytávání 5-HT a nikoliv přímým uvolňováním 5-HT (Gundlah *et al.* 1997, Balcioğlu and Wurtman 2000). Vliv sibutraminu na místa zpětného vychytávání 5-HT, značené pomocí [<sup>3</sup>H]paroxetinu, byl studován v různých oblastech mozku potkana. Opakované podání sibutraminu hydrochloridu (9 mg/kg, p.o., trojnásobek ED<sub>50</sub> pro inhibici příjmu jídla po 2 h, 2x denně, po 4 dny; Cheetham *et al.* 2000 nebo 3 mg/kg, p.o., 1xdenně, po 14 dnů; Cheetham *et al.* 1993) nemělo žádný efekt na počet nebo afinitu míst zpětného vychytávání 5-HT ve všech studovaných oblastech mozku potkana.

#### *Noradrenalin (NA)*

*In vitro* vykazují sibutramin, metabolit M1 a M2 jistou selektivitu pro inhibici zpětného vychytávání NA oproti 5-HT (tabulka 1). Vazba sibutraminu, M1 a M2 do místa zpětného vychytávání NA byla prokázána pomocí radioligandu [<sup>3</sup>H]nisoxetinu, který se váže selektivně a s vysokou afinitou na transportní komplex NA (Cheetham *et al.* 1996). Metabolit M1 ( $K_i$ = 12 nM) a metabolit M2 ( $K_i$ = 14 nM) byly silnějšími

inhibitory vazby [<sup>3</sup>H]nisoxetinu v mozkové tkáni potkana než sibutramin ( $K_i=86$  nM). Metabolit M1 ( $K_i=2,7$  nM) a metabolit M2 ( $K_i=4,9$  nM) také silněji inhibovaly zpětné vychytávání [<sup>3</sup>H]NA v mozkové tkáni potkana než sibutramin ( $K_i=283$  nM). Plasma odebraná dobrovolníkům po podání sibutraminu inhibovala zpětné vychytávání [<sup>3</sup>H]NA do synaptosómů mozkové kůry potkana *in vitro*. Inhibice zpětného vychytávání [<sup>3</sup>H]NA byla maximální 6 h po jednorázovém podání 12,5 mg sibutraminu hydrochloridu a poté klesala během 24 h k nízkým hodnotám. Počáteční nárůst inhibice, který se ustálil na přibližně konstantní hladině 50% (po 3-6 dnu) a 60% (po 4-6 dnu), byl pozorován po opakovaném podání 20 mg (1x denně, po 14 dnů) a 15 mg (2x denně, po 6 dnů) sibutraminu hydrochloridu (Luscombe *et al.* 1990).

*In vivo*, v mozkové tkáni potkana, inhibovaly sibutramin, metabolit M1 a M2 zpětné vychytávání NA přibližně se stejnou účinností (tabulka 1).

#### *Dopamin (DA)*

*In vitro* je sibutramin v mozkové tkáni potkana méně účinný inhibitor zpětného vychytávání DA než metabolit M1 a M2. Všechny látky ale vykazují selektivitu pro inhibici zpětného vychytávání NA a DA oproti 5-HT. Naproti tomu v mozkové tkáni potkana, *in vivo*, byla jejich aktivita pro vychytávání DA nízká ve srovnání s NA a 5-HT (tabulka 1). Sibutramin ani metabolity M1 a M2 neovlivnily vytékání [<sup>3</sup>H]DA z připravených tkáňových řezů striata mozku potkana v koncentracích  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  mol/L. Podání sibutraminu (3 mg/kg, i.p., nebo 6 mg/kg, p.o.) neovlivnilo koncentraci 3-methoxytyraminu, metabolitu DA, v striatu potkana (Heal *et al.* 1992). Plasma odebraná dobrovolníkům po podání sibutraminu velmi slabě inhibovala zpětné vychytávání DA v porovnání s 5-HT a NA (Luscombe *et al.* 1990). Plasma odebraná 3 h po jednorázovém podání 50 mg sibutraminu hydrochloridu inhibovala zpětné vychytávání [<sup>14</sup>C]DA z 14% (do synaptosómů striata potkana), [<sup>3</sup>H]NA z 48% (do synaptosómů corticu potkana) a [<sup>3</sup>H]5-HT z 31% (do lidských krevních destiček). Opakované podání sibutraminu hydrochloridu (15 mg, 2x denně, po 6 dnů) způsobilo mírnou (< 20%) a statisticky nevýznamnou inhibici vychytávání [<sup>14</sup>C]DA. Z výsledků těchto studií se vytvářela představa, že sibutramin neovlivňuje dopaminergní systém. Balcioglu a Wurtman (2000) uvedli studii, ve které pomocí mikrodialýzy přímo měřili extracelulární hladinu DA a 5-HT v mozkové tkáni potkana. Ukázali, že sibutramin (5 mg/kg, 10 mg/kg, i.p.) významně zvýšil extracelulární hladinu DA v striatu a hypothalamu mozku potkana, a že rozsah zvýšení extracelulární hladiny DA byl přinejmenším stejný jako u 5-HT.

Zvýšení extracelulární hladiny DA a 5-HT v striatu mozku potkana po podání sibutraminu (5 mg/kg, p.o.) bylo potvrzeno v nedávné studii a bylo uvedeno, že zvýšení hladiny DA a 5-HT indukované sibutraminem se děje mechanismem exocytotického uvolnění závislým na potenciálu a nikoliv skrze uvolnění zprostředkované nosičem (Ukai *et al.* 2004).

**Tabulka 1.** *In vitro* a *in vivo* inhibice zpětného vychytávání monoaminů sibutraminem a jeho metabolity M1 a M2 v mozkové tkáni potkana (Luscombe *et al.* 1989).

(IC<sub>50</sub>)<sup>a</sup> hodnoty jsou vyjádřeny v μM (průměr ± standardní chyba průměru), n= 3-4

(ED<sub>50</sub>)<sup>b</sup> hodnoty jsou vyjádřeny v mg/kg (p.o.), n= 7-8 potkanů/experiment, I= inaktivní

sloučenina	in vitro inhibice zpětného vychytávání (IC <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>			in vivo inhibice zpětného vychytávání (ED <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>		
	NA	5-HT	DA	NA	5-HT	DA
sibutramin	2,17±0,38	477±111	10,8±4,2	15,4	13,3	43,8
M1	0,14±0,054	3,9±0,82	0,16±0,046	6,9	14,1	25,0
M2	0,066±0,012	5,1±1,6	0,31±0,036	8,0	10,9	I při 30

### 2.3.1.2. Inhibice monoaminoxidázy

*In vitro*, sibutramin (10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M) neinhiboval aktivitu monoaminoxidázy v jaterní a mozkové tkáni potkana. Aktivita monoaminoxidázy nebyla inhibována 3 h po podání sibutraminu (30 mg/kg, p.o.) v jaterní ani mozkové tkáni potkana *ex vivo*. Kombinované podání sibutraminu (30 mg/kg, i.p.) a L-tryptofanu nevyvolalo u potkanů serotoninový syndrom. Tyto výsledky ukazují, že u potkanů sibutramin neinhibuje aktivitu monoaminoxidázy (Buckett *et al.* 1988).

### 2.3.1.3. Účinek na receptory

U sibutraminu ani jeho metabolitů M1 a M2 nebyla prokázána významná přímá vazebná afinita k různým 5-HT receptorům, α- nebo β-adrenoreceptorům, dopaminovým D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> receptorům, muskarinovým, histaminovým nebo benzodiazepinovým receptorům (Stock 1997). Vazba metabolitu M2 na N-methyl-D-aspartátový (NMDA) receptor byla prokázána, ale pro ověření této receptorové aktivity jsou zapotřebí další experimenty (Luque and Rey 2002). Věří se, že skrze farmakologický mechanismus inhibice buněčného vychytávání neurotransmiterů NA a 5-HT a následného zvýšení jejich extracelulární synaptické koncentrace dochází

k aktivaci  $\alpha$ -adrenoreceptorů,  $\beta$ -adrenoreceptorů a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptorů. Studie na zvířatech ukázaly, že sibutramin způsobuje snížení genové exprese pre- a post-synaptických  $\alpha_2$ -adrenoreceptorů,  $\beta_1$ -adrenoreceptorů a 5-HT<sub>1</sub> receptorů. Toto snížení genové exprese posiluje teorii, že sibutramin vykonává jeho terapeutický efekt nepřímo, zvyšováním aktivity neurotransmiterů NA a 5-HT v místě jejich receptorů (Luque and Rey 2002).

#### 2.3.1.4. Vliv na příjem potravy

V závislosti na podané dávce (3 a 10 mg/kg, p.o.) sibutramin významně snížil příjem potravy u potkanů, který se projevil již během prvních 2 h po podání. Dávka sibutraminu 2,8 a 5,7 mg/kg p.o. způsobila 50% snížení příjmu potravy, v porovnání s kontrolní skupinou, ve 2 a 8 h po podání (Jackson *et al.* 1997a). Tato studie také ukázala, že zatímco podání samotného selektivního inhibitoru zpětného vychytávání 5-HT, fluoxetinu (30 mg/kg, p.o.), nebo selektivního inhibitoru zpětného vychytávání NA, nisoxetinu (30 mg/kg, p.o.), neovlivnilo příjem potravy, jejich kombinované podání (30 mg/kg, p.o., oba) u potkanů významně snížilo příjem potravy. Mechanismus hypofagického účinku sibutraminu u potkana byl studován pomocí současného podání sibutraminu a různých receptorových antagonistů (Jackson *et al.* 1997b). Podání prazosinu (antagonista  $\alpha_1$ -adrenoreceptoru) zcela inhibovalo hypofagickou odezvu na sibutramin a částečná inhibice byla pozorována po podání metoprololu (antagonista  $\beta_1$ -adrenoreceptoru), metergolinu (5-HT neselektivní), ritanserinu (5-HT<sub>2A/2C</sub>) a SB200646 (5-HT<sub>2B/2C</sub>). Podání antagonistů  $\alpha_2$ - nebo  $\beta_2$ -adrenoreceptorů neovlivnilo hypofagický účinek sibutraminu. Tato studie ukázala zapojení  $\alpha_1$ - a  $\beta_1$ -adrenoreceptorů a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptorů při regulaci příjmu potravy indukované sibutraminem. Z uvedených výsledků vyplývá, že je účinek sibutraminu na příjem potravy zprostředkován současným zvýšením noradrenergní a serotonergní funkce centrálního nervového systému (Stock 1997). Jak bylo uvedeno, sibutramin zvyšuje extracelulární koncentraci DA v mozkové tkáni potkana po podání dávek vyvolávajících hypofagický efekt. Toto ovlivnění dopaminergní funkce centrálního nervového systému by také mohlo být zodpovědné za hypofagický efekt sibutraminu (Balcioglu and Wurtman 2000).

Schopnost sibutraminu snižovat příjem potravy u živočichů vyplývá ze zvýšení pocitu nasycení. Když byl sibutramin podán potkanům, bylo pozorováno snížení množství času stráveného krměním a zároveň vzrostla doba odpočinku a doba, po



kteřou o sebe pečovali. To ukazuje, že sibutramin udržuje normální posloupnost pocitu nasycení a zvyšováním přirozeného fyziologického procesu sytosti snižuje příjem potravy (Stock 1997).

### 2.3.1.5. Termogeneze

Schopnost sibutraminu snižovat váhu u zvířat a lidí byla původně připisována jeho efektu na příjem potravy. Při chronickém podávání sibutraminu potkanům se ale ukázalo, že po počátečním snížení příjmu potravy nebyl průměrný příjem potravy významně snížen během 14-ti denního experimentu, ve srovnání s kontrolní skupinou. Přesto byl pozorován zřetelný a udržovaný účinek snížení tělesné hmotnosti, který naznačil, že sibutramin může ovlivňovat energetickou bilanci zvýšením metabolické rychlosti, tzn. má termogenní vlastnosti (Connoley *et al.* 1995). Termogenní účinek sibutraminu a jeho metabolitů byl studován u potkanů (Connoley *et al.* 1999). Sibutramin způsobil vzrůst spotřeby O<sub>2</sub>, který byl závislý na dávce. Podání sibutraminu nebo jeho metabolitů M1 a M2 (10 mg/kg, p.o. nebo i.p.) významně zvýšilo spotřebu O<sub>2</sub> o 20-30%, které přetrvávalo přibližně po dobu 6 h, a bylo doprovázeno významným zvýšením tělesné teploty o 0,5-1,0 °C. Na základě zužitkování glukózy, které bylo měřeno stanovením akumulace radioaktivně značeného 2-deoxyglukózafosfátu *in vivo*, byla stanovena metabolická aktivita v různých tkáních. Sibutramin (10 mg/kg, i.p.) měl ve většině tkání malý nebo žádný účinek na zužitkování glukózy, ale způsobil 18-ti násobný vzrůst v šedé tukové tkáni. Termogenní aktivita sibutraminu (nebo metabolitů M1 a M2) byla zcela inhibována vysokými neselektivními dávkami antagonistů  $\beta$ -adrenoreceptorů (nebo zablokováním ganglií), ale nebyla ovlivněna nízkými selektivními dávkami antagonistů  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -adrenoreceptorů. Kombinované podání selektivního inhibitoru zpětného vychytávání NA (nisoxetinu) a selektivního inhibitoru zpětného vychytávání 5-HT (fluoxetinu) vyvolalo stejný efekt na termogenezi, jaký byl pozorován u vlivu na příjem potravy. Termogenní odezva na kombinované podání byla výsledkem vzájemné interakce a nikoliv aditivního působení obou sloučenin, poněvadž samotné podání fluoxetinu nebo nisoxeinu nevyvolalo termogenezi. Z uvedených experimentů vyplývá, že sibutramin skřze inhibici zpětného vychytávání 5-HT a NA v centrálním nervovém systému stimuluje eferentní sympatické nervy, které prostřednictvím  $\beta_3$ -adrenoreceptorů aktivují termogenezi v šedé tukové tkáni. Spolu se snížením příjmu potravy může termogenní efekt sibutraminu přispívat nebo je dokonce

sám o sobě zodpovědný za snížení hmotnosti při dlouhodobém podávání sibutraminu potkanům nebo myším. Výsledky studií na zvířecích modelech mnohem více podporují možný termogenní účinek sibutraminu než studie, které byly provedeny u lidí.

Klinické studie u lidí, které stanovovaly klidovou metabolickou rychlost nebo energetický výdej, poskytly smíšené výsledky. Výsledky některých studií ukázaly, že sibutramin omezil pokles klidového výdeje energie a klidové metabolické rychlosti, které jsou spojeny se ztrátou hmotnosti. V jiných studiích toto nebylo prokázáno nebo tyto efekty nenabývaly statistické významnosti (Luque and Rey 2002).

#### 2.3.1.6. Enantioselektivní účinek metabolitů sibutraminu

Farmakologický účinek *rac*-sibutraminu a obou enantiomerů M1 a M2 byl studován u potkanů (Glick *et al.* 2000). Schopnost studovaných látek inhibovat *in vitro* zpětné vychytávání [ $H^3$ ]monoaminů do synaptosómů mozku potkana je uvedena v tabulce 2. Všechny sloučeniny byly účinnějšími inhibitory zpětného vychytávání NA a DA než 5-HT. R-enantiomery metabolitů M1 a M2 byly účinnějšími inhibitory vychytávání monoaminů než jejich S-enantiomery i než sibutramin. Oba R-enantiomery měly významně větší anorektické účinky než odpovídající S-enantiomery i než sibutramin. Kvůli možnému účinku sibutraminu a jeho metabolitů na dopaminergní systém byla u potkanů sledována stimulace pohybové aktivity. Ačkoliv všechny sloučeniny způsobily významné časově závislé zvýšení pohybové aktivity, účinek R-enantiomerů byl významně vyšší v porovnání s danými S-enantiomery a sibutraminem. Porovnání anorektického účinku s účinkem na stimulaci pohybové aktivity ukázalo, že příjem potravy může být ovlivněn v nepřítomnosti stimulace pohybové aktivity a bylo navrženo, že dopaminergní účinek sibutraminu není nezbytný pro jeho anorektický efekt. Výsledky ukázaly, že R-enantiomery snižují příjem potravy a tělesnou hmotnost účinněji než sibutramin a bylo navrženo, že tyto enantioselektivní metabolity by mohly být bezpečnější a účinnější pro léčbu obezity než sibutramin.

**Tabulka 2.** Účinek *rac*-sibutraminu, *R*-M1, *S*-M1, *R*-M2 a *S*-M2 na zpětné vychytávání monoaminů v mozkové tkáni potkana (Glick *et al.* 2000).

sloučenina	hodnoty IC <sub>50</sub> zpětného vychytávání (nM)		
	NA	5-HT	DA
<i>rac</i> -sibutramin	350	2800	1200
<i>R</i> -M1	4	44	12
<i>S</i> -M1	870	9200	180
<i>R</i> -M2	13	140	8,9
<i>S</i> -M2	62	4300	12

### 2.3.2. Klinické studie

Výsledky krátkodobých a dlouhodobých klinických studií byly podrobně popsány v souhrnném článku autorů Van Gaal *se sp.* (1998) a Luque a Rey (1999, 2002). Níže jsou popsány výsledky dvou vybraných klinických studií.

Účinek sibutraminu byl studován u 485 obézních pacientů, kterým byl po dobu 12-ti měsíců podáván sibutramin (10 nebo 15 mg/den) nebo placebo (Jones *et al.* 1995). Všichni pacienti také obdrželi individuální plán zdravé výživy, který byl každý měsíc upravován. U pacientů léčených sibutraminem byla pozorována významně větší ztráta hmotnosti než u pacientů léčených placebem. Statisticky významný počet pacientů (ve srovnání s placebem) dosáhl 5%-ní ztráty původní tělesné hmotnosti. Ve skupině léčené 10 nebo 15 mg sibutraminu/den dosáhlo 39 nebo 56% pacientů 5%-ní ztráty původní tělesné hmotnosti ve srovnání s 20% ve skupině placeba. Ztráty 10% původní tělesné hmotnosti bylo dosaženo u 20 nebo 34% pacientů léčených 10 nebo 15 mg sibutraminu/den a u 7% pacientů léčených placebem. Pro obě skupiny léčené sibutraminem bylo zároveň pozorováno, že aktivní ztráta hmotnosti se děje do šestého měsíce léčby a že tato ztráta byla udržena do jednoho roku při pokračování léčby.

Schopnost sibutraminu navodit a udržet ztrátu hmotnosti po dobu dvou let byla studována u pacientů s BMI (body mass index) mezi 30 a 45 kg/m<sup>2</sup> (James *et al.* 2000). Tato studie se skládala ze dvou fází. V první fázi (otevřená) byla pacientům po dobu 6-ti měsíců předepsána nízkokalorická dieta, fyzická aktivita a sibutramin (10 mg/den). V druhé fázi (randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná) byl pacientům, kteří dosáhli nejméně 5%-ní ztráty své původní hmotnosti (467 [94%] pacientů, kteří ukončili první fázi), podáván nadále buď sibutramin (10 mg/den, 352 pacientů) nebo placebo (115 pacientů) po dobu dalších 18-ti měsíců. Z 204 pacientů, kteří dokončili

studii ve skupině léčené sibutraminem, si 89 (43%) pacientů udrželo 80% nebo více jejich původního úbytku váhy, dosažené v šestém měsíci první fáze. Z 57 pacientů, kteří dokončili studii ve skupině léčené placebem, bylo tohoto udržení váhy dosaženo u devíti (16%) pacientů. Ve skupině léčené sibutraminem si 142 (69%) pacientů udrželo 5%-cent počáteční ztráty hmotnosti, 94 (46%) pacientů si udrželo 10%-cent počáteční ztráty hmotnosti a 55 (27%) pacientů si udrželo 100% jejich počáteční ztráty hmotnosti. Po 24 měsících léčby byla průměrná ztráta hmotnosti (ve srovnání od hmotnosti před zahájením léčby) 10,2 kg pro skupinu léčenou sibutraminem a 4,7 kg pro skupinu léčenou placebem. V pozdní fázi léčby nastával malý vzrůst hmotnosti i přesto, že dávka sibutraminu byla, průměrně okolo 18 týdne léčby, navýšena na 15 mg/den u 266 (76%) z 352 pacientů. Další navýšení dávky na 20 mg/den bylo potřeba u 183 (52%) pacientů. Toto navyšování dávek sibutraminu v průběhu druhé fáze bylo řízeno protokolem: při zvýšení hmotnosti dosažené v šestém měsíci o 1 kg, byla navýšena dávka sibutraminu na 15 mg a při dalším zvýšení hmotnosti o 1 kg byla dávka upravena na 20 mg. Průměrná užívaná denní dávka sibutraminu během fáze udržování nižší váhy byla 13,5 mg. Ve skupině léčené sibutraminem byl pozorován podstatný pokles koncentrací sérových triacylglycerolů, VLDL cholesterolu, insulin C-peptidu a kyseliny močové. Koncentrace LDL cholesterolu nebyla ovlivněna. Tyto změny byly udrženy až po 2 roky a byly úměrné ztrátě hmotnosti. V pozdější fázi studie byl také pozorován podstatný vzrůst koncentrace HDL cholesterolu, který nebyl úměrný ztrátě hmotnosti. Po ukončení studie byl ve skupině sibutraminu zaznamenán průměrný vzrůst systolického krevního tlaku o 0,1 mm Hg (SD 12,9), diastolického krevního tlaku o 2,3 mm Hg (SD 9,4) a tepové frekvence o 4,1 úderů/min (SD 11,9) ve srovnání s hodnotami před zahájením studie. Ve skupině placebo se průměrné hodnoty systolického krevního tlaku změnilo o -4,7 mm Hg (SD 12,6), diastolického krevního tlaku o -1,6 mm Hg (SD 8,4) a tepové frekvence o -1,9 úderů/min (SD 9,1). Nejběžněji pozorované vedlejší účinky u pacientů léčených sibutraminem (léčených placebem) během druhé fáze studie byly nespavost 8% (3%), nevolnost 7% (1%), zvýšený krevní tlak 8% (3%), sucho v ústech 9% (3%) a zácpa 9% (4%). Vedlejší účinky zapříčinily odchod 48 (14%) pacientů ze skupiny léčené sibutraminem a 6 (5%) pacientů ze skupiny léčené placebem.

### 2.3.3. Farmakokinetika

Výsledky studií, které se zabývaly stanovením farmakokinetických parametrů sibutraminu a jeho metabolitů M1 a M2 v plasmě lidí, jsou uvedeny v tabulce 3. Z uvedených parametrů  $t_{\max}$  a  $c_{\max}$  metabolitů M1 a M2 je vidět, že sibutramin je u člověka velmi rychle metabolizován a hlavním metabolitem v lidské plasmě je metabolit M2. Studie porovávající farmakokinetiku sibutraminu u dvou, věkově rozdílných skupin dobrovolníků ukázala, že bio-dostupnost farmakologicky aktivních metabolitů M1 a M2 byla u obou skupin stejná, bez žádných statisticky nebo klinicky významných rozdílů (Hind *et al.* 1999). Největší rozdíl průměrných hodnot mezi oběma skupinami byl 17,9%-ní nárůst pro  $t_{1/2}$  metabolitu M2 u skupiny starších pacientů. Výsledky studie zabývající se vlivem příjmu potravy na farmakokinetické parametry sibutraminu a metabolitů M1 a M2 ukázaly, že bio-dostupnost sibutraminu a metabolitu M1 byla zvýšena při podání sibutraminu se standardní snídaní (Abolfathi *et al.* 2004). Příjem potravy významně zvýšil hodnoty AUC a  $c_{\max}$  sibutraminu a metabolitu M1. Tyto hodnoty se významně nelišily mezi oběma studijními periodami u metabolitu M2 (tabulka 3). Příjem potravy prodloužil dobu potřebnou k dosažení maximální plasmatické koncentrace sibutraminu a obou metabolitů přibližně o 2-4 h a významně zvýšil poločas eliminace sibutraminu. Výsledky této studie jsou částečně v rozporu s údaji uvedenými v příbalovém letáku produktu (Package Insert). Zde je uvedeno, že podání 20 mg sibutraminu se standardní snídaní mělo za následek snížení  $c_{\max}$  metabolitu M1 (o 27%) a metabolitu M2 (o 32%) a prodloužení  $t_{\max}$  přibližně o 3 h, ale hodnoty AUC metabolitu M1 a M2 nebyly současným příjmem potravy významně ovlivněny.

Studie s radioaktivně značeným sibutraminem ukázaly rychlou a rozsáhlou distribuci radioaktivního materiálu do tkání zvířat. Nejvyšší koncentrace radioaktivně značeného materiálu byla nalezena v játrech a ledvinách. *In vitro* jsou sibutramin (97%), metabolit M1 (94%) a M2 (94%) vázány ve vysoké míře na lidské plasmatické proteiny (Package Insert).

Dostupné informace o metabolismu a eliminaci sibutraminu jsou téměř výhradně omezeny na informace obsažené v příbalovém letáku produktu (Package Insert). Sibutramin je metabolizován v játrech enzymem CYP3A4 za vzniku farmakologicky aktivních metabolitů M1 a M2. Tyto metabolity jsou dále hydroxylovány a konjugovány za vzniku farmakologicky neaktivních metabolitů M5 a M6. Z veškerého

množství radioaktivně značeného materiálu nalezeného v plasmě po orálním podání radioaktivně značeného sibutraminu připadly 3% na nezměněný sibutramin, 6% na M1, 12% na M2, 52% na M5 a 27% na M6. V průběhu 15-ti denního shromažďování bylo vyloučeno močí a trusem přibližně 85% (rozsah 68-95%) orálně podané dávky radioaktivně značeného sibutraminu. Většina podané dávky (77%) byla vyloučena močí. Hlavními metabolity v moči byly M5 a M6, nepozměněný sibutramin ani metabolity M1 a M2 nalezeny nebyly. Jaterní metabolismus je základní vylučovací cestou metabolitu M1 a M2. Ledvinná exkrece je základní vylučovací cestou metabolitu M5 a M6.

Struktura dvou hydroxylovaných metabolitů, vznikajících následnou oxidativní biotransformací metabolitu M2, byla uvedena v práci zabývající se syntézou sibutraminu, M1, M2 a těchto dvou hydroxylovaných metabolitů (Jeffery *et al.* 1996). Dále je uvedeno, že jsou tyto dva hydroxylované aminy, 4-amino-4-[1-(4-chlorfenyl)cyklobutyl]-2-methylbutan-1-ol a *cis*-3-(1-amino-3-methylbutyl)-3-(4-chlorfenyl)cyklobutan-*r*-1-ol, vylučovány jako konjugáty s kyselinou glukuronovou. Původní zdroj informací týkající se detekce a identifikace těchto metabolitů ale není uveden.

**Tabulka 3.** Farmakokinetické parametry sibutraminu a metabolitů M1 a M2. Pokud není uvedeno jinak, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka). Použité zkratky:  $c_{\max}$  - maximální plasmatická koncentrace;  $t_{\max}$  - čas potřebný k dosažení maximální plasmatické koncentrace;  $t_{1/2\text{ el}}$  - poločas eliminace (vypočten jako  $t_{1/2\text{ el}} = \ln 2/k_{\text{el}}$ );  $k_{\text{el}}$  - rychlostní konstanta eliminace;  $\text{AUC}_{0-t}$  - plocha pod křivkou závislosti plasmatické koncentrace na čase začínající v  $t=0$  a končící v  $t=t$  poslední stanovené hodnoty;  $\text{AUC}_{0-\infty}$  - plocha pod křivkou závislosti plasmatické koncentrace na čase začínající v  $t=0$  a končící v  $t=\infty$ .

Studie A (Hind *et al.* 1999): 12 mladých (6 mužů, 6 žen, průměrný věk  $24,0 \pm 3,6$  roků) a 12 starších (6 mužů, 6 žen, průměrný věk  $70,3 \pm 4,6$  roků) zdravých dobrovolníků, po celovečerním půstu bylo jednorázově podáno 15 mg sibutraminu, standardní strava byla poskytnuta 2, 5 a 8 h po podání dávky, plasma byla odebírána do 48 h po podání dávky

Studie B (Chen *et al.* 2003): 20 zdravých dobrovolníků, jednorázově podáno 20 mg sibutraminu, plasma byla odebírána do 72 h po podání dávky

Studie C (Ding *et al.* 2003): 18 mladých a zdravých dobrovolníků (muži, čínské národnosti), po celovečerním půstu bylo jednorázově podáno 20 mg sibutraminu, standardní strava byla poskytnuta 3 a 9 h po podání dávky, plasma byla odebírána do 72 h po podání dávky

Studie D (Park *et al.* 2004): 16 zdravých dobrovolníků (muži, průměrný věk  $24,3 \pm 2,3$  roků, rozmezí 20-25 roků, průměrná hmotnost  $66,1 \pm 5,1$  kg, rozmezí 57-77 kg), jednorázově podáno 15 mg sibutraminu, plasma byla odebírána do 72 h po podání dávky

Studie E (Abolfathi *et al.* 2004): 6 zdravých dobrovolníků (muži, věk 24-59 roků). Perioda 1: po celovečerním půstu bylo jednorázově podáno 15 mg sibutraminu. Perioda 2: po celovečerním půstu byla podána standardní vysoce kalorická snídaně, následoval 30 min půst a po něm podání 15 mg sibutraminu. Perioda 1 a 2 byly od sebe odděleny 14 denní čistící periodou. Plasma byla odebírána do 72 h po podání dávky.

Všechny dávky sibutraminu byly podávány orálně. Sibutramin = sibutramin hydrochlorid monohydrát.

Označení studie Specifika	Látka	$C_{max}$ [ng/mL]	$t_{max}$ [h]	$t_{1/2\text{el}}$ [h]	$k_{el}$ [h <sup>-1</sup> ]	AUC <sub>0-t</sub> [ng×h/mL]	AUC <sub>0-∞</sub> [ng×h/mL]
A mladí  staří	M1	3,2 (1,3)	2,5 (0,9)	nestanoveno	nestanoveno	22,6 (14,6)	nestanoveno
	M2	7,8 (1,8)	3,2 (1,4)	19,0 (5,4)	0,040 (0,014)	114,5 (24,3)	135,3 (25,1)
	M1	3,2 (1,3)	2,8 (1,8)	nestanoveno	nestanoveno	22,5 (16,4)	nestanoveno
	M2	8,1 (2,7)	3,0 (1,3)	22,4 (6,2)	0,033 (0,009)	114,6 (25,8)	148,1 (33,9)
B	M2	10,51	2,90	23,18	neuvedeno	188,07	211,22
C	Sibutramin	7,9 (2,0)	0,8 (0,3)	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno
	M1	9,9 (3,1)	3,3 (0,9)	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno
	M2	17,7 (5,2)	4,8 (2,3)	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno
D	M1	7,12 (3,18)	3,38 (1,36) Rozmezí 2,00-6,00	22,31 (5,82)	0,033 (0,01)	118,07 (58,18)	133,03 (64,28)
	M2	8,09 (1,09)	4,25 (1,13) Rozmezí 2,00-6,00	23,07 (4,61)	0,031 (0,01)	179,51 (41,16)	205,86 (55,00)
E Perioda 1  Perioda 2	Sibutramin	2,98 (1,63)	1,14 (0,29)	8,38 (4,52)	0,1084 (0,0628)	8,71 (4,38)	9,51 (4,78)
	M1	2,14 (0,89)	4,19 (2,44)	14,31 (5,33)	0,0534 (0,0169)	29,13 (13,96)	32,24 (14,92)
	M2	7,65 (1,22)	3,75 (1,78)	18,25 (2,96)	0,0389 (0,0065)	141,91 (17,12)	151,65 (19,16)
	Sibutramin	7,63 (3,71)	4,08 (1,63)	19,27 (5,57)	0,0384 (0,0104)	44,31 (21,57)	47,08 (23,54)
	M1	3,45 (1,04)	5,58 (1,63)	19,72 (2,92)	0,0359 (0,0061)	58,95 (21,65)	64,59 (24,31)
	M2	6,41 (1,13)	8,33 (2,94)	22,37 (4,27)	0,0320 (0,0062)	153,03 (24,85)	172,51 (32,68)



### **3. CÍL PRÁCE**

- Vyvinout analytické postupy a metody pro jednotlivé cíle biotransformační studie sibutraminu.
- Porovnat biotransformaci *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu *in vitro* v jaterních mikrosomech potkana a v primární kultuře hepatocytů potkana – kvalitativní a kvantitativní porovnání biotransformace.
- Porovnat biotransformaci *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu *in vitro* v jaterních mikrosomech člověka – kvalitativní a kvantitativní porovnání biotransformace.
- Stanovit metabolický profil sibutraminu v lidské moči.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY, DISKUSE**

## Chemikálie

Sibutramin (N-{1-[1-(4-chlorfenyl)cyklobutyl]-3-methylbutyl}-N,N-dimethylamin), monodemethylsibutramin (N-{1-[1-(4-chlorfenyl)cyklobutyl]-3-methylbutyl}-N-methylamin, metabolit M1), didemethylsibutramin (1-[1-(4-chlorfenyl)cyklobutyl]-3-methylbutyl-amin, metabolit M2) a hydroxydidemethylsibutramin (4-amino-4-[1-(4-chlorfenyl)cyklobutyl]-2-methylbutan-1-ol, metabolit M2-OH) byly připraveny jako hydrochloridy na katedře Organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové podle postupu popsaného v práci autorů Jeffery se sp. (1996). Postup syntézy metabolitu M2-OH byl částečně modifikován.

Čisté enantiomery sibutraminu, *R*-sibutramin hydrochlorid a *S*-sibutramin hydrochlorid (čistota enantiomerů  $\geq 99\%$ ) byly získány z Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii (Zentiva, a.s. Praha).

NADPH ( $\beta$ -nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukovaná forma, tetrasodná sůl) a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).

Ethylacetát (99,8%, HPLC čistoty), acetonitril (Chromasolv, pro gradientovou eluci) a methanol (Chromasolv, pro gradientovou eluci) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Octan amonný (p.a.), kyselina octová (100%, p.a.), ethanol (99,9%, HPLC čistoty) a toluen (LichrosolvR, pro chromatografii) byly zakoupeny od Merck (Darmstadt, Německo).

Ultračistá voda byla připravena zařízením pro výrobu ultračisté vody Milli-Q RG (Millipore, Molsheim, Francie).

## 4.1. Metabolismus sibutraminu v jaterních mikrosomech potkana a v primární kultuře hepatocytů potkana

### 4.1.1. Experimentální část

#### Zvířata

Potkani kmene Wistar (samci, stáří 10-12 týdnů) byli zakoupeni od firmy BioTest (Konárovice, Česká republika). Zvířata byla chována v klecích pro zvířata, měla 12-ti hodinový denní a noční cyklus a byl jim poskytnut volný přístup k potravě a vodě. Všechny výkony na zvířatech byly v souladu s „Guide for the care and use of laboratory animals“ (Protection of animals from cruelty act, no. 246/92, Česká republika).

#### Izolace mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce byla připravena z jater 6 potkanů podle částečně modifikovaného postupu popsaného v práci autorů Gillette (1971). Z každého vzorku jater bylo odebráno 2x 5g tkáně, která byla rozdělena do kádinek. Jednotlivé dávky z kádinek byly zhomogenizovány v prostředí Na-fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4) za použití skleněného homogenizátoru s rotujícím teflonovým pístem. Následně byla směs přelita do centrifugačních kyvet a tyto kyvety byly vyváženy Na-fosfátovým pufrem. První centrifugace probíhala 20 min na centrifuze Heraeus při 5000 g a při 4°C. Supernatant byl dále centrifugován 60 minut při 20 000 g a 4°C. Vzniklý supernatant byl přemístěn do ultracentrifugačních kyvet a doplněn Na-fosfátovým pufrem. Ultracentrifugace probíhala 60 minut na vysokorychlostní centrifuze Beckman při 100 000 g a 4°C. Po hodině byly kyvety vyndány, supernatant (cytosol) slit a sediment mikrosomů byl resuspendován v Na-fosfátovém pufru pomocí homogenizačního pístu. Ultracentrifugace pak byla opakována za stejných podmínek. Sedimentovaná mikrosomální frakce byla nakonec zhomogenizována ve stejném objemu Na-fosfátového pufru s 20% (v/v) glycerolu, jako činila navážka tkáně na zkumavku. Směs byla slita do kádinky a na několik vteřin ponořena do ultrazvukové lázně. Za stálého míchání pak byly mikrosomy rozpipetovány do mikrozkuvek.

Všechny úkony s biologickým materiálem byly prováděny v chladícím boxu nebo v nádobách chlazených ledem. Mikrozkuřavky s mikrosomy byly uchovány v hluboko mrazícím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA (Smith *et al.* 1985).

### Izolace hepatocytů

Hepatocyty byly připraveny z jater 6 potkanů dvoustupňovou kolagenásovou metodou popsanou v práci autorů Berry *se sp.* (1991). Jaterní lalok byl nejdříve promýván puřrem (pH 7,4) obsahujícím 0,4 mM EGTA (vyvázání  $\text{Ca}^{2+}$ ). Pak byla játra po dobu 5-7 min promývána puřrem obsahujícím kolagenásu 50 mg/100 mL a 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Celý proces promývání probíhal při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z natrávené jaterní tkáňe byly hepatocyty uvolněny do vychlazeného puřru obsahujícího albumin 1 g/100 mL a 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , přefiltrovány přes gázu a nylonové sítko a centrifugovány (40 g, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Následně byly hepatocyty dvakrát centrifugovány (40 g, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) s vychlazeným 2 mM  $\text{CaCl}_2$  puřrem a nakonec s živným médiem ISOM obsahujícím antibiotika (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  penicilin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin). Hepatocyty byly resuspendovány ve vychlazeném živném médiu ISOM obsahujícím fetální hovězí sérum (5%, v/v) a antibiotika, nanesený (3 mL suspenze/misku,  $10^6$  živých hepatocytů/mL suspenze) na 60-mm tkáňové kultivační misky potažené kolagen a ponechány k adhezi. Po 3-4 hodinách, po přichycení hepatocytů na dno misky, bylo médium nahrazeno čerstvým médiem bez séra obsahujícím 5  $\mu\text{M}$  inzulin a antibiotika. Kultura hepatocytů byla udržována při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v atmosféře vlhkého vzduchu s 5%  $\text{CO}_2$ .

### Inkubace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu s mikrosomální frakcí

Zásobní roztoky (3 mM) jednotlivých substrátů a NADPH byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství pevné látky ve vodě. Pracovní roztoky substrátů byly připraveny naředěním zásobního roztoku vodou. Inkubační směs o celkovém objemu 300  $\mu\text{L}$  obsahovala: 100  $\mu\text{L}$  roztoku substrátu, 100  $\mu\text{L}$  roztoku NADPH, 50  $\mu\text{L}$  mikrosomální frakce (0,1 mg proteinů/mL) a 50  $\mu\text{L}$  Na-fosfátovém puřru (0,1 M, pH 7,4). Inkubace byly provedeny pro devět koncentrací substrátu (10-25-50-75-100-150-200-500-1000  $\mu\text{M}$ ) ve třech paralelních vzorcích. Směs substrátu, NADPH a puřru byla preinkubována 5 min při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vlastní inkubace byla zahájena přidáním 50  $\mu\text{L}$

mikrosomální frakce. Inkubace probíhala při 37 °C a po 20 min byla zastavena zalkalizováním roztokem hydroxidu sodného a zchlazením v ledové lázni.

### Inkubace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu s primární kulturou hepatocytů

Zásobní roztoky substrátů (3 mM) byly připraveny ve vodě a přidány do čerstvého kultivačního média ISOM obsahujícím 5 μM inzulin a antibiotika (bez séra). Objem roztoku substrátu přidaného do média nepřesahoval 3% objemu média. Primární kultura hepatocytů (18-24 h po izolaci) byla inkubována se substráty při 37 °C v atmosféře vlhkého vzduchu s 5% CO<sub>2</sub>. Kinetická studie byla provedena pro čtyři koncentrace substrátu (10-20-35-50 μM) a doba inkubace byla 4 h. Časově závislá kinetická studie byla provedena pro jednu koncentraci (35 μM) substrátu a vzorky média (0,5 mL) byly odebrány v 1, 2, 4 a 8 h od zahájení inkubace. Vzorky byly zamrazeny a uchovány v mrazícím boxu při -80 °C před jejich dalším zpracováním.

### Test cytotoxicity

Cytotoxicita používaných substrátů byla stanovena podle postupu popsaného v práci autorů Denizat a Lang (1986). Tento postup využívá schopnosti mitochondriálních dehydrogenas živých buněk přeměňovat žlutý, ve vodě rozpustný substrát 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) na fialový, ve vodě nerozpustný produkt formazan, který je po rozpuštění stanoven spektrofotometricky.

Suspenze izolovaných hepatocytů byla nanesena na mikrotitrační destičku (50 μL suspenze/jamku, 10<sup>6</sup> živých hepatocytů/mL suspenze). Po 3-4 hodinách v inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), po přichycení hepatocytů na dno jamky, bylo médium nahrazeno čerstvým médiem (100 μL/jamku) bez séra obsahujícím 5 μM inzulin a antibiotika. Po 18-24 h v inkubátoru bylo médium vyměněno za médium (inzulin, antibiotika) obsahující testované látky v různých koncentracích (5-70 μM). Jako kontrola bylo použito médium s přídatkem 3% (v/v) vody. Po 8 h inkubaci bylo přidáno 30 μL/jamku předeřátého roztoku MTT (37 °C, 2,5 mg MTT/1 mL 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4) a směs byla inkubována po dobu 1 h. Poté bylo médium slito, přidán roztok HCl-isopropanol (50 μL/jamku) a rozpuštěný fialový formazan byl změřen při 595 nm. Životnost hepatocytů inkubovaných s testovanými látkami byla vyjádřena jako 100×absorbance vzorků / absorbance kontroly.

## HPLC

Chromatografická separace a kvantitativní stanovení metabolitu M1 a M2 ve vzorcích po inkubaci sibutraminu s mikrosomální frakcí byla provedena na systému složeném z pumpy ESA Model 582 (ESA Inc., Chelmsford, MA), autosampleru a termostatu HP 1100 série (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a UV-VIS detektoru SPD-10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Kapalinový chromatograf Agilent 1100 série (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) byl použit pro separaci a kvantitativní stanovení metabolitu M1 a M2 ve vzorcích po inkubaci sibutraminu s primární kulturou hepatocytů. Použité chromatografické podmínky byly u obou systémů stejné a jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4.** Chromatografické podmínky.

kolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> 150x4,6 mm, 5 μm
předkolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> 12,5x4,6 mm, 5 μm
výrobce	Agilent Technologies
mobilní fáze	20 mM fosforečnan amonný pH 6,0/acetonitril/methanol, 42/22/36, v/v/v
průtok a teplota	1,5 mL/min, 25 °C
detektor	UV 223 nm

## Identifikace metabolitů

Frakce metabolitů M1, M2, M3 a M4 byly odděleně jímány do skleněných zkumavek během chromatografické separace. Najímané frakce byly zalkalizovány roztokem hydroxidu sodného na pH 9,5-10,5 a extrahovány do toluenu (M1 a M2) nebo chloroformu (M3 a M4). Organické extrakty byly odpařeny do sucha v rotačním vakuovém koncentrátoru při 30 °C. Odparky byly rozpuštěny ve směsi voda/methanol – 2/3 (v/v) a analyzovány pomocí LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San Jose, CA) hmotnostního spektrometru. Vzorky byly zavedeny do iontového zdroje přímou infúzí, ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu a byla zaznamenána hmotnostní spektra.



## Kvantitativní stanovení M1 a M2 po inkubaci sibutraminu s mikrosomální frakcí

### *Úprava vzorků*

Vzorky z inkubace s mikrosomy byly extrahovány z alkalického prostředí (pH 9,6) do ethylacetátu (2x 800 µL). Extrakce byla provedena na třepačce po dobu 7 min a pro oddělení vodné a organické fáze byla použita centrifugace (1800 g, 8 min). Spojené extrakty byly odpařeny do sucha v rotačním vakuovém koncentrátoru při 35 °C, rozpuštěny ve směsi 20 mM fosforečnan amonný pH 6,0/voda/methanol – 2/1/2 (v/v/v) a analyzovány.

### *Kalibrace*

Množství metabolitu M1 a M2 v neznámých vzorcích bylo stanoveno na základě kalibrační křivky, která byla sestrojena jako závislost plochy píku metabolitu M1 nebo metabolitu M2 na látkovém množství nastříknutém na kolonu. Kalibrační roztok obsahující metabolit M1 a M2 byl připraven naředěním zásobních roztoků standardů. Linearita kalibrační přímky byla ověřena proložení experimentálních bodů rovnicí přímky. Lineární regresí byla získána směrnice, úsek a koeficient regrese.

### *Výtěžek extrakce*

Výtěžek extrakce (VE) metabolitů M1 a M2 z biologického materiálu byl stanoven pro koncentraci analytů 300 µM ve třech paralelních vzorcích a byl vypočten jako:

$$VE = 100 \times \frac{\text{průměrná plocha píku M1 (M2) po extrakci}}{\text{plocha píku M1 (M2) čistého standardu}}$$

### *Interference endogenních sloučenin*

Slepé vzorky obsahující 100 µL vody, 100 µL roztoku NADPH, 50 µL mikrosomální frakce a 50 µL Na–fosfátovém pufru (0,1 M, pH 7,4) byly analyzovány pro odhalení případných endogenních sloučenin, které by mohly interferovat se stanovením metabolitu M1 a M2.

## Kvantitativní stanovení M1 a M2 po inkubaci sibutraminu s primární kulturou hepatocytů

### *Úprava vzorků*

Vzorky média byly rozmrazeny a centrifugovány při 3500 g po dobu 7 min. Supernatant (1,1 mL) byl odebrán, zalkalizován roztokem hydroxidu sodného na pH 9,7 a extrahován dvojnásobným objem ethylacetátu. Po separaci fází byla organická fáze odpařena do sucha v rotačním vakuovém koncentrátoru při 35 °C, odparek rozpuštěn ve směsi 20 mM fosforečnan amonný pH 6,0/voda/methanol – 2/1/2 (v/v/v) a analyzován.

### *Kalibrace*

Množství metabolitu M1 a M2 v neznámých vzorcích bylo stanoveno na základě kalibrační křivky, která byla sestrojena jako závislost plochy píku metabolitu M1 nebo M2 na jeho koncentraci. Byla připravena řada kalibračních roztoků obsahujících metabolit M1 o koncentraci 0,35 - 0,54 - 2,36 a 7,91  $\mu\text{M}$  a metabolit M2 o koncentraci 0,36 - 0,56 - 2,45 a 8,09  $\mu\text{M}$ . Kalibrační roztoky obsahovaly 100  $\mu\text{L}$  příslušného zásobního vodného roztoku standardu a 1000  $\mu\text{L}$  média (medium bez substrátu inkubované s primární kulturou hepatocytů) a byly upraveny stejným způsobem jako vzorky. Od každé koncentrace byly připraveny tři paralelky.

### *Linearita kalibrační přímky, přesnost a správnost stanovení metabolitu M1 a M2, výtěžek extrakce*

Linearita kalibrační přímky byla ověřena proložení experimentálních bodů rovnicí přímky. Lineární regresi byla získána směrnice, úsek a koeficient regrese.

Přesnost stanovení ( $P$ ) byla vyjádřena jako relativní standardní odchylka podle rovnice:

$$P = 100 \times \text{standardní odchylka (SODCH)} / \text{průměr},$$

kde  $SODCH = \sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$ .

Správnost stanovení ( $S$ ) byla určena jako relativní chyba vypočtené hodnoty koncentrace standardu z kalibrační přímky od skutečné koncentrace standardu a byla vypočtena podle rovnice:

$$S = 100 \times (c_{\text{skutečná}} - c_{\text{stanovená}}) / c_{\text{skutečná}},$$

kde  $c_{\text{stanovená}}$  byla počítána z průměru ( $n=3$ ) ploch M1 nebo M2 dané kalibrační úrovně. Oba statistické parametry byly vypočteny pro každou kalibrační úroveň.

Výtěžek extrakce (VE) metabolitu M1 a M2 po extrakci z biologického materiálu byl vypočten jako:

$$VE = 100 \times \frac{\text{průměrná plocha píku M1 (M2) jednotlivé kalibrační hladiny}}{\text{plocha píku M1 (M2) čistého standardu}}$$

#### *Interference endogenních sloučenin*

Slepé vzorky (medium bez substrátu inkubované s primární kulturou hepatocytů) byly analyzovány pro odhalení případných endogenních sloučenin, které by mohly interferovat se stanovením metabolitu M1 a M2.

## 4.1.2. Výsledky

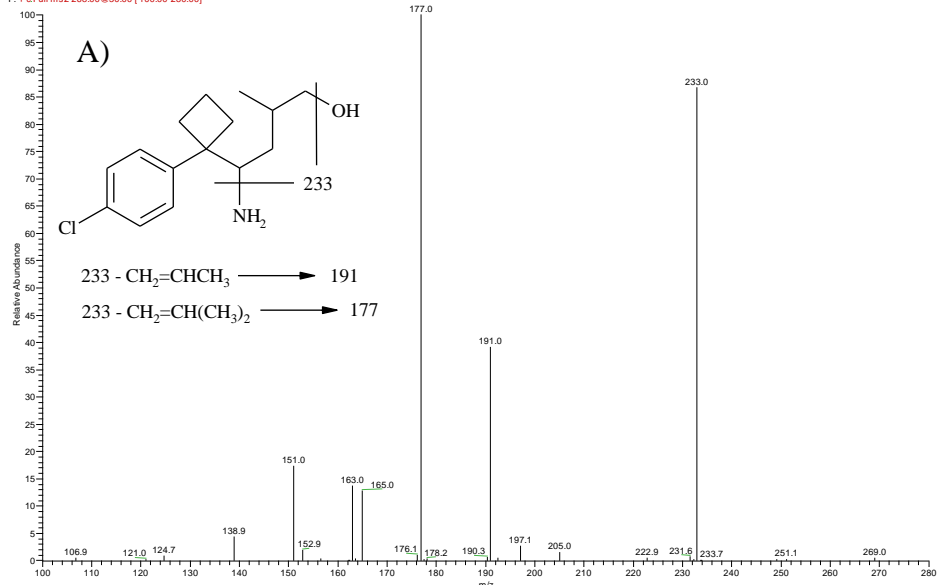
### Identifikace metabolitů

Určení struktury neznámých metabolitů, M1-M4, bylo založeno na tandemové hmotnostně spektrometrické analýze (MS/MS analýze) a na porovnání MS/MS spekter standardů a detekovaných sloučenin. Přítomnost metabolitů M1 a M2 v neznámých vzorcích byla potvrzena porovnáním retenčních časů látek z analýzy neznámého vzorku a z analýzy jednotlivých standardů.

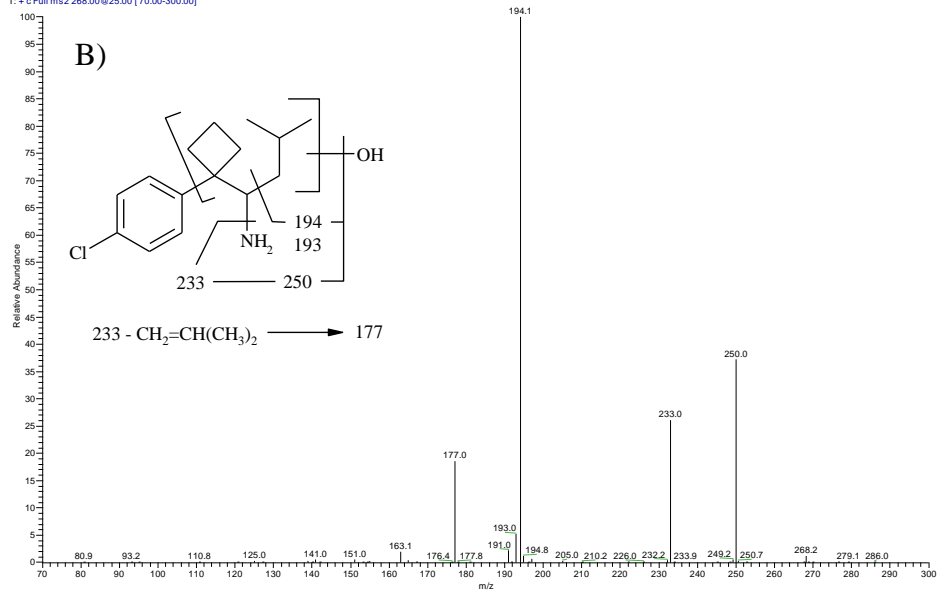
#### *Fragmentační chování standardních sloučenin*

Hmotnostní spektra byla změřena pro standardní roztoky sibutraminu a jeho tři metabolitů. Protonované molekuly  $[M+H]^+$  sibutraminu byly pozorovány při  $m/z$  280, metabolitu M1 při  $m/z$  266, metabolitu M2 při  $m/z$  252 a metabolitu M2-OH při  $m/z$  268. MS/MS spektra  $[M+H]^+$  iontů sibutraminu, M1 a M2 ukázala stejné produktové ionty při  $m/z$  235, 179, 153, 139, 125 a 109. Protonované molekuly sibutraminu, M1 a M2 ztrácejí své  $NH(CH_3)_2$ ,  $NH_2CH_3$  a  $NH_3$  části za vzniku společného iontu  $m/z$  235 (Ding *et al.* 2003). Protonované molekuly M2-OH fragmentovaly za vzniku produktových iontů o  $m/z$  233, 191, 177, 165, 163, 151 a 139 (obrázek 2). Ztrátou  $H_2O$  a  $NH_3$  a její kombinací se ztrátou zbytků  $CH_2=CHCH_3$  nebo  $CH_2=C(CH_3)_2$  vznikaly produktové ionty o  $m/z$  233 ( $[M+H-H_2O-NH_3]^+$ ),  $m/z$  191 ( $[M+H-H_2O-NH_3-CH_2=CHCH_3]^+$ ) a  $m/z$  177 ( $[M+H-H_2O-NH_3-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ).

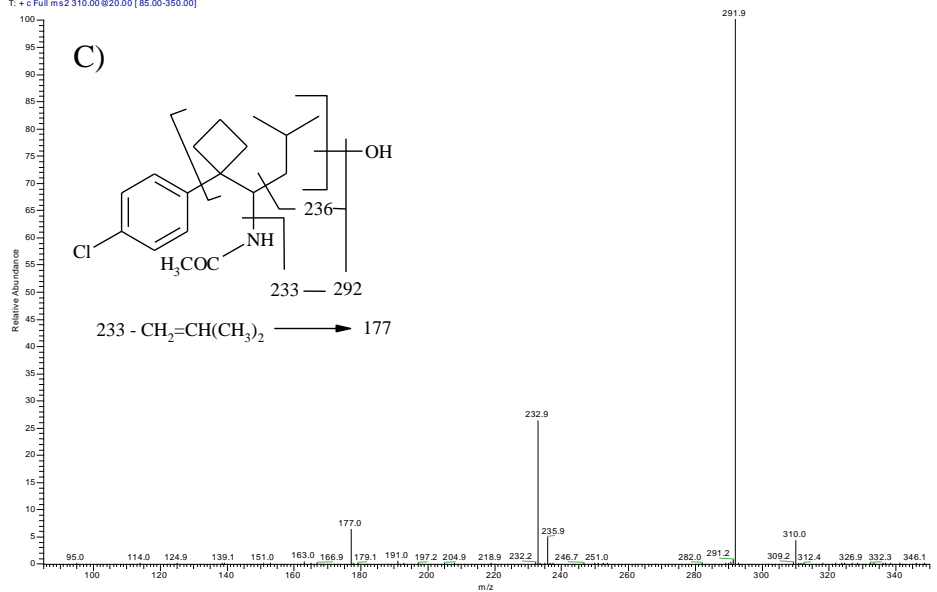
standard M2-OH(S)\_1 #229-255 RT: 12.32-12.84 AV: 27 NL: 2.55E4  
 F: + c Full ms2 255.00@30.00 [100.00-260.00]



pkAms2 #5-20 RT: 0.08-0.39 AV: 16 NL: 4.83E5  
 T: + c Full ms2 268.00@25.00 [70.00-300.00]



pkBms2 #3-20 RT: 0.06-0.42 AV: 18 NL: 7.15E5  
 T: + c Full ms2 310.00@20.00 [85.00-350.00]



**Obrázek 2.** Spektrum produktových iontů standardu M2-OH (A), metabolitu M3 (B) a metabolitu M4 (C). Navržené struktury metabolitů a fragmentace během MS/MS analýzy jsou vloženy.

### *Metabolity M1 a M2*

Hmotnostní spektrum izolované frakce M1 ukázalo iont protonované molekuly  $[M+H]^+$  o  $m/z$  266. Iont protonované molekuly o  $m/z$  252 byl majoritním iontem v hmotnostním spektru izolované frakce M2. MS/MS spektra  $[M+H]^+$  iontů M1 a M2 z izolovaných frakcí ukázala stejné produktové ionty jako MS/MS spektra standardů M1 a M2.

Chromatografická analýza neznámých vzorků z inkubace sibutraminu s biologickým materiálem (mikrosomální frakce jater nebo primární kultura hepatocytů) a její porovnání s analýzou standardů M1 a M2 potvrdila přítomnost metabolitů M1 a M2.

### *Metabolit M3 (inkubace primární kultury hepatocytů se sibutraminem)*

Metabolit M3 byl identifikován jako hydroxylovaný didemethylsibutramin. Metabolit M3 poskytl protonovanou molekulu  $[M+H]^+$  o  $m/z$  268. Spektrum produktových iontů zaznamenané pro  $m/z$  268 obsahovalo ionty  $m/z$  250 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  233 ( $[M+H-H_2O-NH_3]^+$ ),  $m/z$  194 ( $[M+H-H_2O-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ),  $m/z$  193 ( $[M+H-H_2O-CH_2CH(CH_3)_2]^+$ ) a  $m/z$  177 ( $[M+H-H_2O-NH_3-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ) (obrázek 2). Produktové ionty  $m/z$  233 a 177 naznačují, že místem hydroxylace není aromatický kruh, ale uhlovodíkový skelet molekuly.

Spektrum produktových iontů naměřené pro protonovanou molekulu M3 se kvalitativně lišilo od spektra produktových iontů standardu M2-OH. Retenční čas píku M3 v neznámém vzorku se neshodoval s retenčním časem standardu M2-OH.

### *Metabolit M4 (inkubace primární kultury hepatocytů se sibutraminem)*

Metabolit M4 byl identifikován jako N-acetyl konjugát hydroxylovaného didemethylsibutraminu. Metabolit M4 poskytl protonovanou molekulu  $[M+H]^+$  o  $m/z$  310. Spektrum produktových iontů zaznamenané pro  $m/z$  310 obsahovalo ionty  $m/z$  292 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  236 ( $[M+H-H_2O-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ),  $m/z$  233 ( $[M+H-H_2O-CH_3CONH_2]^+$ ) a  $m/z$  177 ( $[M+H-H_2O-CH_3CONH_2-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ) (obrázek 2). Produktové ionty  $m/z$  292 a  $m/z$  233 ukazují, že acetyl je vázán k molekule skrze atom dusíku.

## Kvantitativní stanovení M1 a M2 po inkubaci sibutraminu s mikrosomální frakcí

Průměrná hodnota (směrodatná odchylka) výtěžku extrakce metabolitu M1 byla 95% (3,4%) a metabolitu M2 94% (3,9%). Kalibrační přímka byla lineární v rozsahu 170-5300 pmolů metabolitu M1 ( $y = 0,6764 \times x - 1,7$ ;  $r^2 = 1,000$ ) a 200-6300 pmolů metabolitu M2 ( $y = 0,6244 \times x - 12,0$ ;  $r^2 = 0,9993$ ). V analýze slepého vzorku nebyl nalezen žádný pík endogenního původu, který by interferoval při stanovení metabolitů M1 a M2.

## Kvantitativní stanovení M1 a M2 po inkubaci sibutraminu s primární kulturou hepatocytů

Výtěžek extrakce metabolitu M1 z biologického materiálu byl  $VE <77 - 87\%>$  pro celý rozsah koncentrací (0,35 - 7,9  $\mu\text{M}$ ) kalibrační řady. Rovnice kalibrační přímky byla  $y = 168,6 \times x + 3,1$  ( $r^2 = 0,9967$ ). Přesnost a správnost stanovení byla  $P <1,7 - 4,4\%>$  a  $S <-7,3 - 5,8\%>$  pro celý rozsah koncentrací kalibrační řady. Výtěžek extrakce metabolitu M2 z biologického materiálu byl  $VE <65 - 76\%>$  pro celý rozsah koncentrací (0,36 - 8,1  $\mu\text{M}$ ) kalibrační řady. Rovnice kalibrační přímky byla  $y = 163,4 \times x - 15,4$  ( $r^2 = 0,9998$ ). Přesnost a správnost stanovení byla  $P <0,3 - 6,1\%>$  a  $S <-3,6 - 2,9\%>$  pro celý rozsah koncentrací kalibrační řady. V analýze slepého vzorku nebyl nalezen žádný pík endogenního původu, který by mohl interferovat při stanovení metabolitu M1 a M2.

## Inkubace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu s mikrosomální frakcí

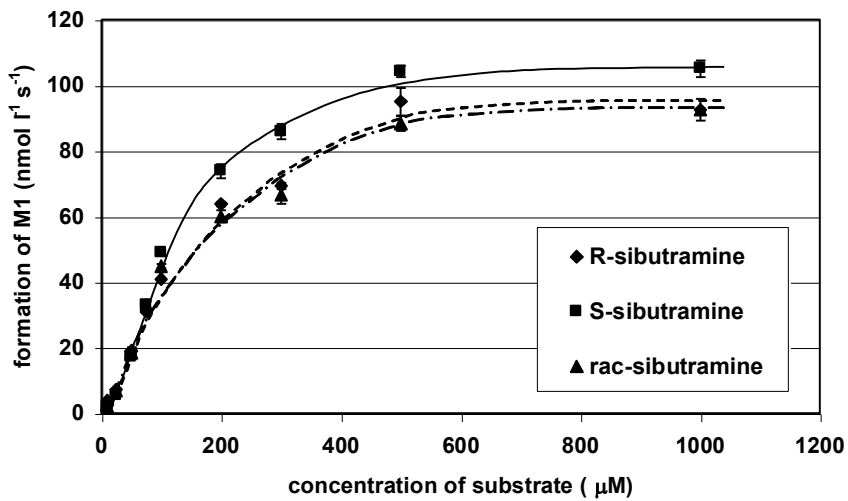
Jaterní mikrosomy potkana byly inkubovány se substrátem (*rac*-, *R*- nebo *S*-sibutramin) v přítomnosti koenzymu NADPH. Metabolity M1 a M2 byly nalezeny jako jediné produkty metabolismu sibutraminu v mikrosomech potkana. Kinetika tvorby M1 a M2 byla studována pro koncentraci substrátu v rozmezí 0,01-1,0 mM.

Závislosti rychlosti tvorby M1 na počáteční koncentraci substrátu jsou uvedeny na obrázku 3. Kinetická analýza ukázala, že křivka sigmoidní odezvy popisuje naměřená data lépe než rovnice Michaelise-Mentenové. Zdánlivé kinetické parametry tvorby M1 a jeho vnitřní clearance byly vypočteny pomocí softwaru GraphPad Prism (verze 3.00). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Žádné významné rozdíly v hodnotách  $K_m'$  mezi enantiomery sibutraminu nebyly nalezeny. Mikrosomální enzymy ukázaly mírně, ale

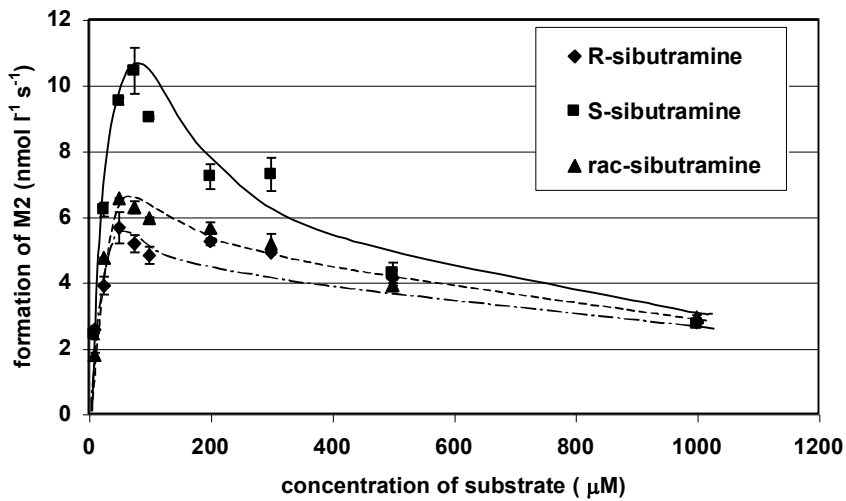
statisticky významně ( $P < 0,05$ ) vyšší hodnoty  $V_{max}'$  pro *S*-sibutramin v porovnání s *R*-nebo *rac*-sibutraminem.

Závislosti rychlosti tvorby M2 na počáteční koncentraci sibutraminu jsou uvedeny na obrázku 3, ze kterého je vidět, že naměřené závislosti nejsou hyperbolické. Při nízkých koncentracích sibutraminu rychlost tvorby M2 lineárně vzrůstala s rostoucí koncentrací sibutraminu až do dosažení maxima, kdy další zvyšování koncentrace sibutraminu vedlo ke snižování rychlosti tvorby M2. Když byl M1 použit jako substrát na místo sibutraminu, závislost rychlosti tvorby M2 měla klasický hyperbolický průběh (obrázek 3). Vypočtené zdánlivé kinetické parametry tvorby M2 jsou uvedeny v tabulce 5. Mikrosomální enzymy ukázaly významně vyšší hodnoty  $K_m'$  a  $V_{max}'$  pro *S*-sibutramin než pro *R*-sibutramin. Významně vyšší hodnota  $V_{max}'$  byla nalezena, když byl na místo sibutraminu použit M1 jako substrát. Vnitřní clearance nebyla ovlivněna rozdílným prostorovým uspořádáním enantiomerů sibutraminu.

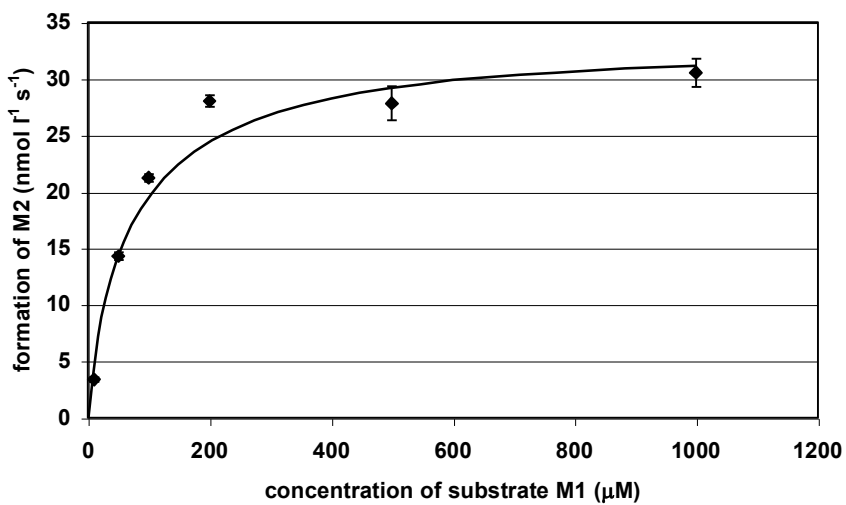
A)



B)



C)



**Obrázek 3.** Závislost rychlosti tvorby metabolitů na počáteční koncentraci substrátu v jaterních mikrosomech potkana. Tvorba M1 z *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu (A), tvorba M2 z *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu (B), tvorba M2 z M1 (C).



**Tabulka 5.** Zdánlivé kinetické parametry pro tvorbu M1 a M2 z *R*-, *S*-, *rac*-sibutraminu a pro tvorbu M2 z *rac*-M1 v jaterních mikrosomech potkana.

Substrát	$K_m'$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		$V_{\text{max}}'$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ )		$Cl_{\text{int}}$ ( $10^{-4} \text{s}^{-1}$ )	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
<i>R</i> -sibutramin	173,1 ± 35,48	25,5 ± 9,7	0,118 ± 0,009	0,008 ± 0,001*	6,8	3,1
<i>S</i> -sibutramin	171,0 ± 45,08	49,6 ± 17,0	0,134 ± 0,003*	0,018 ± 0,003*	7,8	3,7
<i>rac</i> -sibutramin	167,1 ± 28,07	54,9 ± 25,0	0,114 ± 0,007	0,014 ± 0,004	6,8	2,6
<i>rac</i> -M1	-	57,6 ± 10,5	-	0,033 ± 0,001	-	5,7

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.D. ze tří nezávislých experimentů ( $n = 3$ ). Mikrosomy byly získány z jater šesti potkanů.

\* významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) při porovnání *R*- a *S*-enantiomeru. Statistická analýza byla provedena pomocí one-way variační analýzy ve spojení s Dunnett's post-hoc testem.

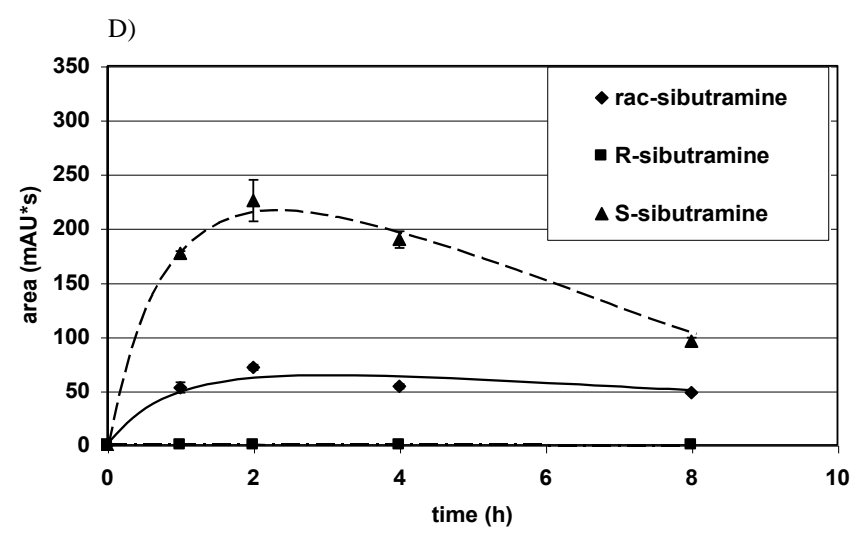
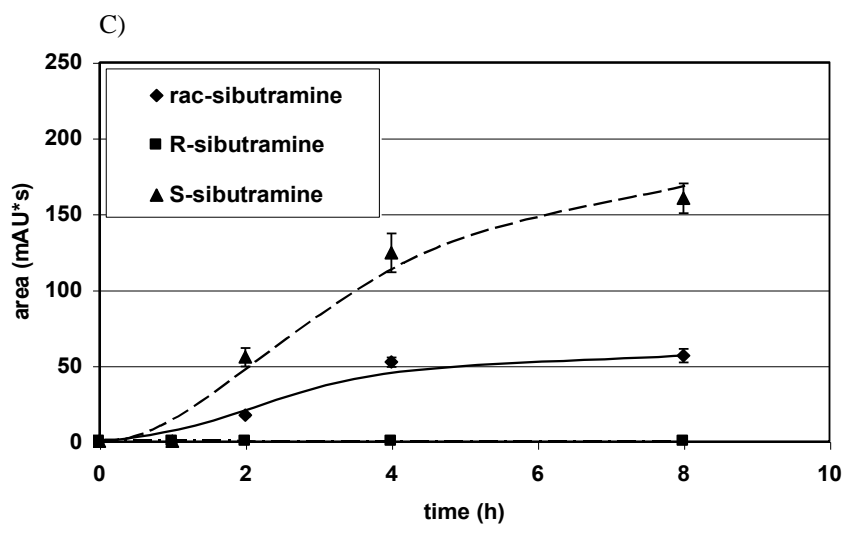
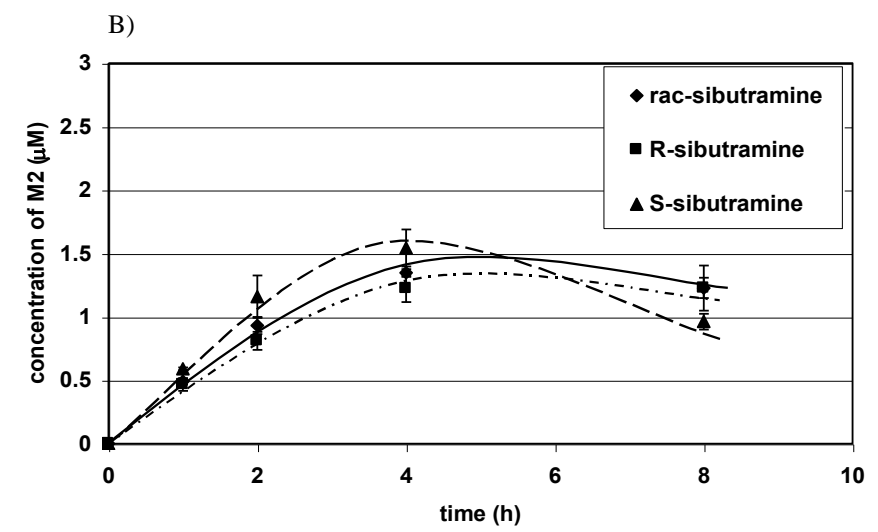
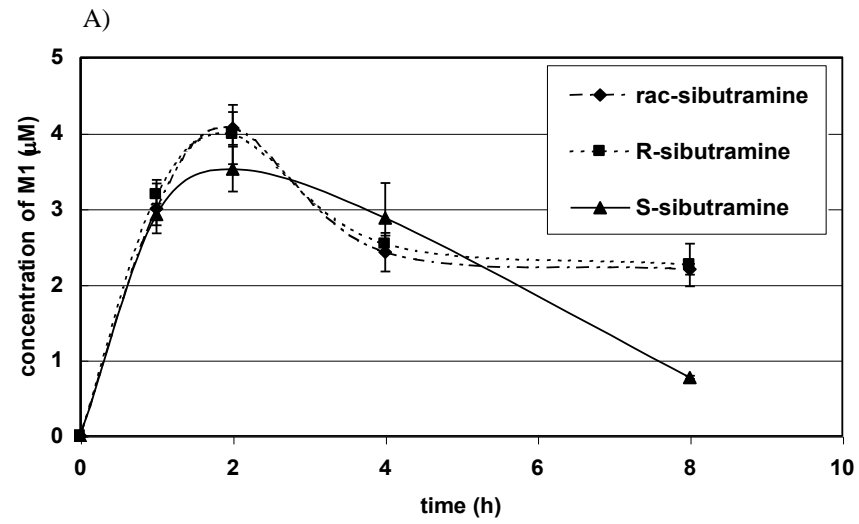
## Inkubace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu s primární kulturou hepatocytů

Před vlastní biotransformační studií byla pomocí testu MTT stanovena cytotoxicita sibutraminu v primární kultuře hepatocytů potkana. *R*-, *S*- nebo *rac*-sibutramin nezpůsobil žádný významný pokles životnosti buněk do koncentrace 50  $\mu\text{M}$ .

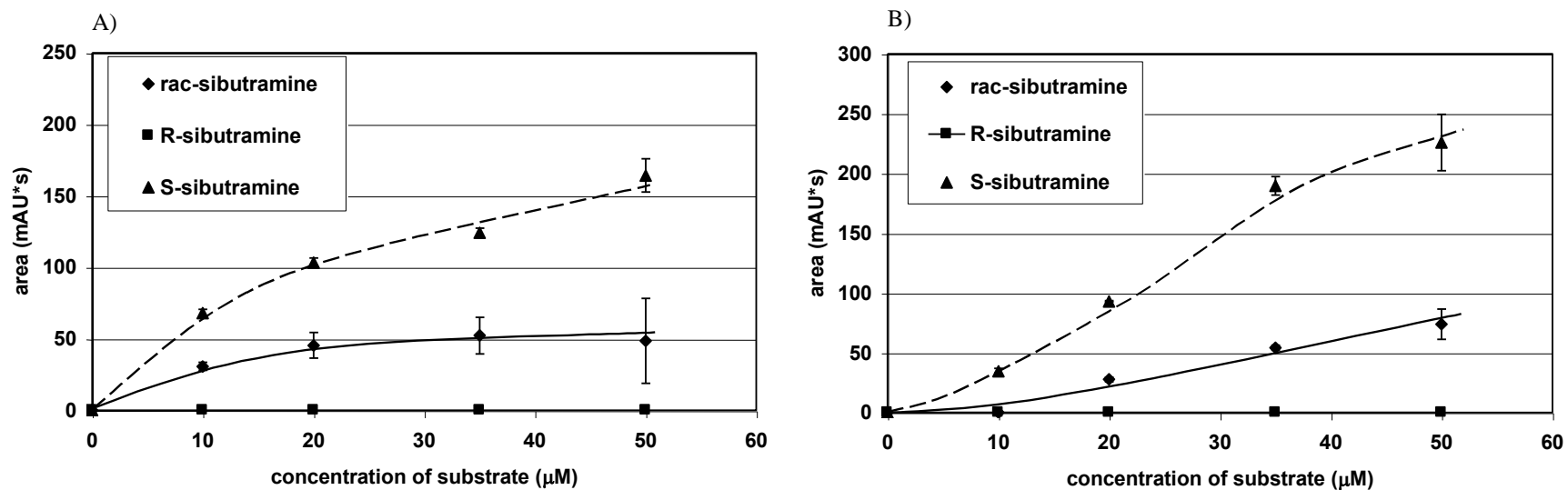
Biotransformace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu v hepatocytech byla studována v závislosti na době inkubace a koncentraci substrátu. Když byl použit *R*-sibutramin jako substrát, tak jedinými hlavními metabolity v kultivačním médiu byly M1 a M2. Vedle metabolitů M1 a M2 byly nalezeny další dva hlavní metabolity, označené jako M3 a M4, a dva minoritní metabolity jako biotransformační produkty *S*- a *rac*-sibutraminu. Metabolity M1 a M2 byly kvantifikovány pomocí příslušných standardů. Pro účely porovnání stereoselektivity biotransformace *R*-, *S*- a *rac*-sibutraminu bylo zastoupení metabolitů M3 a M4 vyjádřeno na základě plochy píku daného metabolitu.

Tvorba metabolitů M1, M2, M3 a M4 v závislosti na době inkubace je uvedena na obrázku 4. Koncentrace M1 a M2 vzrůstala s dobou inkubace a dosahovala maxima přibližně po 2 h inkubace u metabolitu M1 a po 4 h inkubace u metabolitu M2. Delší doba inkubace vedla ke snížení koncentrace těchto metabolitů v médiu. Když byl použit *S*-sibutramin jako substrát, byla koncentrace metabolitů M1 a M2 po 8 h inkubace významně nižší, než v případě použití *R*- nebo *rac*-sibutraminu jako substrátu. Zatímco tvorba metabolitu M4 dosahovala maxima po 2 h inkubace, produkce M3 vzrůstala až do konce inkubace (8h).

Tvorba metabolitů v závislosti na použité koncentraci substrátů byla testována v rozmezí koncentrací substrátů 0-50  $\mu\text{M}$ . Nebyl nalezen žádný významný rozdíl mezi kinetikou M1 a M2 v závislosti na použité enantiomerní formě sibutraminu. Výsledky kinetické studie tvorby M3 a M4 jsou uvedeny na obrázku 5. Oba metabolity vznikaly pouze, když byl použit *S*- nebo *rac*-sibutramin jako substrát. Průběhy křivek získané pro M3 odpovídaly kinetice podle Michaelis-Mentenové (obrázek 5A). Kinetické křivky získané pro M4 odpovídaly sigmoidní odezvě na rostoucí koncentraci substrátu (obrázek 5B), což může být vysvětleno buď dimerní formou daného biotransformačního enzymu nebo skutečností, že na vzniku M4 se podílí více než jeden biotransformační enzym.



**Obrázek 4.** Závislost tvorby metabolitů M1 (A), M2 (B), M3 (C) a M4 (D) na době inkubace *R*-, *S*- nebo *rac*-sibutraminu s primární kulturou hepatocytů potkana.



**Obrázek 5.** Závislost tvorby metabolitů M3 (A) a M4 (B) na počáteční koncentraci *R*-, *S*- nebo *rac*-sibutraminu v primární kultuře hepatocytů potkana.

### 4.1.3. Diskuse

Sibutramin je chirální léčivo podávané jako racemát. Při porovnávání účinnosti *rac*-sibutraminu a enantiomerů jeho hlavních metabolitů byla nalezena stereoselektivita v jejich biologické aktivitě (Glick *et al.* 2000). Tato biotransformační studie enantiomerů sibutraminu byla provedena s úmyslem vyhodnotit stereoselektivitu I. fáze metabolismu sibutraminu. Jako modelový systém byla použita primární kultura hepatocytů a jaterní mikrosomy potkana.

Na začátku studie bylo zapotřebí vyvinout analytickou metodu pro separaci a kvantifikaci sibutraminu a jeho metabolitů. Dříve uvedené metody zabývající se analytickým stanovením sibutraminu a/nebo jeho metabolitů nebyly buď vhodné pro *in vitro* biotransformační studii (Radhakrishna *et al.* 2000) nebo byly metodicky náročné (Chen *et al.* 2003, Ding *et al.* 2003). Vyvinutá metoda umožnila separaci a kvantitativní stanovení metabolitů sibutraminu v kultivačním médiu a mikrosomálních inkubátech.

Identifikace neznámých metabolitů sibutraminu byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Struktura metabolitů M1 a M2 byla potvrzena synteticky připravenými standardy. Metabolit M3 byl identifikován jako hydroxylovaný didemethylsibutramin. Spektrum produktových iontů M3 neumožnilo přesné určení místa hydroxylace. Hydroxylová skupina M3 není ale umístěna na koncovém atomu uhlíku isobutylové části molekuly, jelikož spektrum produktových iontů a chromatografické chování metabolitu M3 se lišilo od standardu M2-OH. Metabolit M4 byl identifikován jako N-acetyl konjugát hydroxylovaného didemethylsibutraminu. Spektrum produktových iontů M4 umožnilo určit, že se jedná o N-acetyl konjugát. Na základě stejného fragmentačního vzorce  $[M+H-H_2O-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ , který poskytuje iont  $m/z$  194 ve spektru M3 a iont  $m/z$  236 ve spektru M4 se domníváme, že metabolit M4 by mohl pravděpodobně být N-acetyl konjugát metabolitu M3.

Bez ohledu na použitou enantiomerní formu substrátu, inkubace sibutraminu s mikrosomy a NADPH vedla pouze k tvorbě metabolitů M1 a M2. Sibutramin působil jako inhibitor enzymu, který katalyzoval tvorbu metabolitu M2 z metabolitu M1. Naproti tomu byla nalezena zřetelná stereoselektivita biotransformace sibutraminu v primární kultuře hepatocytů potkana. Zatímco inkubace *R*-sibutraminu vedla k tvorbě pouze dvou hlavních metabolitů (M1 a M2), inkubace *S*-sibutraminu a do menší míry

také *rac*-sibutraminu vedla k tvorbě čtyř hlavních (M1, M2, M3 a M4) a dvou minoritních metabolitů. Na základě těchto výsledků může být *R*-sibutramin považován za enantiomer s méně rozsáhlou biotransformací v hepatocytech potkana *in vitro* než jeho *S*-enantiomer. Nižší biotransformace může znamenat pomalejší deaktivaci a nižší riziko lékových interakcí a inter-individuální variability. Kromě toho byly *R*-demethylsibutramin a *R*-didemethylsibutramin účinnější při snižování příjmu potravy a snižování tělesné hmotnosti než jejich *S*-enantiomery (Glick *et al.* 2000). *R*-sibutramin může tedy představovat výhodnější enantiomer sibutraminu jak z farmakokinetického, tak z farmakodynamického pohledu. Výsledky získané na zvířecím modelu by měly být uvažovány jako předběžné s ohledem na dobře známé mezidruhové rozdíly v aktivitě, stereoselektivitě a stereospecifitě biotransformačních enzymů.

## 4.2. Metabolismus sibutraminu v lidských mikrosomech

### 4.2.1. Experimentální část

#### Příprava subcelulárních frakcí

K izolaci subcelulárních frakcí byla použita jaterní tkáň od dárců (Cadaver Donor Programme, Transplantační centrum lékařské fakulty v Hradci Králové). Jaterní tkáň byla rozstříhána na malé kousky, zamražena a uchována v hluboko mrazícím boxu (-80 °C). Pro izolaci subcelulárních frakcí bylo odváženo 2x 5g zmrzlé tkáně od každého dárce. Po částečném rozmrznutí kousků tkáně (v chladícím boxu při teplotě do +8 °C) byla játra jemně nastříhána a rozmixována ručním mixerem v kádince s 5 mL Na-fosfátového pufru (0,1 M, pH 7,4). Následovala homogenizace v prostředí 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4 (v poměru 5g tkáně : 15ml pufru) za použití skleněného homogenizátoru s rotujícím teflonovým pístem. Homogenát byl přelit do vychlazených centrifugačních kyvet a tyto kyvety byly vyváženy Na–fosfátovým pufrům. První centrifugace probíhala 20 min na centrifuze Heraeus při 5000 g a při 4 °C. Supernatant byl dále centrifugován 60 minut při 20 000 g a 4 °C. Vzniklý supernatant byl přemístěn do ultracentrifugačních kyvet a doplněn Na–fosfátovým pufrům. Ultracentrifugace probíhala 60 minut na ultracentrifuze Beckman při 100 000 g a 4 °C. Po hodině byly kyvety vyndány, supernatant (cytosol) byl rozpipetován do mikrozkuvek a sediment mikrosomů byl resuspendován v Na–fosfátovém pufru pomocí homogenizačního pístu. Ultracentrifugace pak byla opakována za stejných podmínek. Sedimentovaná mikrosomální frakce byla nakonec zhomogenizována ve stejném objemu Na–fosfátového pufru s 20% (v/v) glycerolu, jako činila navážka tkáně na zkumavku. Směs byla slita do kádinky a na několik vteřin ponořena do ultrazvukové lázně. Za stálého míchání pak byly mikrosomy rozpipetovány do mikrozkuvek.

Všechny úkony s biologickým materiálem byly prováděny v chladícím boxu nebo v nádobách chlazených ledem. Mikrozkuvky s mikrosomy nebo cytosolem byly uchovány v hluboko mrazícím boxu při -80 °C.

#### Příprava směšného roztoku mikrosomů

K provedení inkubací byl použit směsný roztok mikrosomů. Mikrosomální frakce pocházející z jaterní tkáně šesti různých dárců (ženské pohlaví: 55, 65 a 69 roků, mužské pohlaví: 49, 56 a 64 roků) byly rozmrazeny ve studené vodě a z každého vzorku bylo odebráno po 1 mL do sterilizované kádinky. Za neustálého míchání a chlazení byly mikrosomy rozpipetovány do mikrozkuvek a zamrazeny při -80 °C. Tento směsný roztok mikrosomů byl opět rozmražen a protřepán těsně před zahájením inkubace.

### Inkubace *rac*-, *R*- a *S*-sibutraminu s mikrosomy

Inkubační směs o celkovém objemu 300 µL obsahovala: 150 µL roztoku substrátu, 100 µL vodného roztoku NADPH o koncentraci 3 mM a 50 µL roztoku mikrosomů. Na přípravu zásobních roztoků *rac*-, *R*- a *S*-sibutraminu a jejich ředění byla použita redestilovaná voda. Inkubace byly provedeny pro sedm různých koncentrací (10-20-50-100-200-300-500 µM) substrátu ve třech paralelních vzorcích. Směs substrátu a NADPH byla pre-inkubována 5 min při 37 °C. Vlastní inkubace byla zahájena přidáním 50 µL mikrosomů a probíhala při 37 °C. Po 30 min byla inkubace zastavena přenosem vzorků do ledové lázně a okamžitým zpracováním.

### Vyhodnocení kinetických dat

Z naměřených hodnot byla získána závislost rychlosti tvorby metabolitu M1 na počáteční koncentraci substrátu. Tato závislost byla proložena rovnicí

$$v = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$$

a kinetické parametry  $V_{max}$  a  $K_m$  (popř. zdánlivé kinetické parametry) byly získány nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism (verze 4.03).

### Metoda achirální HPLC analýzy

#### *Příprava vzorků před analýzou*

Vzorky z inkubace s mikrosomy a vzorky kalibrační řady byly zalkalizovány roztokem NaOH (výsledné pH v rozmezí 9,7-9,8) a extrahovány do ethylacetátu (2x 700 µL). Extrakce byla provedena na třepačce po dobu 7 min a pro oddělení vodné a organické fáze byla použita centrifugace (3500 g, 7 min). Spojené extrakty byly po přidavku 10 µL kyseliny octové odpařeny do sucha v rotačním vakuovém koncentrátoru při 45 °C. Odparky byly uchovány v lednici při 4 °C do druhého dne, kdy byly rozpuštěny v 150 µL směsi octan amonný pH 5,3/acetonitril - 70/30 (v/v).



## HPLC

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA) byl použit pro separaci a kvantitativní stanovení metabolitu M1 ve vzorcích biologického materiálu. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6.** Chromatografické podmínky pro achirální HPLC analýzu.

kolona	Zorbax Elipse XDB C <sub>8</sub> 150x4,6 mm, 5 μm
předkolona	Zorbax Elipse XDB C <sub>8</sub> 12,5x4,6 mm, 5 μm
výrobce	Agilent Technologies, USA
mobilní fáze	A: 20 mM octan amonný pH 5,3/voda/acetonitril, 30/50/20, v/v/v B: 20 mM octan amonný pH 5,3/acetonitril, 30/70, v/v
gradient	0 min 30% B, 16 min 70% B, 19 min 70% B, 20 min 30% B, 26 min 30% B
průtok a teplota	1,0 mL/min, 25 °C
detektor	UV 223 nm

### *Identifikace metabolitů*

Identifikace metabolitů M1 a M2 byla provedena na základě porovnání retenčních časů látek z analýzy neznámého vzorku a z analýzy jednotlivých standardů. Podmínky separace (rozsah gradientu a jeho strmost, pH mobilní fáze) byly změněny pro ověření shodného chromatografického chování metabolitů v neznámém vzorku a ve směsi standardů.

### *Kvantitativní stanovení metabolitu M1*

Množství metabolitu M1 v neznámých vzorcích bylo stanoveno na základě kalibrační křivky, která byla sestrojena jako závislost plochy píku metabolitu M1 na jeho koncentraci. Byla připravena řada kalibračních roztoků metabolitu M1 o koncentracích 2,4 - 4,8 - 9,6 - 24,1 - 48,1 a 96,3 μM. Kalibrační roztoky obsahovaly 250 μL příslušného zásobního vodného roztoku standardu a 50 μL jaterních mikrosomů potkana. Od každé koncentrace byly připraveny tři paralelky.

*Linearita kalibrační přímky, přesnost a správnost stanovení metabolitu M1, výtěžek extrakce*

Parametry byly stanoveny stejným způsobem jako v kapitole 4.1.1. v odstavci Kvantitativní stanovení M1 a M2 po inkubaci sibutraminu s primární kulturou hepatocytů.

#### *Interference endogenních sloučenin*

Slepé vzorky obsahující 150  $\mu\text{L}$  vody, 100  $\mu\text{L}$  NADPH a 50  $\mu\text{L}$  mikrosomů byly analyzovány pro odhalení případných endogenních sloučenin, které by mohly interferovat se stanovením metabolitu M1.

#### *Jímání frakcí a jejich úprava na chirální analýzu*

V průběhu nechirální analýzy byly manuálně jímány frakce o objemu přibližně 400-800  $\mu\text{L}$  metabolitu M1 a sibutraminu. Najímané frakce byly uchovány v lednici při 4  $^{\circ}\text{C}$  do druhého dne, kdy byly částečně odpařeny na objem 150-250  $\mu\text{L}$  v rotačním vakuovém koncentrátoru při 45  $^{\circ}\text{C}$  a následně analyzovány.

### Metoda chirální HPLC analýzy

#### *HPLC*

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series byl použit při chirální analýze najímaných frakcí metabolitu M1 a sibutraminu. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce 7. Účinnost celého systému byla charakterizována pomocí chromatografických parametrů ( $k'$ ,  $\alpha$ ,  $R_{S/R}$  a  $N$ ), které byly vypočteny z výsledků analýz jednotlivých standardů. Kapacitní faktor ( $k'$ ) byl vypočítán podle vztahu

$$k' = (t - t_0) / t_0,$$

kde  $t$  je retenční čas daného enantiomeru a  $t_0$  je mrtvý čas systému (byl stanoven jako doba od nástřiku do čelního narušení odezvy detektoru). Selektivita ( $\alpha$ ) byla vypočítána podle vztahu

$$\alpha = k'_R / k'_S,$$

kde  $k'_R$  a  $k'_S$  jsou kapacitní faktory  $R$ - a  $S$ -enantiomeru. Rozlišení enantiomerů ( $R_{S/R}$ ) bylo vypočteno podle vztahu

$$R_{S/R} = 1,18 \times (t_R - t_S) / (W_R + W_S),$$

kde  $t_R$  a  $t_S$  jsou retenční časy  $R$ - a  $S$ -enantiomeru a  $W_R$ ,  $W_S$  je šířka jejich píku v půlce výšky. Počet teoretických pater ( $N$ ) byl vypočten podle vztahu

$$N = 5,54 * (t^2 / W^2).$$

**Tabulka 7.** Chromatografické podmínky pro chirální HPLC analýzu.

kolona	Chiral AGP 150x4 mm, 5 $\mu$ m
předkolona	Chiral AGP 10x4 mm, 5 $\mu$ m
výrobce	ChromTech Ltd, Cheshire, UK
mobilní fáze	10 mM octan amonný pH 5,0/acetonitril, 90/10, v/v
průtok a teplota	0,9 mL/min, 25 °C
detektor	UV 223 nm

#### *Ověření chirální stability látek během přípravy vzorků*

Stabilita poměru enantiomerů racemických látek a stabilita jednotlivých *R*- a *S*-enantiomerů byla zjištěna analýzou standardů, které byly připraveny, zpracovány a analyzovány stejným způsobem, jakým bylo zacházeno s vlastními vzorky. Vzorky kalibrační řady byly analyzovány až na chirální úroveň pro stanovení poměru enantiomerů standardu *rac*-M1. Poměr enantiomerů *rac*-sibutraminu a stabilita jednotlivých enantiomerů *R*- a *S*-sibutraminu byly stanoveny z analýzy kontrolních vzorků složených z 150  $\mu$ L roztoku daného substrátu, 100  $\mu$ L vody a 50  $\mu$ L jaterních mikrosomů potkana. Výsledky těchto analýz byly porovnány s výsledky analýz původních standardních roztoků a na jejich základě byl učiněn závěr o chirální stabilitě analytů.

#### *Vyhodnocení chirálních analýz*

Zastoupení *R*-enantiomeru ( $\Delta_R$ ) nebo *S*-enantiomeru ( $\Delta_S$ ) daného analytu bylo vypočteno podle vztahu:

$$\Delta_R = P_R / (P_R + P_S) \times 100$$

$$\Delta_S = P_S / (P_R + P_S) \times 100,$$

kde  $P_R$  je plocha píku *R*-enantiomeru a  $P_S$  je plocha píku *S*-enantiomeru. V případě stanovení chirální stability čistého enantiomeru během přípravy vzorku nebo stereospecifity metabolické reakce daného enantiomeru byla z chirální analýzy zjišťována přítomnost druhého enantiomeru a výsledek vyjádřen hodnotami  $\Delta_R$  nebo  $\Delta_S$ . U měření, která byla provedena ve více stanoveních byla vyjádřena standardní odchylka (*SODCH*).

## 4.2.2. Výsledky

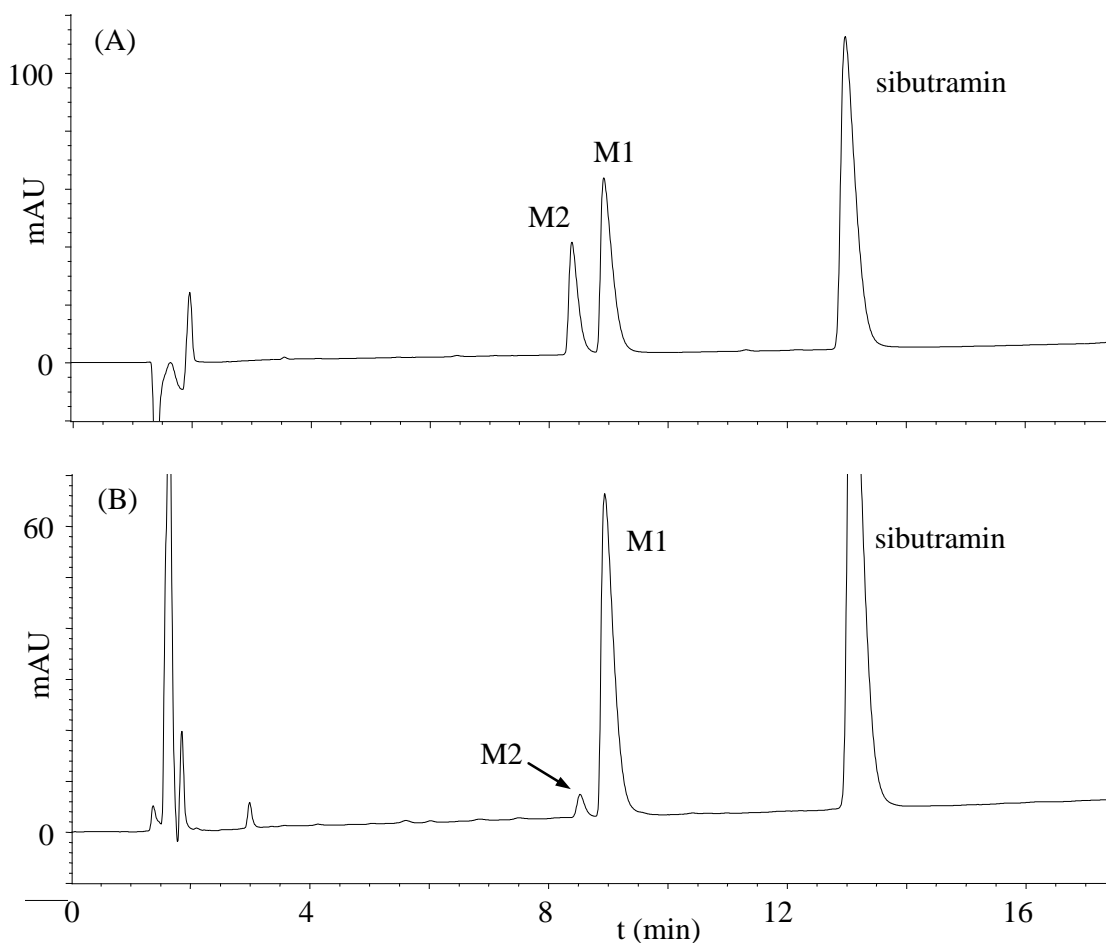
### Metoda achirální HPLC analýzy

#### *Identifikace metabolitů*

Analýza vzorků z inkubace *rac*-, *R*- nebo *S*- sibutraminu s mikrosomy a její porovnání s analýzou standardní směsi ukázala přítomnost metabolitu M1, metabolitu M2 a nezreagovaného sibutraminu (obrázek 6). Hlavním vznikajícím metabolitem byl metabolit M1. Při změně podmínek separace bylo chromatografické chování obou metabolitů shodné s příslušnými standardy.

#### *Kvantitativní stanovení metabolitu M1*

Výtěžek extrakce metabolitu M1 z biologického materiálu byl  $VE <86 - 90\%>$  pro celý rozsah koncentrací (2,4 - 96,3  $\mu\text{M}$ ) kalibrační řady. V analýze slepého vzorku nebyl nalezen žádný pík endogenní povahy, který by mohl interferovat při stanovení metabolitu M1. Rovnice kalibrační přímky byla  $y = 72,9 \times x + 9,5$  ( $r^2 = 0,999$ ). Přesnost a správnost stanovení byla  $P <1,5 - 10,0\%>$  a  $S <-1,5 - 6,2\%>$  pro celý rozsah koncentrací kalibrační řady.



**Obrázek 6.** Záznam z nechirální chromatografické separace sibutraminu a jeho metabolitů. (A) Analýza standardní směsi sibutraminu ( $t_R = 12,97$  min), metabolitu M1 ( $t_R = 8,92$  min) a metabolitu M2 ( $t_R = 8,38$  min). (B) Analýza vzorku z inkubace *rac*-sibutraminu s lidskými mikrosomy, sibutramin ( $t_R = 13,08$  min), metabolit M1 ( $t_R = 8,94$  min) a metabolit M2 ( $t_R = 8,53$  min). Koncentrace *rac*-sibutraminu v inkubační směsi byla  $150 \mu\text{M}$ . Podmínky chromatografické separace jsou uvedeny v tabulce 6.

## Metoda chirální HPLC analýzy

### *Chromatografie a stanovení pořadí eluce enantiomerů*

Vypočtené hodnoty chromatografických parametrů stanovených z analýzy jednotlivých standardů jsou uvedeny v tabulce 8. Ačkoliv byla metoda nakonec použita jen pro chirální analýzy metabolitu M1 a sibutraminu, při jejím vývoji byl také uvažován metabolit M2 a dosažené výsledky jsou rovněž uvedeny v tabulce 8. Dané chromatografické podmínky umožnily separaci enantiomerů *rac*-sibutraminu, *rac*-M1 a *rac*-M2. Při analýze těchto látek ve směsi ale docházelo k částečné nebo úplné koeluci enantiomerů jednotlivých látek a ke vzájemné interferenci signálu z UV detektoru. Pro získání potřebné informace o zastoupení enantiomerů bylo nutné provést analýzy

jednotlivých látek samostatně. Při stanovení neznámých vzorků byl tento požadavek realizován zahrnutím kroku achirální předseparace a izolace frakcí daných látek.

Stanovení pořadí eluce enantiomerů *rac*-sibutraminu bylo provedeno porovnáním chromatogramu z analýzy *rac*-sibutraminu s chromatogramy *R*-sibutraminu a *S*-sibutraminu. První v pořadí eluoval *S*-enantiomer sibutraminu. Pořadí eluce enantiomerů *rac*-M1 a *rac*-M2 bylo určeno na základě analogie pořadí eluce enantiomerů *rac*-sibutraminu, tedy že *S*-enantiomery eluují první v pořadí, protože standardy čistých enantiomerů metabolitu M1 a metabolitu M2 nebyly k dispozici.

**Tabulka 8.** Vypočtené chromatografické parametry z chirální separace standardů *rac*-, *R*- a *S*-sibutraminu a *rac*-M1 a *rac*-M2. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce 7.

parametr	<i>rac</i> -sibutramin	<i>S</i> -sibutramin	<i>R</i> -sibutramin	<i>rac</i> -M1	<i>rac</i> -M2
$k'_S$	2,32	2,27		2,43	2,93
$k'_R$	3,96		3,90	3,74	3,84
$\alpha$	1,71			1,54	1,31
$R_{S/R}$	5,08			4,10	2,68
$N_S$	2916	2943		2933	2850
$N_R$	2434		2379	2420	2518

**Tabulka 9.** Výsledky testování chirální stability látek během přípravy vzorků. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty (%), [standardní odchylka, (%)], (N) je počet měření. Hodnoty pro *R*- a *S*-sibutramin byly stanoveny pouze z jednoho měření. \*Hodnoty pro *R*-sibutramin jsou uvedeny jako  $\Delta_R$ .

látka	čisté standardy	standardy na stabilitu
	$\Delta_S$ (nebo $\Delta_R$ )	$\Delta_S$ (nebo $\Delta_R$ )
<i>rac</i> -sibutramin	49,9 [0,2] (3)	50,5 [0,3] (4)
<i>R</i> -sibutramin	100,0* (1)	100,0* (1)
<i>S</i> -sibutramin	100,0 (1)	100,0 (1)
<i>rac</i> -M1	50,2 [0,5] (4)	50,2 [0,5] (4)
<i>rac</i> -M2	50,2 [0,2] (4)	50,3 [0,8] (4)

#### *Ověření chirální stability látek během přípravy vzorků*

Výsledky testování chirální stability látek během přípravy vzorků jsou uvedeny v tabulce 9. Ačkoliv byla metoda nakonec použita jen pro chirální analýzy metabolitu M1 a sibutraminu, testování chirální stability bylo provedeno také pro metabolit M2 a dosažené výsledky jsou rovněž uvedeny v tabulce 9. Z uvedených hodnot  $\Delta_S$  a  $\Delta_R$  se dá usuzovat, že v průběhu přípravy vzorku (extrakce, odpaření, zakoncentrování

najímaných frakcí) nedochází ke změně poměru enantiomerů u racemických látek ani k tvorbě druhého enantiomeru u enantiomerně čistých látek.

### Inkubace *rac*-, *R*- a *S*-sibutraminu s jaterními mikrosomy

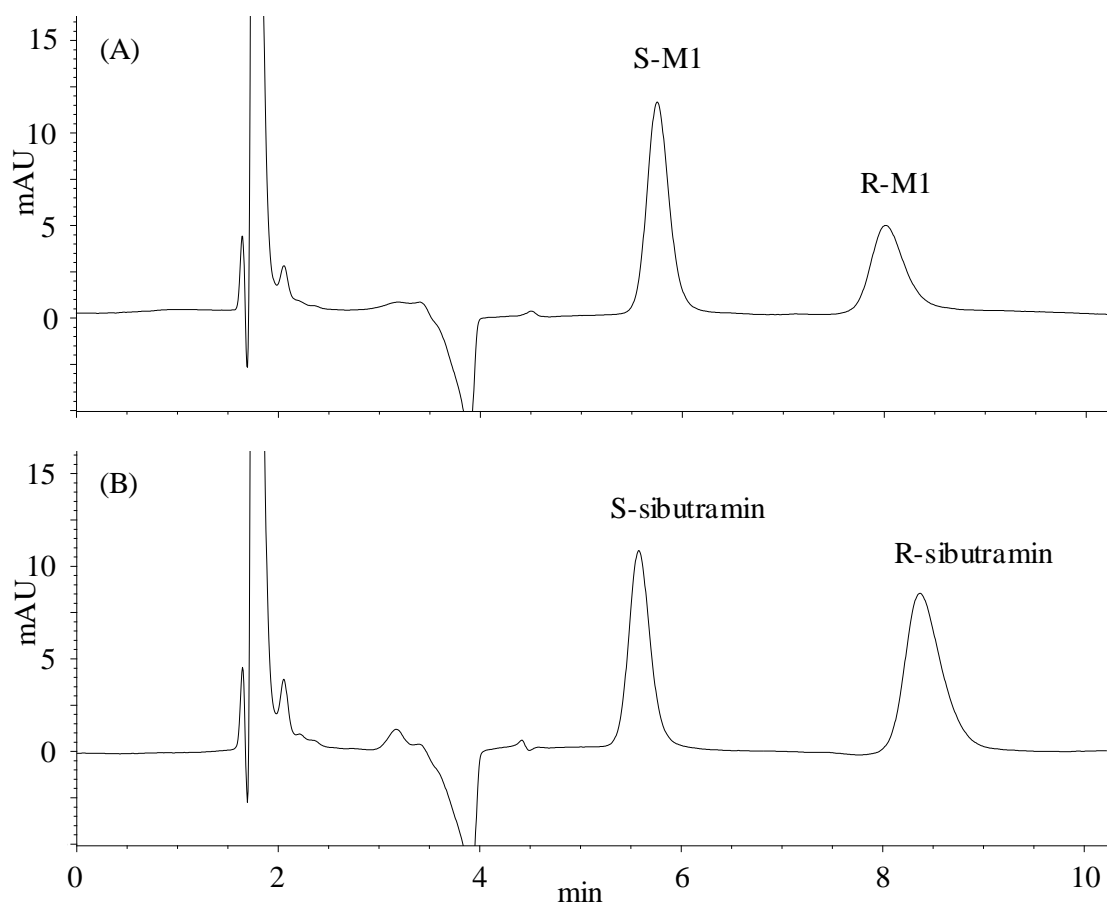
Sibutramin byl metabolizován lidskými jaterními mikrosomy v přítomnosti koenzymu NADPH na metabolit M1 a M2. Metabolit M1 byl hlavním vznikajícím metabolitem sibutraminu a metabolit M2 vznikal jako minoritní metabolit. Žádné jiné metabolity sibutraminu nebyly nalezeny a N-demethylace se ukázala jako hlavní biotransformační cesta sibutraminu v mikrosomální frakci lidské jaterní tkáně.

Inkubace *rac*-sibutraminu vedla k tvorbě obou enantiomerů metabolitu M1, přičemž *S*-M1 byl zastoupen ve větší míře než jeho *R*-enantiomer. Chirální analýza nezreagovaného *rac*-sibutraminu ukázala, že *R*-sibutramin byl přítomen ve větší míře než jeho *S*-enantiomer. Tyto výsledky naznačovaly, že *R*-M1 by mohl vznikat pouze z *R*-sibutraminu a *S*-M1 pouze z *S*-sibutraminu. Zastoupení enantiomerů, vyjádřené jako  $\Delta_S$ , metabolitu M1 a nezreagovaného sibutraminu nalezené po inkubaci *rac*-sibutraminu s mikrosomy je uvedeno v tabulce 10. Záznam z chirální separace najímaných frakcí metabolitu M1 a nezreagovaného sibutraminu je ukázán na obrázku 7.

**Tabulka 10.** Zastoupení enantiomerů ( $\Delta_S$ ) metabolitu M1 a nezreagovaného sibutraminu nalezené po inkubaci *rac*-sibutraminu s mikrosomy. Hodnoty  $\Delta_S$  jsou uvedeny pro různé počáteční koncentrace *rac*-sibutraminu v inkubační směsi. Symbol *x* značí, že hodnota  $\Delta_S$  nebyla stanovena.

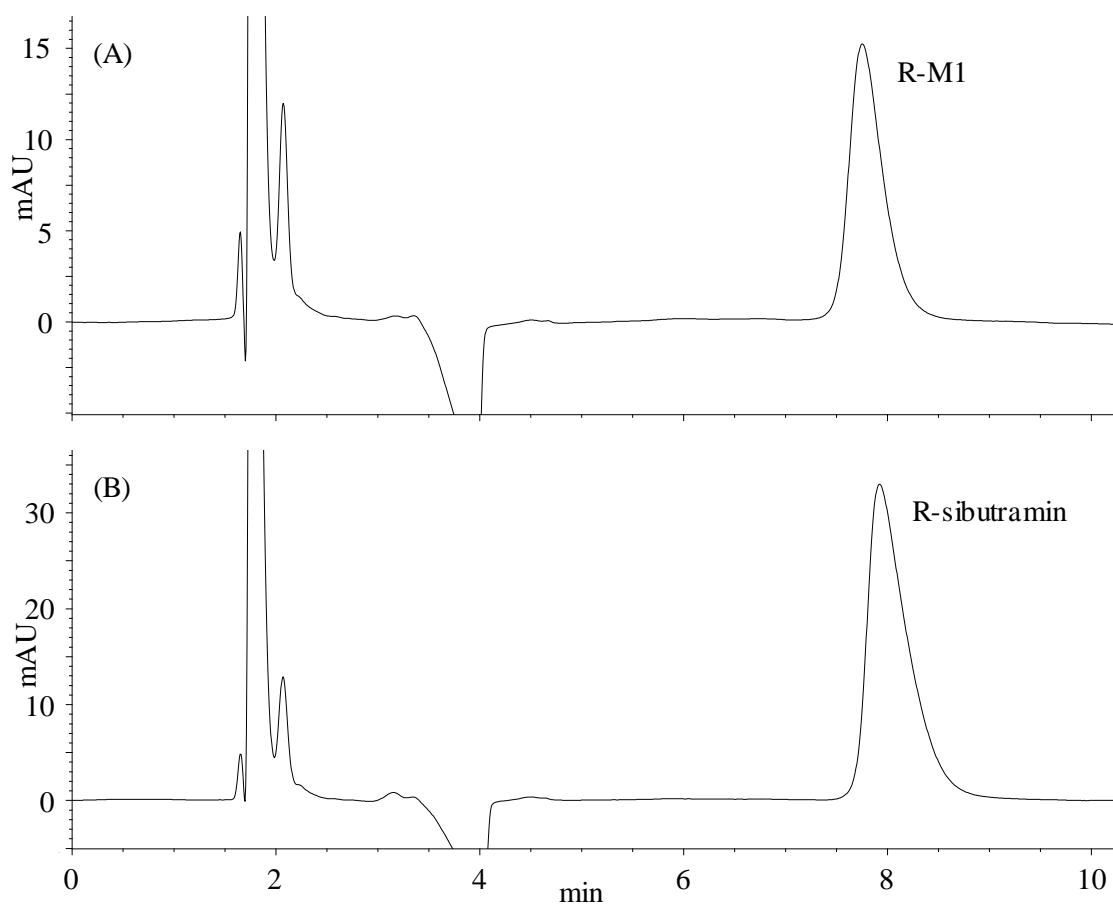
koncentrace <i>rac</i> -sibutraminu ( $\mu\text{M}$ )	10	20	50	100	200	300	500
$\Delta_S$ pro metabolit M1 (%)	55,2	57,6	61,1	66,0	68,0	68,4	69,4
$\Delta_S$ pro nezreagovaný sibutramin (%)	<i>x</i>	<i>x</i>	41,7	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	47,9

Inkubace *R*-sibutraminu vedla k tvorbě jediného enantiomeru metabolitu M1 a to *R*-M1. Chirální analýza nezreagovaného *R*-sibutraminu ukázala přítomnost pouze původního *R*-enantiomeru. Podobné výsledky byly nalezeny po inkubaci *S*-sibutraminu, kde *S*-M1 byl nalezen jako jediný enantiomer metabolitu M1 a také přeměna *S*-sibutraminu na *R*-sibutramin nebyla zjištěna. Chromatogramy z chirální separace najímaných frakcí metabolitu M1 a nezreagovaného sibutraminu po inkubaci *R*-sibutraminu a *S*-sibutraminu jsou uvedeny na obrázku 8 a 9.

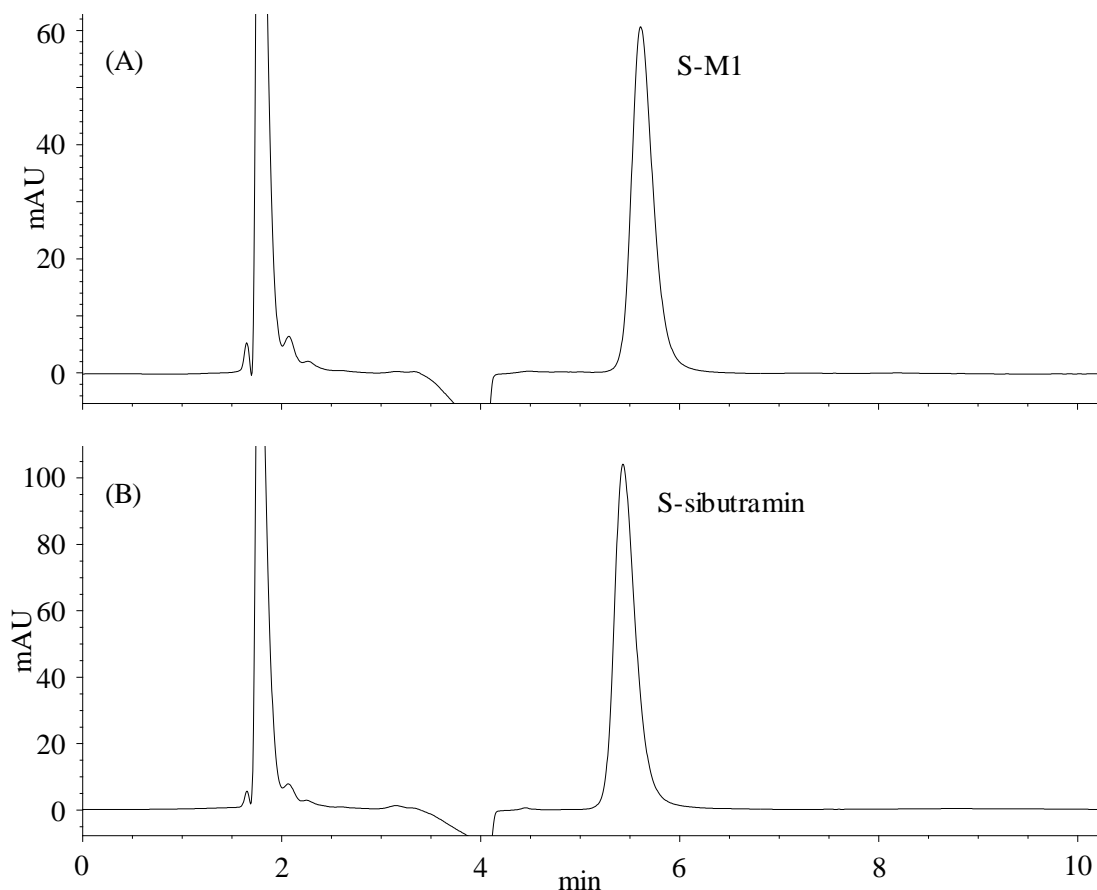


**Obrázek 7.** Chromatogram z chirální separace (A) najímané frakce M1, (B) najímané frakce nezreagovaného sibutraminu ze vzorku z inkubace *rac*-sibutraminu (50  $\mu$ M) s NADPH a mikrosomální frakcí.





**Obrázek 8.** Chromatogram z chirální separace (A) najímané frakce M1, (B) najímané frakce nezreagovaného sibutraminu ze vzorku z inkubace *R*-sibutraminu (50  $\mu$ M) s NADPH a mikrosomální frakcí.



**Obrázek 9.** Chromatogram z chirální separace (A) najímané frakce M1, (B) najímané frakce nezreagovaného sibutraminu ze vzorku z inkubace *S*-sibutraminu (50  $\mu$ M) s NADPH a mikrosomální frakcí.

### Analýza kinetických dat

Kinetické konstanty  $K_m$  a  $V_{max}$  (popř. zdánlivé kinetické konstanty) byly získány proložení experimentálně naměřených závislostí rychlosti vzniku metabolitu M1 na počáteční koncentraci substrátu rovnicí Michaelis-Mentenové:

$$v = V_{max} \times [S] / (K_m + [S]).$$

Všechny naměřené závislosti splňovaly tuto kinetickou rovnici. Význam zdánlivých kinetických konstant  $V_{max}'$  a  $K_m'$  pro tvorbu *R*-M1 a *S*-M1 z *rac*-sibutraminu a příslušné kinetické rovnice byly získány řešením schéma uvedeném na obrázku 10. Toto schéma bylo řešeno analogicky jako případ reakce dvou kompetujících substrátů (Laidler 1958). Naměřené závislosti rychlosti vzniku *R*-M1 a *S*-M1 na počáteční koncentraci *rac*-, *R*- nebo *S*-sibutraminu jsou znázorněny na obrázku 11 a 12. Vypočtené hodnoty kinetických konstant jsou uvedeny v tabulce 11.

Schéma:



kde R značí *R*-sibutramin, S značí *S*-sibutramin, E značí volný enzym, ER a ES značí enzym substrátový komplex, P<sub>1</sub> značí *R*-M1, P<sub>2</sub> značí *S*-M1

Rovnice:

$$A. \quad v(\text{rac-M1}) = V_{\max\text{Rac}} \times [\text{rac}] / (K_m' + [\text{rac}])$$

$$B. \quad v(\text{R-M1}) = V_{\max\text{R}'} \times [\text{rac}] / (K_m' + [\text{rac}])$$

$$C. \quad v(\text{S-M1}) = V_{\max\text{S}'} \times [\text{rac}] / (K_m' + [\text{rac}])$$

kde  $V_{\max\text{Rac}} = V_{\max\text{R}'} + V_{\max\text{S}'}$  a zdánlivé konstanty jsou:

$$V_{\max\text{R}'} = V_{\max\text{R}} \times K_{\text{mS}} / (K_{\text{mR}} + K_{\text{mS}}); \quad V_{\max\text{S}'} = V_{\max\text{S}} \times K_{\text{mR}} / (K_{\text{mR}} + K_{\text{mS}});$$

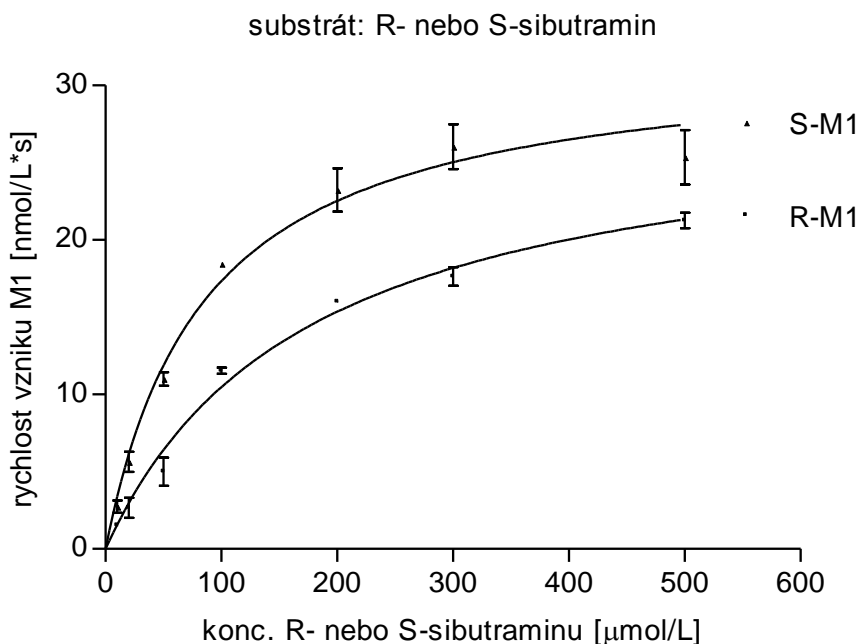
$$K_m' = 2 \times K_{\text{mR}} \times K_{\text{mS}} / (K_{\text{mR}} + K_{\text{mS}})$$

kde  $K_{\text{mR}}$  a  $K_{\text{mS}}$  jsou konstanty Michaelis-Mentové pro vznik *R*-M1 z *R*-sibutraminu a *S*-M1 z *S*-sibutraminu;  $V_{\max\text{R}}$  a  $V_{\max\text{S}}$  jsou maximální reakční rychlosti pro vznik *R*-M1 z *R*-sibutraminu a *S*-M1 z *S*-sibutraminu;  $[\text{rac}]$  je počáteční koncentrace *rac*-sibutraminu;  $v(\text{rac-M1}, \text{R-M1}$  nebo  $\text{S-M1})$  je počáteční rychlost reakce vzniku *rac*-M1, *R*-M1 nebo *S*-M1

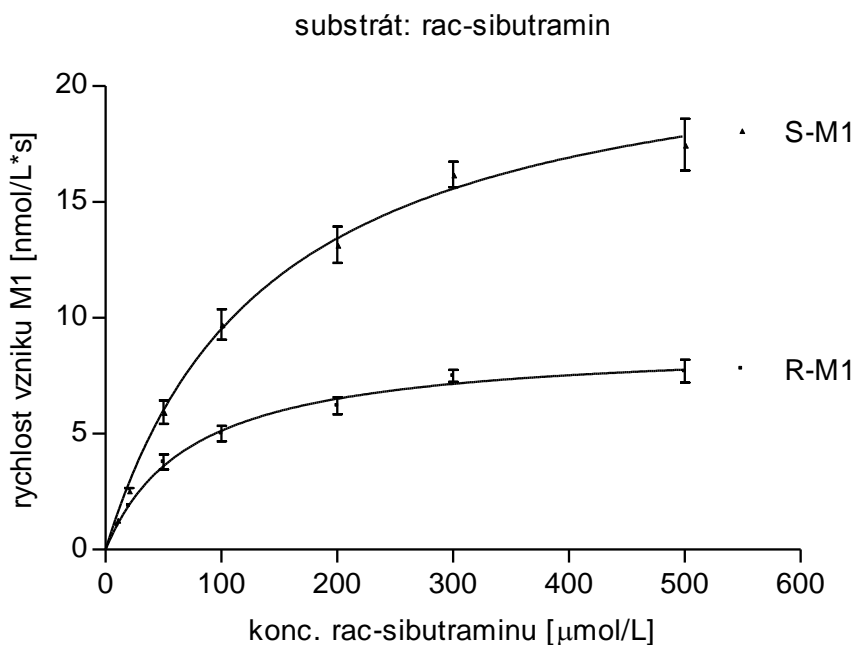
**Obrázek 10.** Kinetické schéma pro tvorbu *R*-M1 a *S*-M1 z *rac*-sibutraminu a výsledky jeho řešení.

**Tabulka 11.** Vypočtené konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$  a zdánlivé konstanty  $K_m'$  a  $V_{\max}'$  z naměřených závislostí rychlosti vzniku metabolitu M1 na počáteční koncentraci substrátu. <sup>a</sup>zdánlivá konstanta  $K_m'$ , <sup>b</sup>konstanta  $V_{\max\text{Rac}}$ , <sup>c</sup>zdánlivá konstanta  $V_{\max\text{R}'}$ , <sup>d</sup>zdánlivá konstanta  $V_{\max\text{S}'}$ .

substrát	metabolit	$K_m$ (μmol/L) vypočtená hodnota (95% interval spolehlivosti)	$V_{\max}$ (nmol/L×s) vypočtená hodnota (95% interval spolehlivosti)
<i>R</i> -sibutramin	<i>R</i> -M1	175,2 (137,0-213,4)	28,8 (26,2-31,4)
<i>S</i> -sibutramin	<i>S</i> -M1	85,6 (65,0-106,2)	32,2 (29,6-34,7)
<i>rac</i> -sibutramin	<i>rac</i> -M1	114,6 <sup>a</sup> (94,7-134,6)	31,4 <sup>b</sup> (29,5-33,4)
	<i>R</i> -M1	73,9 <sup>a</sup> (60,4-87,5)	8,9 <sup>c</sup> (8,4-9,4)
	<i>S</i> -M1	140,3 <sup>a</sup> (115,5-165,1)	22,9 <sup>d</sup> (21,3-24,4)



**Obrázek 11.** Porovnání závislostí rychlosti vzniku *R*-M1 na počáteční koncentraci *R*-sibutraminu v inkubačním roztoku a rychlosti vzniku *S*-M1 na počáteční koncentraci *S*-sibutraminu. Experimentálně naměřené rychlosti vzniku M1 jsou uvedeny jako průměrné hodnoty (body) a standardní odchylky (úsečky). Experimentální hodnoty byly proloženy rovnicí Michaelis-Mentenové (plná čára).



**Obrázek 12.** Současný vznik *R*-M1 a *S*-M1 po inkubaci *rac*-sibutraminu s mikrosomální frakcí. Rychlost vzniku *R*-M1 a *S*-M1 je vyjádřena v závislosti na počáteční koncentraci *rac*-sibutraminu v inkubačním roztoku. Experimentálně naměřené rychlosti tvorby M1 jsou uvedeny jako průměrné hodnoty (body) a standardní odchylky (úsečky). Experimentální hodnoty byly proloženy rovnicí Michaelis-Mentenové (plná čára).

### 4.2.3. Diskuse

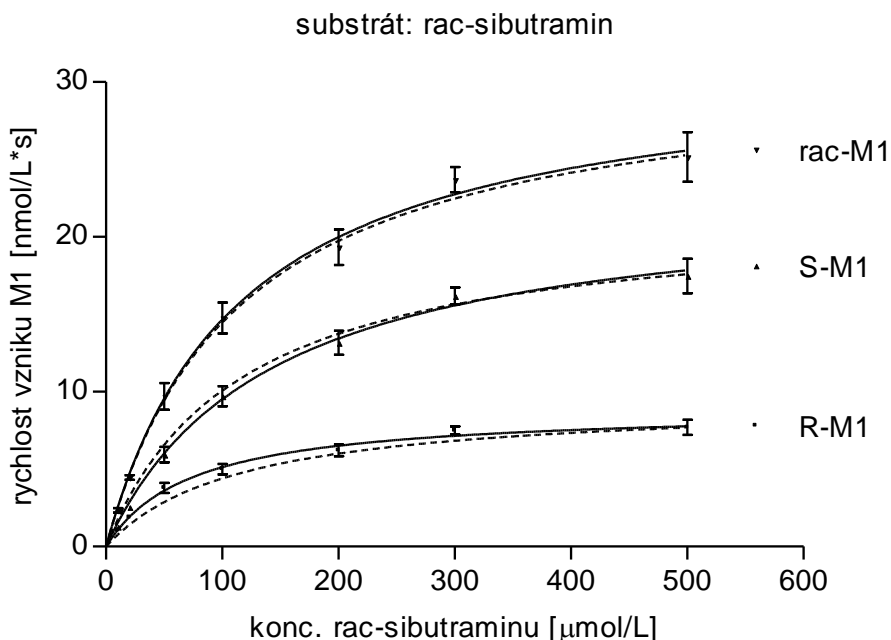
Metabolismus sibutraminu na chirální úrovni byl studován v mikrosomální frakci lidské jaterní tkáně. Byla vyvinuta analytická metoda, která zahrnovala krok achirální separace před vlastním chirálním stanovením analytů. Tato metoda byla použita pro chirální stanovení metabolitu M1 a sibutraminu ve studovaných vzorcích. Zahrnutí kroku achirální separace bylo zapříčiněno koelucí (částečnou nebo úplnou) enantiomerů jednotlivých analytů a vzájemnou interferencí signálů z UV detektoru při jejich analýze ve směsi. Jelikož chromatografické podmínky chirální analýzy (tabulka 7) umožňovaly separaci enantiomerů všech analytů, tj. *rac*-sibutraminu, *rac*-M1 a *rac*-M2 (tabulka 8), použití selektivního hmotnostního detektoru na místo UV detektoru by umožnilo detekci všech analytů v jedné analýze, což by významně snížilo celkovou dobu analýzy (přibližně 5x) a manipulaci se vzorkem. S rozvojem ionizačních technik za atmosférického tlaku se v současné době používá hmotnostní detekce ve spojení s enantioselektivní kapalinovou chromatografií zcela rutinně (Bakhtiar *et al.* 2001, Desai and Armstrong 2004).

Chirální analýza vzorků z inkubace čistých enantiomerů sibutraminu s mikrosomální frakcí ukázala, že během N-demethylace sibutraminu na metabolit M1 je zachována konfigurace na chirálním uhlíku a že nedochází k chirální konverzi *R*-sibutraminu na *S*-sibutramin ani opačným směrem. Zachování stereospecifity biotransformace sibutraminu na jeho farmakologicky aktivní metabolit M1 a nepřítomnost chirální konverze enantiomerů sibutraminu jsou důležité experimentální poznatky, na jejichž základě je z metabolického pohledu možné uvažovat o náhradě *rac*-sibutraminu za *R*-sibutramin jako efektivnější a bezpečnější formy sibutraminu.

Uvedené výsledky také ukázaly, že je biotransformace sibutraminu v mikrosomální frakci stereoselektivní. Když byl použit *rac*-sibutramin jako substrát, byla rychlost vzniku *S*-M1 větší než *R*-M1. Rychlost biotransformace *S*-sibutraminu byla tedy větší než *R*-sibutraminu. Obdobně byla rychlost vzniku *S*-M1 z *S*-sibutraminu větší než rychlost vzniku *R*-M1 z *R*-sibutraminu. Vypočtená konstanta  $V_{max}$  reakce *S*-sibutraminu na *S*-M1 ( $V_{maxS}$ ) byla stejná jako konstanta reakce *R*-sibutraminu na *R*-M1 ( $V_{maxR}$ ), ale konstanta  $K_m$  reakce *S*-sibutraminu na *S*-M1 ( $K_{mS}$ ) byla přibližně dvakrát menší než pro reakci *R*-sibutraminu na *R*-M1 ( $K_{mR}$ ). Vyšší afinita enzymu

metabolizujícího N-demethylaci sibutraminu k jeho S-enantiomeru je příčinou vyšší rychlosti biotransformace S-sibutraminu na S-M1.

Za předpokladu, že kinetické chování (kinetické parametry) racemické směsi je kombinací kinetického chování (kinetických parametrů) jednotlivých enantiomerů, by mělo být možné určit průběh reakce racemické směsi ze znalosti průběhu reakcí jednotlivých enantiomerů. Řešením kinetického schéma (obrázek 10), popisujícího biotransformaci *rac*-sibutraminu na *R*-M1 a *S*-M1, byla získána rovnice A (obrázek 10) vyjadřující závislost počáteční rychlosti vzniku *rac*-M1 na počáteční koncentraci *rac*-sibutraminu a kinetických konstantách obou enantiomerů sibutraminu. Dosazením experimentálně získaných (tabulka 11) kinetických konstant  $K_{mR}$ ,  $K_{mS}$ ,  $V_{maxR}$  a  $V_{maxS}$ , charakterizujících průběh reakce jednotlivých enantiomerů sibutraminu, do rovnice A byly vypočteny hodnoty  $V_{maxRac} = 31,08 \text{ nmol/L}\times\text{s}$  a  $K_m' = 115,0 \text{ }\mu\text{mol/L}$ . Takto vypočtené kinetické konstanty tvorby *rac*-M1 z *rac*-sibutraminu jsou ve velmi dobré shodě s těmi, které byly získány experimentálně (tabulka 11) a potvrzují platnost navrhnutého kinetického schématu. Porovnání průběhu reakce tvorby *rac*-M1 z *rac*-sibutraminu získaného výpočtem z rovnice A s experimentálně naměřenými hodnotami je znázorněno na obrázku 13.



**Obrázek 13.** Porovnání rychlostí tvorby *rac*-M1, *R*-M1 a *S*-M1 z *rac*-sibutraminu vypočtených z rovnice A, rovnice B a rovnice C (čárkované křivky) s experimentálně naměřenými rychlostmi tvorby M1 (průměrné hodnoty, standardní odchylky). Plné křivky byly získány proložení experimentálních hodnot rovnicí Michaelis-Mentenové.

Řešení kinetického schématu (obrázek 10) umožnilo také porozumění a správnou interpretaci kinetických konstant pro vznik *R*-M1 a *S*-M1 z *rac*-sibutraminu. Jeho řešením byly získány rovnice popisující závislost počáteční rychlosti vzniku *R*-M1 (rovnice B) a *S*-M1 (rovnice C) na počáteční koncentraci *rac*-sibutraminu a kinetických konstantách obou enantiomerů sibutraminu. Kinetické konstanty  $V_{maxR}'$  a  $V_{maxS}'$  byly vypočteny dosazením experimentálně získaných (tabulka 11) kinetických konstant  $K_{mR}$ ,  $K_{mS}$ ,  $V_{maxR}$  a  $V_{maxS}$  do jednotlivých vztahů a nabývaly hodnot  $V_{maxR}' = 9,45 \text{ nmol/L} \times \text{s}$  a  $V_{maxS}' = 21,63 \text{ nmol/L} \times \text{s}$ . Kinetická konstanta ve jmenovateli rovnice B a rovnice C byla stejná jako v rovnici A a nabývala hodnoty  $K_m' = 115,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ . Vypočtené zdánlivé maximální rychlosti tvorby *R*-M1 ( $V_{maxR}'$ ) a tvorby *S*-M1 ( $V_{maxS}'$ ) se dobře shodují s těmi, které byly získány experimentálně (tabulka 11). Takovéto shody mezi vypočtenou a experimentálně stanovenou konstantou nebylo ale dosaženo pro  $K_m'$ . Tuto neshodu lze snadněji vysvětlit pomocí grafického porovnání průběhů reakcí získaných výpočtem z rovnice B (*R*-M1 z *rac*-sibutraminu) a z rovnice C (*S*-M1 z *rac*-sibutraminu) s experimentálně naměřenými hodnotami (obrázek 13). Z obrázku 13 je vidět, že v oblasti nízkých koncentrací substrátu (přibližně do  $200 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ) dochází k největšímu odchýlení vypočtených průběhů od experimentálně naměřených závislostí. V oblasti nízkých koncentrací substrátu dochází k největší relativní tvorbě produktů a tím k podstatnému úbytku substrátu, což ve výsledku ovlivňuje reakční rychlost tvorby daného produktu. Jelikož je rychlost biotransformace *S*-sibutraminu větší než *R*-sibutraminu, dochází rychleji k „vyčerpávání“ substrátu (*S*-sibutraminu), snížení koncentrace enzym-substrátového komplexu (ES) a následnému snížení reakční rychlosti tvorby *S*-M1. V důsledku tohoto děje dochází ke zvýšení koncentrace enzym-substrátového komplexu (ER) a zvýšení reakční rychlosti tvorby *R*-M1. Podle této představy by v oblasti nízkých koncentrací substrátu měla být experimentálně nalezená rychlost tvorby *S*-M1 nižší než vypočtená z rovnice B, kdežto experimentálně nalezená rychlost tvorby *R*-M1 by měla být vyšší než vypočtená z rovnice C. Tento závěr je v souladu s experimentálně nalezenými rychlostmi reakcí (obrázek 13). V oblasti velmi nízkých koncentrací substrátu mohou být naměřené reakční rychlosti obou produktů rovněž zatíženy chybou, vyplývající z následné biotransformace metabolitu M1 na metabolit M2. V důsledku výše popsaných dějů dochází k odlišnému zakřivení, na kterém je závislá hodnota  $K_m'$ , naměřených a vypočtených rychlostí tvorby *R*-M1 a *S*-M1 z *rac*-sibutraminu.

## 4.3. Metabolický profil sibutraminu v lidské moči

### 4.3.1. Experimentální část

#### Odběr vzorků moči

Tableta obsahující 10 mg sibutraminu hydrochloridu (Meridia; Abbott GmbH and Co. KG, Ludwigshafen, Německo) byla jednorázově podána zdravému dobrovolníkovi (28 let, žena), který byl plně informován o průběhu studie a souhlasil s účastí v této studii. Vzorky moči byly odebírány v různých časových intervalech v průběhu prvních 12 h po podání tablety. Průměrný vzorek moči byl připraven smícháním stejných objemů moči z jednotlivých odběrů. Poslední vzorek moči byl odebrán 24 h po podání tablety. Vzorek moči (0 h), který sloužil jako kontrolní vzorek, byl odebrán před zahájením studie. Vzorky byly zamrazeny a uchovány v mrazícím boxu při -20 °C před dalším zpracováním.

#### Zpracování vzorků

Vzorky moči byly odsoleny a zakoncentrovány pomocí extrakce na pevnou fázi na kolonkách Oasis HLB (30 mg sorbetu, Waters, Dublin, Irsko). Vzorky moči (1,1 mL) byly okyseleny na pH 3,0 přidávkem 50 µL kyseliny octové a centrifugovány při 3500 g po dobu 7 min. Extrakce na pevnou byla provedena následovně: 1 mL methanolu, 1 mL vody s 0,1% kyselinou octovou (v/v), 1 mL supernatantu, 1 mL roztoku 5% methanolu / 95% vody obsahující 0,1% kyselinu octovou (v/v) a 1 mL methanolu. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na vodní lázni při 40 °C. Odparek byl uchován v lednici při 7 °C (nejdéle po dva dny), rozpuštěn ve 100 µL mobilní fáze (počáteční složení mobilní fáze) a analyzován.

#### Ethanolýza vzorků moči

Ethanolýza vzorků moči byla provedena podle postupu popsánoho v práci autorů Schaefer se sp. (1992) a Liu se sp. (2001). Roztok ethoxidu sodného (1,0 M) byl připraven rozpuštěním 115 mg kovového sodíku v 5 mL ethanolu. Vzorek moči byl nejprve upraven způsobem popsáním v odstavci zpracování vzorků. Odparek byl



rozpuštěn ve 180  $\mu\text{L}$  ethanolu a bylo přidáno 20  $\mu\text{L}$  roztoku ethoxidu sodného. Reakční směs byla ponechána 3 h při pokojové teplotě a poté byla odpařena do sucha pod proudem argonu. Odparek byl uchován přes noc v lednici při 7 °C a rozpuštěn ve 100  $\mu\text{L}$  směsi 20% methanolu / 80% vody (v/v) před LC/MS analýzou.

### Syntéza standardů ethylkarbamátů metabolitů M1, M2 a M2-OH

Reakce byla provedena podle postupu popsaného v práci autorů Liu se sp. (2001). Navážka přibližně 2 mg standardu M1 nebo M2 (oba hydrochloridy) byla rozpuštěna v 200  $\mu\text{L}$  pyridinu a bylo přidáno 10  $\mu\text{L}$  roztoku ethylchloroformiátu. Reakční směs byla ponechána 80 min na ledu, poté bylo přidáno 300  $\mu\text{L}$  vody a následovala extrakce do ethylacetátu (2x 500  $\mu\text{L}$ ). Ethylacetátové extrakty (vrchní fáze) byly spojeny a odpařeny do sucha pod proudem argonu. Odparky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{L}$  methanolu. Tento roztok byl naředěn (100x) směsí 20% methanolu / 80% vody obsahující 0,1% kyselinu mravenčí (v/v) před LC/MS analýzou. Syntéza ethylkarbamátu metabolitu M2-OH byla provedena stejným způsobem jako ethylkarbamátu metabolitu M1 a M2 vyjma toho, že pouze 1  $\mu\text{L}$  ethylchloroformiátu byl přidán do reakce. Tato obměna byla učiněna kvůli reaktivitě ethylchloroformiátu s aminovou i hydroxylovou skupinou metabolitu M2-OH.

### LC/MS

#### *Systém 1 (použit pro hledání neznámých metabolitů)*

Podmínky kapalinové chromatografie, podmínky ionizace a základní parametry iontové optiky jsou uvedeny v tabulce 12. Roztoky analytů o koncentraci 0,4  $\mu\text{g/mL}$  (roztok 50% methanolu / 50% voda obsahující 0,1% kyselinu mravenčí, v/v) byly zavedeny do iontového zdroje pomocí stříkačky a byla naměřena hmotnostní spektra (MS a MS/MS) standardů. Parametry iontové optiky byly optimalizovány pro standard sibutraminu a použity v LC/MS metodách. K potvrzení identity nalezených minoritních metabolitů M1 a M2 v moči byl použit selektivní záznam více reakcí (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Poměry hmoty/náboj (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ) iontových reakcí byly  $m/z$  266  $\rightarrow$  125, 139, 179 pro metabolit M1 a  $m/z$  252  $\rightarrow$  125, 139, 179 pro metabolit M2. Sběr a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru Analyst (verze 1.3.1, Applied Biosystems).

**Tabulka 12.** LC/MS podmínky použité pro hledání neznámých metabolitů sibutraminu v moči.

<b>Chromatografie</b>	
chromatograf	HP 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
kolona	XTerra MS C <sub>18</sub> 2,1×100 mm, 3,5 μm
předkolona	XTerra MS C <sub>18</sub> 2,1×10 mm, 3,5 μm
mobilní fáze	A: 5% methanol / 95% 10 mM octan amonný pH 5,0 (v/v) B: 100% methanol
gradient	0 min 15% B, 9 min 90% B, 12 min 90% B, 17 min 15% B, 29 min 15% B
průtok a teplota	200 μL/min, 25 °C mobilní fáze byla rozdělena za kolonou a 20 μL/min bylo přivedeno do iontového zdroje
<b>Hmotnostní spektrometrie</b>	
hmot. spektr.	trojitý kvadrupól (API 3000, Applied Biosystems, Toronto, Kanada)
iontový zdroj	elektrosprej (TurboIonspray)
nastavení zdroje a iontová optika *	nebulizer gas 15 jednotek (stlačený vzduch), curtain gas 14 jednotek (N <sub>2</sub> ), collision gas (N <sub>2</sub> ), ionspray voltage +5,0 kV, declustering potential 25 V, focusing potential 185 V, entrance potential 6 V

**Tabulka 13.** LC/MS podmínky použité pro vícenásobnou MS/MS metabolitů sibutraminu.

<b>Chromatografie</b>	
chromatograf	Surveyor MS pump, Surveyor autosampler (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)
kolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub> 2,1×50 mm, 3,5 μm
předkolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> 2,1×12,5 mm, 5 μm
mobilní fáze	A: 5% methanol / 95% 10 mM octan amonný pH 5,0 (v/v) B: 100% methanol
gradient	0 min 15% B, 12 min 90% B, 14 min 90% B, 16 min 15% B, 26 min 15% B
průtok a teplota	200 μL/min, 30 °C
<b>Hmotnostní spektrometrie</b>	
hmot. spektr.	iontová past (LCQ Advantage, ThermoFinnigan)
iontový zdroj	elektrosprej (ESI)
nastavení zdroje a iontová optika *	sheath gas 30 jednotek (N <sub>2</sub> ), auxiliary gas 5 jednotek (N <sub>2</sub> ), damping and collision gas (He), source voltage +4,5 kV, capillary voltage 6 V, tube lens offset -15 V, capillary temperature 200 °C

### *System 2 (použitý pro vícenásobnou MS/MS)*

Podmínky kapalinové chromatografie, podmínky ionizace a základní parametry iontové optiky jsou uvedeny v tabulce 13. Sběr a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru Xcalibur (verze 1.2, ThermoFinnigan).

### *System 3 (analýza vzorků moči po ethanolýze a vzorků ze syntézy ethylkarbamátů)*

Podmínky kapalinové chromatografie, podmínky ionizace a základní parametry iontové optiky jsou uvedeny v tabulce 14.

**Tabulka 14.** LC/MS podmínky použité pro analýzu vzorků moči po ethanolýze a vzorků ze syntézy ethylkarbamátů.

<b>Chromatografie</b>	
chromatograf	Surveyor MS pump, Surveyor autosampler (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)
kolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub> 2,1×50 mm, 3,5 μm
předkolona	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> 2,1×12,5 mm, 5 μm
mobilní fáze	A: 5% methanol / 95% voda obsahující 0,1% kyselinu mravenčí (v/v) B: 100% methanol obsahující 0,1% kyselinu mravenčí (v/v)
gradient	0 min 15% B, 7 min 90% B, 13 min 90% B, 15 min 15% B, 25 min 15% B
průtok a teplota	200 μL/min, 30 °C mobilní fáze byla odkloněna do odpadu prvních 3,5 min analýzy
<b>Hmotnostní spektrometrie</b>	
hmot. spektr.	iontová past (LCQ Advantage, ThermoFinnigan)
iontový zdroj	chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
nastavení zdroje a iontová optika *	sheath gas 60 jednotek (N <sub>2</sub> ), damping and collision gas (He), pozitivní mód, discharge current 4,5 μA, vaporizer temperature 300 °C, capillary voltage 11 V, tube lens offset 30 V, capillary temperature 170 °C

### Přístup ke hledání neznámých metabolitů

K detekci metabolitů sibutraminu v moči byly využity různé skenovací módy (plný sken, sken prekurzorových iontů a sken neutrální ztráty) trojitého kvadrupólu. Sken prekurzorových iontů byl proveden ve dvou individuálních experimentech. První série iontů,  $m/z$  125, 139 a 179, byla vybrána z MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) spekter standardů sibutraminu, M1 a M2. Druhá série iontů,  $m/z$  177, 191 a 233, byla vybrána z MS/MS spektra standardu M2-OH. Sken neutrální ztráty 176

a 80 amu (atomic mass units) byl proveden pro selektivnější detekci konjugátů s kyselinou glukuronovou (176 amu) a sulfátem (80 amu). Kvůli přítomnosti  $\text{NH}_4^+$  iontů v mobilní fázi byl proveden sken neutrální ztráty amonových aduktů ( $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ ) glukuronidů (193 amu) a sulfátů (97 amu).

### 4.3.2. Výsledky a diskuse

#### Fragmentační chování standardních sloučenin

Hmotnostní spektra byla změřena pro standardní roztoky sibutraminu a jeho tři metabolitů. Protonované molekuly  $[\text{M}+\text{H}]^+$  sibutraminu byly pozorovány při  $m/z$  280, metabolitu M1 při  $m/z$  266, metabolitu M2 při  $m/z$  252 a metabolitu M2-OH při  $m/z$  268. MS/MS spektra  $[\text{M}+\text{H}]^+$  iontů sibutraminu, M1 a M2 ukázala stejné produktové ionty při  $m/z$  235, 179, 153, 139, 125 a 109 (tabulka 15). Protonované molekuly sibutraminu, M1 a M2 ztrácejí své  $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{NH}_2\text{CH}_3$  a  $\text{NH}_3$  části za vzniku společného iontu  $m/z$  235 (Ding *et al.* 2003). Protonované molekuly M2-OH fragmentovaly za vzniku produktových iontů o  $m/z$  233, 191, 177, 165, 163, 151 a 139 (tabulka 15). Ztrátou  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{NH}_3$  a její kombinací se ztrátou zbytků  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$  nebo  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)_2$  vznikaly produktové ionty o  $m/z$  233 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3]^+$ ),  $m/z$  191 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3-\text{CH}_2=\text{CHCH}_3]^+$ ) a  $m/z$  177 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3-\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)_2]^+$ ).

**Tabulka 15.** Retenční časy, prekurzorové ionty a spektrum produktových iontů ( $\text{MS}^2$ , iontová past) standardních sloučenin. Retenční časy ( $t_R$ ) se vztahují k chromatografickému systému 2.

Standard	$t_R$ (min)	$m/z$	$m/z$ (relativní zastoupení) produktových iontů
sibutramin	13,3	280	109(3), 125(11), 139(100), 153(61), 179(9), 235(3)
M1	11,6	266	109(3), 125(13), 139(100), 153(67), 179(11), 235(4)
M2	11,9	252	109(3), 125(5), 139(100), 153(67), 179(10), 235(13)
M2-OH	9,9	268	139(3), 151(23), 163(9), 165(17), 177(95), 191(42), 233(100)

#### Hledání metabolitů

Data naměřená v plném skenu byla vyhodnocena pomocí softwaru Metabolite ID (verze 1.3, Applied Biosystems/MDS Sciex). Vzorky moči 12 h a 24 h byly porovnány proti 0 h vzorku moči (kontrola). Při detekci metabolitů z LC/MS analýz bylo využito charakteristické izotopické zastoupení vyplývající z přítomnosti atomu chloru v molekule sibutraminu (nebo jeho metabolitů). Ze záznamů naměřených skenem

prekurzorových iontů a skenem neutrální ztráty bylo hledání metabolitů provedeno manuálně. Na základě běžných biotransformačních změn byly vypočteny poměry  $m/z$  předpokládaných metabolitů. Mezi zahrnuté biotransformační reakce I. fáze patřila (di-)demethylace, (di-)hydroxylace, oxidace methylu na aldehyd a karboxylovou kyselinu, oxidace methylenů na keton a jejich kombinace. Ze všech možných reakcí II. fáze biotransformace byla vybrána konjugace s kyselinou glukuronovou a sulfátem.

Retenční časy a hodnoty  $m/z$  pro šest metabolitů sibutraminu (M1-M6) nalezených ve 12 h vzorku moči jsou uvedeny v tabulce 16. Ve všech případech, vyjma skenu prekurzorů iontu  $m/z$  233, nebyly signály metabolitů příliš intenzivní v záznamech celkového iontového chromatogramu (total ion chromatogram) a byly detekovány pouze z extrahovaných iontových chromatogramů (extracted ion chromatogram). Metabolit M1 a M2 byly detekovány skenem prekurzorů iontů  $m/z$  125 a 139 v retenčních časech 13,9 a 14,1 min. Nízká intenzita chromatografických píků a vysoký šum pozadí zabránily jejich spolehlivému určení z dat naměřených plným skenem. Ve srovnání s parentní látkou, hmotnostní rozdíl -14 amu u metabolitu M1 a -28 amu u metabolitu M2 ukazují na přítomnost dvou demethylačních kroků v metabolismu sibutraminu. Metabolity M3-M6 byly detekovány ve všech typech skenů. Tyto metabolity byly nalezeny hlavně jako  $[M+NH_4]^+$  adukty a jejich protonované molekuly  $[M+H]^+$  byly detekovány při nižších intenzitách signálu. Signály nalezené ve skenech neutrální ztráty 176 a/nebo 193 amu naznačily, že metabolity M3-M6 jsou pravděpodobně konjugáty s kyselinou glukuronovou.

Ačkoliv byla analytická metoda pouze kvalitativní, porovnání extrahovaných iontových chromatogramů jednotlivých  $[M+NH_4]^+$  aduktů ukázalo, že pořadí intenzit metabolitů bylo  $M6 \gg M5 > M4, M3$ . Hlavními metabolity v moči byly tedy M6 a M5. V 24 h vzorku moči byly nalezeny stejné metabolity jako v 12 h vzorku moči, vyjma metabolitu M4. Nezmetabolizovaný sibutramin, jiné metabolity I. fáze biotransformace než M1 a M2 nebo konjugáty se sulfátem nebyly ve vzorcích nalezeny.

**Tabulka 16.** Metabolity nalezené pomocí plného skenu, skenu prekurzorových iontů a skenu neutrální ztráty v 12 h vzorku moči. Poměry  $m/z$  se vztahují buď k protonovaným molekulám  $[M+H]^+$  a amonným aduktům  $[M+NH_4]^+$  (v závorce) nebo k produktovým iontům vybraným pro prekurzorový iontový sken. Metabolity byly separovány pomocí chromatografického systému 1, ve kterém nebylo dosaženo separace isomerů jednotlivých metabolitů. Symboly +, - a  $x$  značí, že metabolit byl detekován, nedetekován nebo jeho signál nebyl v daném typu skenu očekáván.

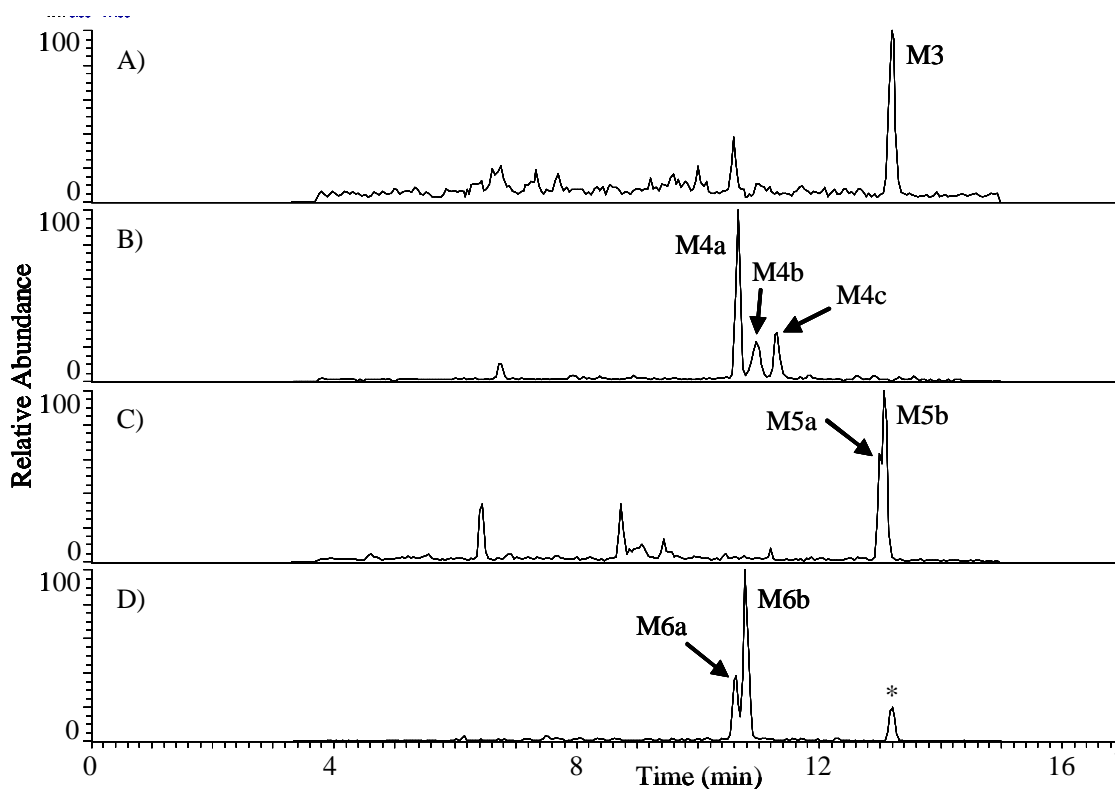
Metabolit	Poměr $m/z$ $[M+H]^+$ ( $[M+NH_4]^+$ )	$t_R$ (min)	Sken prekurzorových iontů $m/z$ vybraného produktového iontu						Sken neutrální ztráty		Plný sken
			Experiment 1			Experiment 2			Experiment 1	Experiment 2	
			125	139	179	177	191	233	NL 176	NL 193	
M1	266	13,9	+	+	-	-	-	-	$x$	$x$	-
M2	252	14,1	-	+	-	-	-	-	$x$	$x$	-
M3	486 (503)	15,0	-	+	(+)	-	-	-	+	(+)	(+)
M4	502 (519)	13,5	-	-	-	(+)	(+)	+	(+)	(+)	-
M5	472 (489)	14,9	+	(+)	+	(+)	-	-	-	(+)	(+)
M6	488 (505)	13,6	(+)	(+)	-	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)

**Tabulka 17.** MS<sup>n</sup> spektra a retenční časy nalezených metabolitů sibutraminu. Retenční časy se vztahují k chromatografickému systému 2.

Metabolit Ret. čas	Isolované <i>m/z</i> typ MS <sup>n</sup>	<i>m/z</i> (relativní zastoupení) produktových iontů
M3 13,2 min	503 MS <sup>2</sup> 486 MS <sup>3</sup> 310 MS <sup>4</sup>	486(100), 487(9) 310(100), 311(10) 125(17), 139(100), 144(5), 153(61), 179(17), 235(21), 254(8)
M4a 10,7 min	519 MS <sup>2</sup> 502 MS <sup>3</sup> 326 MS <sup>4</sup> 282 MS <sup>5</sup>	326(7), 502(100), 503(11) 282(11), 326(100), 327(8), 458(18) 177(6), 233(24), 282(100), 283(7) 151(27), 163(11), 165(13), 177(100), 191(44), 233(39)
M4b 11,0 min	519 MS <sup>2</sup> 502 MS <sup>3</sup> 326 MS <sup>4</sup>	326(5), 502(100), 503(8) 308(6), 326(100), 327(5), 458(9), 484(15) 177(56), 233(100), 251(22), 264(11), 282(17), 308(20)
M4c 11,3 min	519 MS <sup>2</sup> 502 MS <sup>3</sup> 326 MS <sup>4</sup> 282 MS <sup>5</sup>	326(11), 502(100), 503(9) 326(100), 327(5), 484(24) 233(100), 282(62) 151(16), 177(100), 191(15), 233(7)
M5a, M5b 13,1 min	489 MS <sup>2</sup> 472 MS <sup>3</sup> 296 MS <sup>4</sup>	296(18), 472(100), 473(13) 296(100), 297(12), 436(5) 109(6), 125(6), 139(100), 153(53), 179(11), 235(7)
M6a 10,6 min	505 MS <sup>2</sup> 488 MS <sup>3</sup> 312 MS <sup>3</sup> 268 MS <sup>4</sup>	312(64), 313(8), 488(100), 489(17) 312(100), 313(7), 444(13), 470(5) 233(8), 268(100) 151(15), 163(8), 165(10), 177(100), 191(41), 233(40)
M6b 10,8 min	505 MS <sup>2</sup> 488 MS <sup>3</sup> 312 MS <sup>3</sup>	312(100), 313(12), 470(11), 488(99), 489(17) 312(100), 313(8), 444(61), 445(8), 470(90), 471(11) 177(22), 233(68), 250(64), 251(23), 268(100), 294(42)

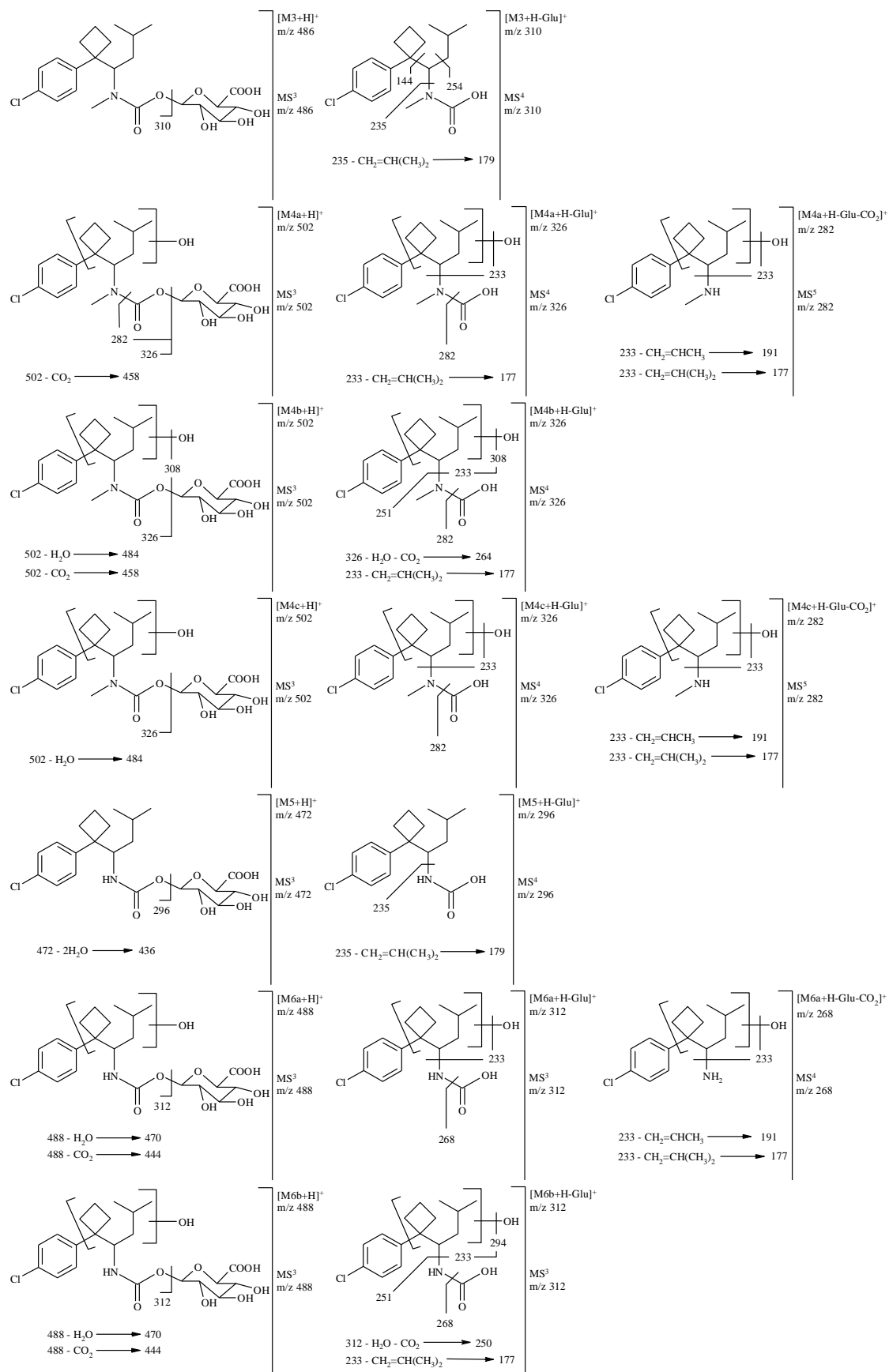
## Identifikace metabolitů

Určení struktury neznámých metabolitů v moči bylo založeno na vícenásobné tandemové hmotnostně spektrometrické analýze ( $MS^n$  analýze) a na porovnání  $MS^n$  spekter standardů a detekovaných sloučenin. Použití chromatografického systému 2 zlepšilo separaci metabolitů a isomery metabolitů M4 a M6 byly částečně rozlišeny (obrázek 14). Poměry  $m/z$  produktových iontů metabolitů sibutraminu naměřených při různých  $MS^n$  experimentech jsou uvedeny v tabulce 17. Navržené struktury a fragmentační chování metabolitů sibutraminu je znázorněno na obrázku 15.



**Obrázek 14.** Záznam ze separace (*systém 2*) metabolitů sibutraminu nalezených ve 12 h vzorku moči. Stopy TIC (Total Ion Current) byly získány při snímání spekter produktových iontů ( $MS^3$ ) jednotlivých metabolitů. Poměry  $m/z$  izolovaných a kolidovaných iontů byly A) 503 a 486 pro M3, B) 519 a 502 pro M4, C) 489 a 472 pro M5 a D) 505 a 488 pro M6. Pík na spodním chromatogramu označený hvězdičkou pochází ze signálu isotopu  $^{37}Cl$  metabolitu M3. Ostatní píky pozorované při nízkých intenzitách pocházejí z endogenních sloučenin obsažených ve vzorku moči.





**Obrázek 15.** Navržené struktury metabolitů sibutraminu nalezených v lidské moči a jejich fragmentace v LC-ESI/MS/MS experimentech.

### *Metabolity M1 a M2*

Metabolity M1 a M2, detekované v moči v nízkých koncentracích, byly určeny jako demethylsibutramin (M1) a didemethylsibutramin (M2). Identita metabolitů M1 a M2 byla potvrzena porovnáním MRM analýzy vzorku moči s analýzou standardních roztoků metabolitů M1 a M2.

### *Metabolit M3*

Metabolit M3 (molekulová hmotnost 485 g/mol) byl určen jako karbamoylglukuronid demethylsibutraminu. Amonný adukt metabolitu ( $[M+NH_4]^+$ ) o  $m/z$  503 fragmentoval při  $MS^2$  experimentu na produktový iont  $m/z$  486 ( $[M+H]^+$ ), který fragmentoval při  $MS^3$  experimentu na produktový iont  $m/z$  310 ( $[M+H-Glu]^+$ ). Následná izolace a kolizně indukovaná disociace iontu  $m/z$  310 ( $MS^4$ ) dala vzniknout iontům  $m/z$  235, 179, 153, 139 a 125, které jsou charakteristické pro spektra produktových iontů standardů sibutraminu, M1 a M2. Toto naznačovalo, že k metabolické modifikaci nedošlo na uhlovodíkovém skeletu ani aromatickém kruhu sibutraminu. Vedle toho poskytl iont  $m/z$  310 méně abundantní produktové ionty  $m/z$  254 ( $[M+H-Glu-CH_2=C(CH_3)_2]^+$ ) a  $m/z$  144 ( $[(CH_3)_2CHCH_2CH=N(CH_3)COOH]^+$ ) v  $MS^4$  experimentu. Poměr  $m/z$  protonované molekuly aglykonu metabolitu M3 ( $m/z$  310) je o 44 amu větší než metabolitu M1 ( $m/z$  266). Domníváme se, že  $CO_2$  je navázán na atom dusíku metabolitu M1 a utváří se karbamová kyselina, která je konjugována s kyselinou glukuronovou.

Ethylkarbamát metabolitu M1 (molekulová hmotnost 337 g/mol) byl očekávaným produktem ethanolýzy metabolitu M3 ze vzorku moči. Tento produkt byl detekován v LC/MS analýze vzorku ze syntézy standardu ethylkarbamátu metabolitu M1 v retenčním čase 13,4 min. Ve vzorku moči po ethanolýze nebyla detekce tohoto produktu ale úspěšná, pravděpodobně kvůli nízké koncentraci metabolitu M3 v původním 12 h vzorku moči. I přesto se ale domníváme, že dochází k tvorbě karbamoylglukuronidu demethylsibutraminu, poněvadž navržená struktura aglykonu M3 obsahuje pouze  $R-N(CH_3)COOH$  skupinu schopnou konjugace s kyselinou glukuronovou.

### *Metabolity M4a, M4b a M4c*

Metabolity M4a, M4b a M4c (molekulová hmotnost 501 g/mol) byly identifikovány jako karbamoylglukuronidy hydroxylovaného demethylsibutraminu.

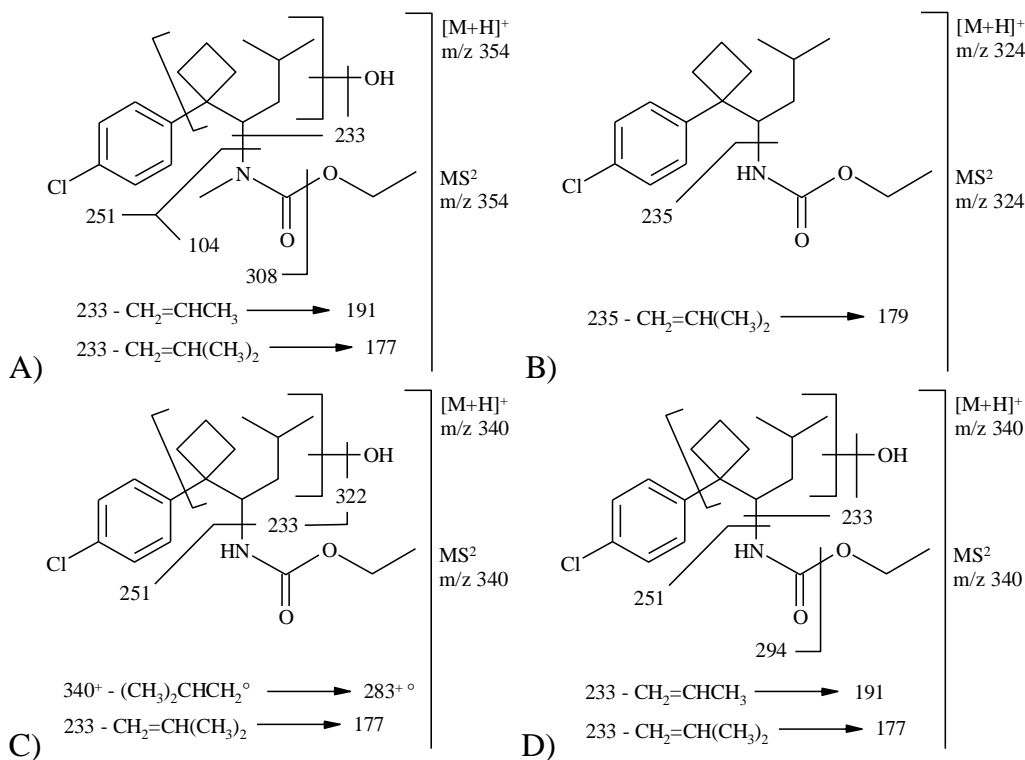
Metabolity ionizovaly jako  $[M+NH_4]^+$  adukty při  $m/z$  519 a poskytly produktové ionty  $m/z$  502 ( $[M+H]^+$ ) a  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) během  $MS^2$  experimentu. Produktové ionty  $m/z$  502 ( $MS^3$ ) byly zaznamenány při  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) a  $m/z$  282 ( $[M+H-Glu-CO_2]^+$ ) pro M4a, a při  $m/z$  484 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) a  $m/z$  308 ( $[M+H-Glu-H_2O]^+$ ) pro M4b. Spektra obou metabolitů M4a a M4b také obsahovala produktový iont  $m/z$  458, který vzniká eliminací samotného  $CO_2$ . Ztráta  $CO_2$  během FAB-MS/MS (Fast Atom Bombardment-MS/MS) analýzy byla uvedena pro karbamoylglukuronid karvedilolu (Schaefer *et al.* 1992) a pro benzylkarbamoyl a *t*-butylkarbamoyl deriváty konjugátů glutathionu (Pearson *et al.* 1988). Bylo navrženo, že k eliminaci  $CO_2$  z karbamátů dochází skrze intramolekulární přeuspořádání (Schaefer *et al.* 1992). Produktové ionty  $m/z$  484 ( $[M+H-H_2O]^+$ ) a  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) byly zaznamenány ( $MS^3$ ) pro  $m/z$  502 M4c. Struktura aglykónů metabolitů M4 byla charakterizována na základě spekter produktových iontů pro  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) zaznamenaných v  $MS^4$  experimentu. Pro metabolit M4a a M4c byly zaznamenány abundantní ionty  $m/z$  282 ( $[M+H-Glu-CO_2]^+$ ) a  $m/z$  233 ( $[M+H-Glu-CO_2-H_2O-NH_2CH_3]^+$ ). Produktové ionty pro  $m/z$  282, zaznamenané v  $MS^5$  experimentu, byly stejné jako produktové ionty standardu M2-OH a naznačují, že místem hydroxylace je uhlovodíkový skelet molekuly. Stejně tak byly zaznamenány v  $MS^4$  experimentu produktové ionty  $m/z$  326 ( $[M+H-Glu]^+$ ) metabolitu M4b. Ve spektru byly nalezeny ionty  $m/z$  282 ( $[M+H-Glu-CO_2]^+$ ),  $m/z$  264 ( $[M+H-Glu-CO_2-H_2O]^+$ ),  $m/z$  251 ( $[M+H-Glu-CO_2-NH_2CH_3]^+$ ),  $m/z$  233 a  $m/z$  177. Struktura produktových iontů o  $m/z$  233 a  $m/z$  177 je uvažována stejná jako ve spektru produktových iontů standardu M2-OH.

Ethylkarbamáty o molekulové hmotnosti 353 g/mol byly očekávané produkty ethanolýzy metabolitů M4a, M4b a M4c. Extrahovaný iontový chromatogram protonované molekuly ( $m/z$  354) z LC/MS analýzy ukázal jediný pík v retenčním čase 10,3 min.  $MS^2$  spektrum iontu  $m/z$  354 ukázalo abundantní iont  $m/z$  233 ( $[M+H-NH(CH_3)COOCH_2CH_3-H_2O]^+$ ) a méně intenzivní ionty o  $m/z$  251 ( $[M+H-NH(CH_3)COOCH_2CH_3]^+$ ), 191, 177, 165 a 151.  $MS^2$  spektrum také obsahovalo produktové ionty  $m/z$  308 ( $[M+H-CH_3CH_2OH]^+$ ) a  $m/z$  104 ( $[NH_2(CH_3)COOCH_2CH_3]^+$ ) charakterizující ethylkarbamátovou část molekuly (tabulka 18, obrázek 16). Zbylé dva isomery produktů ethanolýzy metabolitů M4a, M4b a M4c nebyly nalezeny z LC/MS analýzy. Tyto isomery nebyly buď chromatograficky separovány nebo pravděpodobněji nebyly detekovány kvůli nízké koncentraci původních metabolitů M4b a M4c, ve srovnání s M4a, ve vzorku moči.

Domníváme se, že aglykony metabolitů M4a, M4b a M4c obsahují hydroxylovou skupinu na uhlovodíkovém skeletu molekuly a R-N(CH<sub>3</sub>)COOH funkční skupinu. Kvalitativní rozdíly mezi spektry produktových iontů protonovaných aglykonů těchto metabolitů by mohly naznačovat, že dochází k tvorbě regioisomerů během hydroxylace metabolitů.

**Tabulka 18.** Retenční časy, prekurzorové ionty a spektra produktových iontů (MS<sup>2</sup>, iontová past) ethylkarbamátů detekovaných ve vzorku moči po ethanolýze. Retenční časy (t<sub>R</sub>) se vztahují k chromatografickému systému 3.

Produkt ethanolýzy	t <sub>R</sub> (min)	m/z	m/z (relativní zastoupení) produktových iontů
Ethylkarbamát M1-OH	10,4	354	104(14), 151(5), 165(5), 177(13), 191(6), 233(100), 251(6), 308(7)
Ethylkarbamát M2	11,8	324	125(27), 139(100), 153(53), 179(15), 235(11)
Ethylkarbamát M2-OH	9,9	340	177(26), 233(100), 251(35), 283(6), 322(54)
Ethylkarbamát M2-OH	10,0	340	151(7), 165(5), 177(23), 191(8), 233(100), 251(5), 294(9), 322(5), 326(9)



**Obrázek 16.** Navržené struktury a fragmentace v LC-APCI/MS/MS experimentech A) ethylkarbamátu M1-OH, B) ethylkarbamátu M2, C) ethylkarbamátu M2-OH v retenčním čase 9,9 min a D) ethylkarbamátu M2-OH v retenčním čase 10,0 min.

### *Metabolity M5a a M5b*

Metabolit M5 (molekulová hmotnost 471 g/mol) byl určen jako karbamoylglukuronid didemethylsibutraminu. Amonný adukt metabolitu  $[M+NH_4]^+$  o m/z 489 fragmentoval na produktové ionty m/z 472 ( $[M+H]^+$ ) a m/z 296 ( $[M+H-Glu]^+$ ) během MS<sup>2</sup> experimentu. Abundantní iont m/z 296 ( $[M+H-Glu]^+$ ) byl zaznamenán ve spektru produktových iontů m/z 472 (MS<sup>3</sup>). Protonovaná molekula aglykonu (m/z 296) poskytla produktové ionty m/z 235, 179, 153, 139, 125 a 109 v MS<sup>4</sup> experimentu. Tyto produktové ionty jsou shodné s produktovými ionty M2 (didemethylsibutramin) a ukazují, že metabolit byl modifikován v části obsahující atom dusíku. Jelikož je poměr m/z protonované molekuly aglykonu metabolitu M5 (m/z 296) o 44 amu větší než metabolitu M2 (m/z 252), domníváme se, že CO<sub>2</sub> je navázán na atom dusíku metabolitu M2.

Předpokládaný způsob vazby kyseliny glukuronové k metabolitu I. fáze přes vytvoření karbamoylglukuronidu byl potvrzen ethanolýzou vzorku moči. Po LC/MS analýze ukázal extrahovaný iontový chromatogram protonované molekuly očekávaného produktu (molekulová hmotnost 323 g/mol) jediný pík v retenčním čase 11,8 min. Kolizně indukovaná disociace iontu m/z 324 poskytla produktové ionty m/z 235 ( $[M+H-NH_2COOCH_2CH_3]^+$ ) a m/z 179, 165, 153, 139 a 125 (tabulka 18, obrázek 16). Ethanolýza M5 ve vzorku moči poskytla skrze „reesterifikaci kyseliny glukuronové“ ethylkarbamát M2. Vzniklý ethylkarbamát M2 měl stejný retenční čas a spektrum produktových iontů jako standard ethylkarbamátu vzniklý reakcí M2 s ethylchloroformiátem.

Chromatografická separace naznačila, že ve vzorku by mohly být přítomny stereoisomery M5. Použitím gradientu s menší strmostí bylo dosaženo částečné separace obou isomerů (označených jako M5a a M5b), které měly identická spektra produktových iontů. Jelikož je chirální kyselina glukuronová konjugována s metabolitem I. fáze obsahujícím jedno chirální centrum a racemický sibutramin sloužil jako substrát, domníváme se, že dva diastereoismery M5 byly částečně chromatograficky rozděleny.

### *Metabolity M6a a M6b*

Metabolity M6a a M6b byly určeny jako karbamoylglukuronidy hydroxylovaného didemethylsibutraminu.

Amonný adukt M6a  $[M+NH_4]^+$  o  $m/z$  505 fragmentoval na produktové ionty  $m/z$  488 ( $[M+H]^+$ ) a  $m/z$  312 ( $[M+H-Glu]^+$ ) během  $MS^2$  experimentu. Spektrum produktových iontů zaznamenané pro  $m/z$  488 ( $MS^3$ ) obsahovalo ionty  $m/z$  444 ( $[M+H-CO_2]^+$ ) a  $m/z$  312 ( $[M+H-Glu]^+$ ). Vznik produktového iontu  $m/z$  444 si vysvětlujeme přes stejnou intramolekulární eliminaci  $CO_2$ , jaká byla diskutována pro metabolity M4a a M4b. Produktové ionty  $m/z$  312 byly vytvořeny v  $MS^3$  experimentu pro charakterizaci struktury aglykonu M6a. Zaznamenané spektrum obsahovalo abundantní iont  $m/z$  268 ( $[M+H-Glu-CO_2]^+$ ) a méně intenzivní iont o  $m/z$  233 ( $[M+H-Glu-CO_2-H_2O-NH_3]^+$ ). Produktový iont  $m/z$  268 byl následně podroben  $MS^4$  experimentu. Pozorované fragmentační chování bylo podobné standardu M2-OH a naznačovalo, že jedna hydroxylová skupina je lokalizována na uhlovodíkovém skeletu molekuly.

Amonný adukt M6b  $[M+NH_4]^+$  o  $m/z$  505 fragmentoval na produktové ionty  $m/z$  488 ( $[M+H]^+$ ) a  $m/z$  312 ( $[M+H-Glu]^+$ ) během  $MS^2$  experimentu. Spektrum produktových iontů zaznamenané pro  $m/z$  488 ( $MS^3$ ) obsahovalo ionty  $m/z$  470 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  444 ( $[M+H-CO_2]^+$ ) a  $m/z$  312 ( $[M+H-Glu]^+$ ). Pozorovaný abundantní iont  $m/z$  470 pravděpodobně vzniká ztrátou  $H_2O$  z hydroxylové skupiny nalézající se na uhlovodíkovém skeletu metabolitu I. fáze. Spektrum produktových iontů  $m/z$  312 ( $[M+H-Glu]^+$ ) metabolitu M6b, zaznamenané v  $MS^3$  experimentu, obsahovalo ionty  $m/z$  294 ( $[M+H-Glu-H_2O]^+$ ),  $m/z$  268 ( $[M+H-Glu-CO_2]^+$ ),  $m/z$  251 ( $[M+H-Glu-CO_2-NH_3]^+$ ),  $m/z$  250 ( $[M+H-Glu-CO_2-H_2O]^+$ ) a  $m/z$  233 a 177. Strukturu produktových iontů  $m/z$  233 a 177 uvažujeme stejnou jako ve spektru produktových iontů standardu M2-OH. Pozorované kvalitativní rozdíly mezi spektry produktových iontů metabolitů M6a a M6b připisujeme rozdílným pozicím hydroxylové skupiny umístěné na skeletu aglykonu. Přesná pozice hydroxylové skupiny nemohla být z naměřených hmotnostních spekter stanovena.

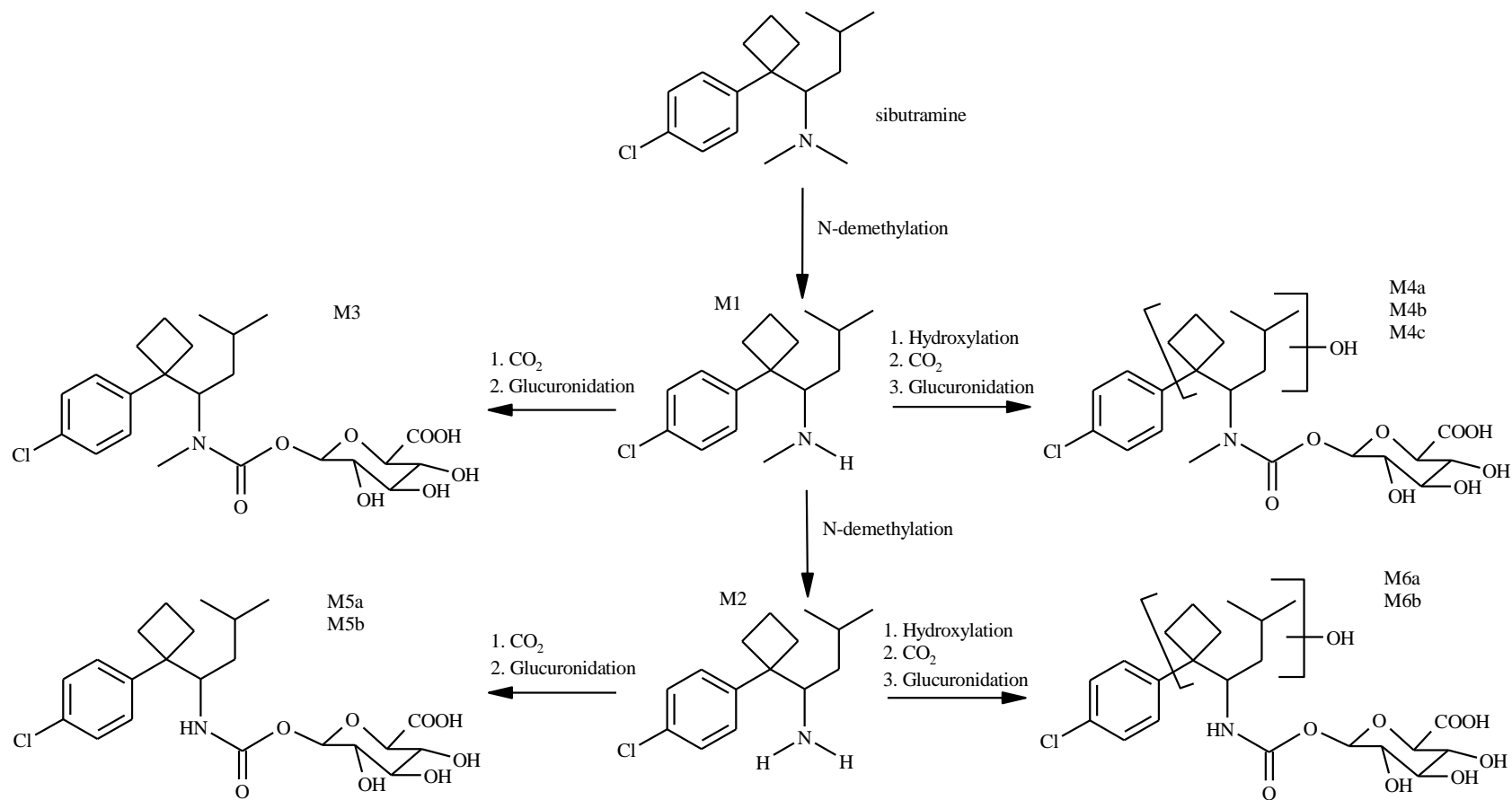
Molekulová hmotnost 339 g/mol byla vypočtena pro očekávané produkty ethanolýzy metabolitů M6a a M6b. Po LC/MS analýze ukázal extrahovaný iontový chromatogram iontu  $m/z$  340 (protonovaná molekula) dva píky v retenčním čase 9,9 a 10,0 min. Spektrum produktových iontů zaznamenané pro  $m/z$  340 v retenčním čase 9,9 min obsahovalo ionty  $m/z$  322 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  251 ( $[M+H-NH_2COOCH_2CH_3]^+$ ),  $m/z$  233 a  $m/z$  177. Série iontů  $m/z$  233, 191, 177, 165 a 151 spolu s ionty  $m/z$  251 ( $[M+H-NH_2COOCH_2CH_3]^+$ ) a  $m/z$  294 ( $[M+H-CH_3CH_2OH]^+$ ) byly zaznamenány ve spektru produktových iontů  $m/z$  340 v retenčním čase 10,0 min (tabulka 18, obrázek

16). Tyto dva částečně separované píky byly přisouzeny hydroxylovaným regioisomerům jednotlivých ethylkarbamátů vzniklých z metabolitů M6a a M6b.

Ethylkarbamát v retenčním čase 10,0 min nalezený ve vzorku moči po ethanolýze měl stejný retenční čas a spektrum produktových iontů jako standard ethylkarbamátu vzniklý reakcí M2-OH s ethylchloroformiátem. Tento výsledek potvrzuje, že metabolity M6a a M6b mají strukturu karbamoylglukuronidu a nepřímo ukazuje, že jeden z nich nese hydroxylovou skupinu na koncovém uhlíku isobutylu (stejná pozice hydroxyly jako ve standardu M2-OH).

### Metabolický profil sibutraminu v lidské moči

Navržený metabolický profil sibutraminu v lidské moči je znázorněn na obrázku 17. V lidské moči byly nalezeny dva metabolity I. fáze (M1 a M2) a osm metabolitů II. fáze (M3-M6) biotransformace sibutraminu. Postupná mono- a di-N-demethylace sibutraminu měla za následek metabolity M1 a M2, které byly nalezeny jako minoritní metabolity. Hlavními metabolity sibutraminu byly karbamoylglukuronidy utvořené z metabolitů M1 a M2 a jejich hydroxylovaných analogů. Dospěli jsme k závěru, že hydroxylová skupina metabolitů M4 a M6 je situována na uhlovodíkovém skeletu molekul a že regiospecifická hydroxylace by mohla mít za následek tvorbu regioisomerů metabolitů M4 a M6. Hydroxylované regioisomery metabolitu M2, jeden na koncovém atomu uhlíku isobutylu a druhý na atomu uhlíku cyklobutylu (*cis*-geometrie), byly nalezeny u lidí a jejich syntéza uvedena (Jeffery *et al.* 1996). Nalezené karbamoylglukuronidy jsou podobné těm, které byly již dříve uvedeny pro sloučeniny obsahující primární nebo sekundární aminovou skupinu (Beconi *et al.* 2003). Tyto metabolity byly pravděpodobně utvořeny chemickou reakcí aminu a CO<sub>2</sub> s následnou enzymatickou glukuronidací vzniklého karbamátu za utvoření stabilního konjugátu. Například, *in vitro*, ve směsi jaterních mikrosomů s uridin 5'-difosfát (UDP)-glukuronovou kyselinou a v prostředí obohaceném na CO<sub>2</sub> bylo dosaženo tvorby karbamoylglukuronidů karvedilolu (Schaefer 1992), di-[2S,3S]-2-amino-3-methylpentanoic-1,3-thiazolididu fumarátu (ILT-threo) a jeho allo stereoisomeru (ILT-allo) (Beconi *et al.* 2003) a 1-(3-[2-[(2-ethoxy-3-pyridinyl)oxy]ethoxy]-2-pyrazinyl)-2(R)-methylpiperazinu (BVT.2938) (Edlund *et al.* 2004). Karbamoylglukuronidy tocainidu (Elvin *et al.* 1980, Kwok *et al.* 1990), mofegilinu (Dow *et al.* 1994), rimantadinu (Brown *et al.* 1990), mexiletinu (Senda *et al.* 2003) a setralinu (Tremaine *et al.* 1989) byly také nalezeny v lidské moči a plasmě.



**Obrázek 17.** Navržené hlavní metabolické cesty eliminace sibutraminu v lidské moči. Nezměněný sibutramin nebyl nalezen. Pořadí reakcí naznačené pro hydroxylaci a glukuronidaci během tvorby M4 a M6 je předběžné.



## **5. ZÁVĚR**

## 5.1. Metabolismus sibutraminu v jaterních mikrosomech potkana a v primární kultuře hepatocytů potkana

1. Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení metabolitů sibutraminu v jaterních mikrosomech a v primární kultuře hepatocytů potkana.
2. Metabolity M1 a M2 byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie a pomocí synteticky připravených standardů. Struktura metabolitů M3 a M4 byla částečně charakterizována pomocí hmotnostní spektrometrie.
3. Bez ohledu na použitou enantiomerní formu substrátu byly nalezeny metabolity M1 a M2 jako jediné produkty biotransformace sibutraminu v mikrosomech potkana. I. fáze biotransformace sibutraminu v mikrosomech potkana se neukázala jako stereoselektivní.
4. V hepatocytech, inkubace *R*-sibutraminu vedla pouze k tvorbě metabolitů M1 a M2; inkubace *S*-sibutraminu měla za následek tvorbu čtyř hlavních metabolitů (M1, M2, M3 a M4).
5. Bylo ukázáno, že I. fáze biotransformace sibutraminu v primární kultuře hepatocytů potkana je stereoselektivní. Nižší biotransformace *R*-sibutraminu, spolu s jeho vyšší účinností při snižování příjmu potravy a tělesné hmotnosti (Glick *et al.* 2000) by mohla tento enantiomer zvýhodňovat.

## 5.2. Metabolismus sibutraminu v lidských mikrosomech

1. Byla vyvinuta analytická metoda, kombinující achirální a chirální HPLC separaci, pro stanovení sibutraminu a jeho metabolitů na chirální úrovni.
2. Bez ohledu na použitou enantiomerní formu substrátu byly nalezeny metabolity M1 a M2 jako jediné produkty biotransformace sibutraminu v mikrosomální frakci jaterní tkáně člověka. Hlavním vznikajícím metabolitem byl metabolit M1.
3. Výsledky ukázaly, že I. fáze biotransformace sibutraminu v mikrosomální frakci jaterní tkáně člověka je stereoselektivní a stereospecifická. Nižší afinita enzymu, který se podílí na N-demethylaci sibutraminu k jeho *R*-enantiomeru, je příčinou nižší rychlosti biotransformace *R*-sibutraminu. Během N-demethylace sibutraminu na metabolit M1 je zachována konfigurace na chirálním uhlíku a nedochází k chirální inverzi sibutraminu.
4. Jelikož bylo ukázáno, že *R*-enantiomery metabolitu M1 a M2 jsou farmakologicky účinnější než jejich *S*-enantiomery i než *rac*-sibutramin, nabízí se zde možnost použití čistého enantiomeru *R*-sibutraminu (popř. *R*-M1 nebo *R*-M2) namísto *rac*-sibutraminu (Glick *et al.* 2000). Uvedené výsledky podporují použití *R*-sibutraminu i z farmakokinetického hlediska.

### 5.3. Metabolický profil sibutraminu v lidské moči

1. Kombinací různých skenovacích technik trojitého kvadropólu a vícenásobnou MS/MS analýzou na iontové pasti byla provedena detekce a identifikace neznámých metabolitů sibutraminu v lidské moči.
2. Byly nalezeny dva metabolity I. fáze (M1 a M2) a osm metabolitů II. fáze (M3-M6) biotransformace sibutraminu. Hlavními metabolity sibutraminu byly karbamoylglukuronidy utvořené z metabolitů M1 a M2 a jejich hydroxylovaných analogů.
3. Detekované karbamoylglukuronidy byly charakterizovány pomocí LC-MS/MS analýzy a chemickou modifikací jejich struktury. Spektra produktových iontů umožnily stanovení funkčních skupin metabolitů, ale diagnostické produktové ionty, které by vedly k určení místa glukuronidace, nebyly v hmotnostních spektrech metabolitů pozorovány. Místo glukuronidace bylo určeno pomocí ethanolýzy vzorků moči. Následkem toho byly v LC/MS analýze detekovány ethylkarbamáty původních karbamoylglukuronidů, které potvrzovaly jejich původní strukturu.
4. Je velmi zajímavé, že byla nalezena zcela výhradně tvorba karbamoylglukuronidů, ačkoliv metabolická modifikace sibutraminu poskytla pro konjugaci s kyselinou glukuronovou amino (demethylace) i hydroxylovou (hydroxylace) skupinu. Karbamoylglukuronidy sloučenin obsahujících primární nebo sekundární amino skupinu byly popsány již dříve a je možné, že tento způsob konjugace je mnohem běžnější než se donedávna uvádělo (Beconi *et al.* 2003).

## **6. SUMMARY**

Obesity represents a serious problem especially in American and European populations. Pharmacotherapy in combination with a reduced calorie diet is recommended for obese patients as a multi-modal approach to weight loss. Sibutramine hydrochloride monohydrate represents one of the few established and well-proven agents available for treatment of obesity. It is sold as a racemic mixture under the trade-name Meridia, Reductil or Lindaxa. It acts as a monoamine reuptake inhibitor. The weight loss of patients induced by sibutramine is thought to be due to a combination of serotonin- and noradrenaline-mediated mechanisms that increase both satiety and energy expenditure.

In organisms, sibutramine is rapidly demethylated to form metabolites M1 and M2. These metabolites contribute largely to the pharmacological effects of sibutramine and the pharmacokinetic characteristics of M1 and M2 were thoroughly studied in human plasma. Although sibutramine is widely used for the treatment of obesity almost ten years, the published information on the further metabolic fate of metabolites M1 and M2 as well as on the elimination of sibutramine from the body is almost exclusively limited to package inserts of the product. To address this issue we determined the routes of elimination of sibutramine in humans via urine. LC-API/MS was utilized for detection of unknown metabolites and subsequent tentative structural characterization.

Two phase I (M1 and M2) and eight phase II metabolites of sibutramine were found in human urine. Consecutive mono- and di-N-demethylation of sibutramine resulted in metabolites M1 and M2, which were found as minor metabolites. Carbamoyl glucuronides formed from metabolites M1, M2, and their hydroxylated analogs were the main metabolites of sibutramine. These metabolites were probably formed by the chemical reaction of the amine with CO<sub>2</sub> followed by enzymatic glucuronidation of the carbamate.

The results allowed us to insight into the biotransformation and elimination of sibutramine in humans and we present a new way for conjugation of sibutramine metabolites.

Sibutramine and both M1 and M2 metabolites are chiral compounds. The enantioselective pharmacodynamic profile of these enantiomers has been reported. The *R*-enantiomers act as more potent monoamine reuptake inhibitors than the *S*-enantiomers. One aim of this study was to evaluate the stereoselectivity in phase I of sibutramine biotransformation in rat and man. The *in vitro* formations of the main metabolites from *R*-, *S*- and *rac*-sibutramine were studied and compared. Primary

cultures of rat hepatocytes, microsomal fraction of rat liver homogenates and microsomal fraction of human liver homogenates were used as model systems, respectively.

Only metabolites M1 and M2 were detected after incubation of sibutramine with rat liver microsomes regardless of the enantiomeric form of substrate used. We did not conclude the phase I biotransformation of sibutramine to be stereoselective from these data. On the other hand, pronounced stereoselectivity of sibutramine biotransformation was found in primary cultures of rat hepatocytes. While *R*-sibutramine incubation led to formation of two main metabolites (M1 and M2) only, incubation of *S*-sibutramine or *rac*-sibutramine (to a lesser extent) resulted in four major metabolites (M1, M2, M3 and M4) and 2-3 minor metabolites. *R*-sibutramine was found as enantiomer with less extensive biotransformation than the *S*-enantiomer by rat hepatocytes *in vitro*.

Metabolites M1 and M2 were detected as the only biotransformation products of sibutramine in human liver microsomes regardless of the enantiomeric form of substrate used. The main metabolite formed was M1. The results showed, that the phase I biotransformation of sibutramine is stereoselective and stereospecific in human liver microsomes. *R*-sibutramine was found as enantiomer with less extensive biotransformation than the *S*-enantiomer by human liver microsomes *in vitro*. Moreover, it was shown, that the chiral carbon atom configuration is retained during formation of M1 and that sibutramine did not undergo chiral inversion.

On the basis of these results, *R*-sibutramine could be considered as enantiomer with less extensive biotransformation than the *S*-enantiomer by rat hepatocytes and human liver microsomes *in vitro*. Lower biotransformation might mean slower deactivation, lower risk in drug-drug interactions and inter-individual variability. Moreover, it was reported that both *R*-desmethylsibutramine and *R*-didesmethylsibutramine were clearly more potent in depressing food intake and decreasing body weight than the *S*-enantiomers. Thus *R*-sibutramine might represent the more advantageous sibutramine enantiomer from pharmacokinetic as well as pharmacodynamic points of view. The results obtained *in vitro* should be considered as preliminary with respect to well-known *in vivo* stereoselective processes such as absorption, protein binding and elimination which altogether, in addition to metabolism, determine the final disposition of individual enantiomers.

## **7. LITERATURA**



Abolfathi Z, Couture J, Vallee F, Lebel M, Tanguay M, Masson E. A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2004; 7: 345.

Anari MR, Sanchez RI, Bakhtiar R, Franklin RB, Baillie TA. Integration of knowledge-based metabolic predictions with liquid chromatography data-dependent tandem mass spectrometry for drug metabolism studies: Application to studies on the biotransformation of indinavir. *Anal. Chem.* 2004; 76: 823.

Ardrey RE. *Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction* (2003, John Wiley & Sons Ltd).

Bakhtiar R, Ramos L, Tse FLS. Use of atmospheric pressure ionization mass spectrometry in enantioselective liquid chromatography. *Chirality* 2001; 13: 63.

Balcioglu A, Wurtman RJ. Sibutramine, a serotonin uptake inhibitor, increases dopamine concentrations in rat striatal and hypothalamic extracellular fluid. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2352.

Beconi MG, Mao A, Liu DQ, Kochansky Ch, Pereira T, Raab C, Pearson P, Chiu SL. Metabolism and pharmacokinetics of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor in rats, dogs, and monkeys with selective carbamoyl glucuronidation of the primary amine in dogs. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 1269.

Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. Isolated hepatocytes – preparation, properties and applications. In: van der Vliet PC, Pillai S. (eds) *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 1991 Elsevier Science, Amsterdam, p. 1-470.

Brown SW, Garland WA, Fukuda EK. Isolation and characterization of an unusual glucuronide conjugate of rimantadine. *Drug Metab. Dispos.* 1990; 18: 546.

Buckett WR, Thomas PC, Luscombe GP. The pharmacology of sibutramine hydrochloride (BTS 54 524), a new antidepressant which induces rapid noradrenergic down-regulation. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1988; 12: 575.

Caldwell J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. *J. Chromatogr. B* 1995; 694: 39.

Connoley IP, Heal DJ, Stock MJ. A study in rats of the effects of sibutramine on food-intake and thermogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114: Suppl S, P388.

Connoley IP, Liu Y, Frost I, Reckless IP, Heal DJ, Stock MJ. Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 126: 1487.

Constanzer M, Chavez-Eng C, Matuszewski B. Determination of a thermally labile metabolite of a novel growth hormone secretagogue in human and dog plasma by liquid chromatography with ion spray tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B* 2001; 760: 45.

Cotzias GC, Papavasiliow PS, Gellene R. Modification of parkinsonism: chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.* 1969; 280: 337.

Denizat F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immun. Methods* 1986; 89: 271.

Desai MJ, Armstrong DW. Transforming chiral liquid chromatography methodologies into more sensitive liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry without losing enantioselectivity. *J. Chromatogr. A* 2004; 1035: 203.

Ding L, Hao X, Huang X, Zhang S. Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. Methods and clinical application. *Anal. Chim. Acta* 2003; 492: 241.

Dow J, Piriou F, Wolf E, Dulery BD, Haegele KD. Novel carbamate metabolites of mofegiline, a primary amine monoamine oxidase B inhibitor, in dogs and humans. *Drug Metab. Dispos.* 1994; 22: 738.

Edlund PO, Baranczewski P. Identification of BVT.2938 metabolites by LC/MS and LC/MS/MS after *in vitro* incubations with liver microsomes and hepatocytes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 34: 1079.

Elvin AT, Keenaghan JB, Byrnes EW, Tenthorey PA, McMasterPD, Takman BH, Lalka D, Manion CV, Baer DT, Wolshin EM, Meyer MB, Ronfeld MA. Tocainide conjugation in humans: novel biotransformation pathway for a primary amine. *J. Pharm. Sci.* 1980; 69: 47.

Evans G. *A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* 2004, CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd., Boca Raton, Florida.

Gibson GG and Skett P. *Introduction to drug metabolism.* 3<sup>rd</sup> edition, 2001, Nelson Thornes Publishers, Cheltenham, UK.

Gillette JR. Techniques for studying drug metabolism *in vitro*. In: La Du BN, Mandel HG, Way EL. (eds) *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* 1971 The Williams and Wilkins Company, Baltimore, p. 400-418.

Glick SD, Haskew RE, Maisonneuve IM, Carlson JN, Jerussi TP. Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 397: 93.

Gundlah C, Martin KF, Heal DJ, Auerbach SB. *In vivo* criteria to differentiate monoamine reuptake inhibitors from releasing agents: Sibutramine is a reuptake inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 283: 581.

Heal DJ, Frankland AT, Gosden J, Hutchins LJ, Prow MR, Luscombe GP, Buckett WR. A comparison of the effects of sibutramine hydrochloride, bupropion and methamphetamine on dopaminergic function: evidence that dopamine is not a pharmacological target for sibutramine. *Psychopharmacology (Berl.)* 1992; 107: 303.

Hind ID, Mangham JE, Ghani SP, Haddock RE, Garratt CJ, Jones RW. Sibutramine pharmacokinetics in young and elderly healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 54: 847.

Cheetham SC, Viggers JA, Butler SA, Prow MR, Heal DJ. [<sup>3</sup>H]Nisoxetine-A radioligand for noradrenaline reuptake sites: Correlation with inhibition of [<sup>3</sup>H]noradrenaline uptake and effect of DSP-4 lesioning and antidepressant treatments. *Neuropharmacology* 1996; 35: 63.

Cheetham SC, Viggers JA, Slater NA, Heal DJ. Sibutramine does not decrease the number of 5-HT re-uptake sites in rat brain and, like fluoxetine, protects against the deficits produced by dexfenfluramine. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2028.

Cheetham SC, Viggers JA, Slater NA, Heal DJ, Buckett WR. [<sup>3</sup>H]Paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [<sup>3</sup>H]5-HT uptake: Effect of administration of various antidepressant treatments. *Neuropharmacology* 1993; 32: 737.

Chen J, Lu W, Zhang Q, Jiang X. Determination of the active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003; 785: 197.

Jackson HC, Bearham MC, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Needham AM, Heal DJ. Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor, sibutramine, in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1997b; 121: 1613.

Jackson HC, Needham AM, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Heal DJ. Comparison of the effects of sibutramine and other monoamine reuptake inhibitors on food intake in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1997a; 121: 1758.

James WPT, Astrup A, Finer N, Hilsted J, Kopelman P, Rössner S, Saris WHM, Van Gaal LF. Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 2119.

Jeffery JE, Kerrigan F, Miller TK, Smith GJ, Tometzki GB. Synthesis of sibutramine, a novel cyclobutylalkylamine useful in the treatment of obesity, and its major human metabolites. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1996; 1: 2583.

Jez JM, Penning TM. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem. Biol. Inter.* 2001; 130-132: 499.

Jones SP, Smith IG, Kelly F, Gray JA. Long-term weight loss with sibutramine. *Int. J. Obesity* 1995; 19: Suppl 2, 41.

Karlsson KE. Deuterium oxide as a reagent for the modification of mass spectra in electrospray microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1993; 647: 31.

Kean WF, Lock CJL, Howard-Lock HE. Chirality in antirheumatic drugs. *Lancet* 1991; 338: 1565.

Keski-Hynnälä H, Kurkela M, Elovaara E, Antonio L, Magdalou J, Luukkanen L, Taskinen J, Kostianen R. Comparison of electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine, and entacapone phase II metabolites in biological samples. *Anal. Chem.* 2002; 74: 3449.

Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J. Mass Spectrom.* 2003; 38: 357.

Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetic* 1994; 26: 144.

Kwok DWK, Pillai G, Vaughan R, Axelson JE, McErlane KM. Preparative high-performance liquid chromatography and preparative thin-layer chromatography isolation of tocainide carbamoyl-O- $\beta$ -D-glucuronide: structural characterization by gas chromatography-mass spectrometry and fast atom bombardment-mass spectrometry. *J. Pharm. Sci.* 1990; 79: 857.

Laidler KJ. *The chemical kinetics of enzyme action.* Oxford University Press, Amen House, London E.C.4 1958; 87-89.

Levsen K, Schiebel HM, Behnke B, Dötzer R, Dreher W, Elend M, Thiele H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview *J. Chromatogr. A* 2005; 1067: 55.

Lewis DFV. *Guide to cytochromes P450 structure and function.* 1<sup>st</sup> edition, 2001, Taylor and Francis, London, England.

Link M, Hakala KS, Wsól V, Kostianen R, Ketola RA. Metabolite profile of sibutramine in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 1171.

Liu DQ, Hop C, Beconi MG, Mao A, Chiu SL. Use of on-line hydrogen/deuterium exchange to facilitate metabolite identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 1832.

Liu DQ, Hop C. Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 37: 1.

Liu DQ, Pereira T. Interference of a carbamoyl glucuronide metabolite in quantitative liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; 16: 142.

Luque CA, Rey JA. Sibutramine: A serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. *Ann. Pharmacother.* 1999; 33: 968.

Luque CA, Rey JA. The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 440: 119.

Luscombe GP, Hopcroft RH, Thomas PC, Buckett WR. The contribution of metabolites to the rapid and potent down-regulation of cortical (b)-adrenoceptors by the putative antidepressant sibutramine hydrochloride. *Neuropharmacology* 1989; 28: 129.

Luscombe GP, Slater NA, Lyons MB, Wynne RD, Scheinbaum ML, Buckett WR. Efekt on radiolabelled-monoamine uptake in vitro of plasma taken from healthy volunteers administered the antidepressant sibutramine HCl. *Psychopharmacology* 1990; 100: 345.

Maser E, Oppermann UCT. The  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action. *Eur. J. Biochem.* 1997; 249: 365.

McMenamy R, Oncley JL. Specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1958; 233: 1436.

Niessen WMA. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1999; 856: 179.

Ohashi N, Furuuchi S, Yoshikawa M. Usefulness of the hydrogen–deuterium exchange method in the study of drug metabolism using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 18: 325.

Oppermann UCT, Maser E. Molecular and structural aspects of xenobiotic karbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxikology* 2000; 144. 71.

Package Insert. Meridia<sup>®</sup>. Sibutramine hydrochloride monohydrate. Abbott Laboratories: North Chicago, IL, 2004.

Park JY, Kim KA, Park PW, Suh KH, Lee GS. Relative bioavailability and pharmacokinetics of a new sibutramine formulation in healthy male subjects: A randomized, open-label, two period, comparative crossover study. *Clin. Ther.* 2004; 26: 2092.

Pearson PG, Threadgill MD, Howald WN, Baillie TA. Applications of tandem mass spectrometry to the characterization of derivatized glutathione conjugates. Studies with S-(N-methylcarbamoyl)-glutathione, a metabolite of the antineoplastic agent N-methylformamide. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988; 16: 51.

Radhakrishna T, Narayana CL, Rao DS, Vyas K, Reddy GO. LC method for determination of assay and purity of sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; 22: 627.

Robb DB, Dovez TR, Bruins AP. Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000; 72: 3653.

Senda C, Toda S, Tateishi M, Kobayashi K, Igarashi T, Chiba K. Mexiletine carbonyloxy  $\beta$ -D-glucuronide: a novel metabolite in human urine. *Xenobiotica*. 2003; 33: 871.

Schaefer WH, Goalwin A, Dixon F, Hwang B, Killmer L, Kuo G. Structural determination of glucuronide conjugates and a carbamoyl glucuronide conjugate of carvedilol: Use of acetylation reactions as an aid to determine positions of glucuronidation. *Biol. Mass Spectrom*. 1992; 21: 179.

Schaefer WH. Formation of a carbamoyl glucuronide conjugate of carvedilol in vitro using dog and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos*. 1992; 20: 130.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner MD, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 1985; 150: 76.

Steen R, Bobeldijk I, Brinkman U. Screening for transformation products of pesticides using tandem mass spectrometric scan modes. *J. Chromatogr. A* 2001; 915: 129.

Stock MJ. Sibutramine: a review of the pharmacology of a novel anti-obesity agent. *Int. J. Obesity* 1997; 21: Suppl 1, S25.

Testa B. In: *The metabolism of drugs and other xenobiotics*. Testa B. and Caldwell J. (ed.) 1995 Academic Press, London.

Tremaine LM, Stroh JG, Ronfeld RA. Characterization of a carbamic acid ester glucuronide of the secondary amine setraline. *Drug Metab. Dispos*. 1989; 17: 58.

Ukai K, Nakagawa T, Ohyama T, Nakanishi H. Sibutramine induces potential-dependent exocytotic release but not carrier-mediated release of dopamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol*. 2004; 484: 209.

Van Gaal LF, Wauters MA, De Leeuw IH. Anti-obesity drugs: what does sibutramine offer? An analysis of its potential contribution to obesity treatment. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1998; 106: Suppl 2, 35.

Wsól V, Skálová L, Szotáková B. Chiral inversion of drugs: Coincidence or principle? *Current Drug Metab*. 2004; 5: 517.

## **8. PŘÍLOHY**

## 8.1. Seznam publikací, prezentací a grantů

### Publikace

1. Marek Link, Romana Novotná, Bohumila Suchanová, Lenka Skálová, Vladimír Wsól, Barbora Szotáková. The stereoselective biotransformation of the anti-obesity drug sibutramine in rat liver microsomes and in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 405.
2. Link M, Hakala KS, Wsól V, Kostianen R, Ketola RA. Metabolite profile of sibutramine in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 1171.

### Abstrakta prezentací uvedená ve sborníku

1. Marek Link, Romana Novotná, Barbora Szotáková, Bohumila Suchanová, Radim Král, Vladimír Wsól and Lenka Skálová. The phase I biotransformation of anti-obesity drug sibutramine is stereoselective in rat hepatocytes. Book of abstracts p. 240. XIX. Biochemický sjezd, 31.8.-3.9. 2004, Olomouc.
2. Marek Link, Romana Novotná, Bohumila Suchanová, Lenka Skálová, Vladimír Wsól and Barbora Szotáková. Stereoselective phase I biotransformation of the anti-obesity drug sibutramine in rat *in vitro*. Book of abstracts p. 113. 19<sup>th</sup> European Workshop on Drug Metabolism, October 03-08, 2004, Antalya-Turkey.
3. Marek Link, Kati S. Hakala, Barbora Szotáková, Lenka Skálová, Vladimír Wsól, Raimo A. Ketola, Risto Kostianen. Metabolický profil sibutraminu v lidské moči. Sborník abstrakt str. 42. XXIII. Xenobiochemické symposium, 16.-19.5. 2005, Valtice.
4. Link M., Hakala K.S., Szotáková B., Skálová L., Wsól V., Ketola R.A., Kostianen R. Liquid chromatography-mass spectrometry study of sibutramine metabolites in human urine. Book of abstracts p. 289. 11<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, September 12-14, 2005, Pardubice.

### Granty vztahující se k tématu disertační práce

Vývoj metodiky pro stanovení metabolitů sibutraminu na chirální úrovni  
Ing. Marek Link  
FRVŠ 969/G6/2004



## 8.2. Příloha I

Marek Link, Romana Novotná, Bohumila Suchanová, Lenka Skálová, Vladimír Wsól, Barbora Szotáková. The stereoselective biotransformation of the anti-obesity drug sibutramine in rat liver microsomes and in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 405.













### 8.3. Příloha II

Link M, Hakala KS, Wsól V, Kostianen R, Ketola RA. Metabolite profile of sibutramine in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 1171.