

## 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 použití enantiomeru 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 separací, 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-demetylování sibutraminu k jeho R-enantiomeru, je příčinou nižší rychlosti biotransformace R-sibutraminu. Během N-demetylování sibutraminu na metabolit M1 je zachována konfigurace na chirálním uhlíku a nedochází k chirální inverzi sibutraminu.
4. Jelikož bylo ukázáno, že R-enantiomery metabolitů 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 produkovaných iontů umožnily stanovení funkčních skupin metabolitů, ale diagnostické produkované ionty, které by vedly k určení místa glukuronidace, nebyly v hmotnostních spektrech metabolitů pozorovány. Místo glukuronidace bylo určeno pomocí ehanolýzy vzorků moči. Následkem toho byly v LC/MS analýze

detekovány ethylkarbamáty původních karbamoylglukuronidů, které potvrdzovaly jejich původní strukturu. Je velmi zajímavé, že byla nalezena zcela výhradně tvorba karbamoylglukuronidů, ačkoliiv metabolická modifikace sibutraminu poskytlá 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 dříve uvádělo (Beconi *et al.*, 2003).