



Porównanie metabolizmu prazikwantelu *in silico* i *in vitro*

Anna Godawska, Elżbieta Pękała, Katarzyna Kieć-Kononowicz
Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

The comparison of praziquantel biotransformation *in silico* and *in vitro*

Summary

Praziquantel (PZQ) is a drug which is used by choice to schistosomiasis treatment. Currently, it is used in malaria treatment. PZQ undergoes extensive metabolism in human body, mainly in liver, by two cytochrome P-450 isoenzymes 2B1 and 3A. As a result of these biotransformations, numerous mono- and dihydroxylated derivatives in B, C and D rings are formed. Only one metabolite has been identified and described, it is 4-hydroxypraziquantel (4-OH-PZQ).

So far, the metabolites out of PZQ biotransformation were obtained under the influence of *Cunninghamella echinulata* and *Beauveria bassiana*. There were the derivatives in position C7 and in D-ring (position is unknown).

In our research, we would like to create a new model of PZQ biotransformation *in vitro*. For such purpose, *Saccharomyces cerevisiae* were used. The results of PZQ biotransformation *in vitro* under the influence of *Saccharomyces cerevisiae* were compared with computer simulation of PZQ metabolism performed by the use of Metabol Expert program.

Key words:

Praziquantel, *Saccharomyces cerevisiae*, biotransformation.

Adres do korespondencji

Anna Godawska,
Katedra Technologii
i Biotechnologii Środków
Leczniczych,
Collegium Medicum,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków;
e-mail: anka.g@interia.pl

1. Wprowadzenie

Analiza metabolizmu leków stanowi bardzo ważny fragment badań poprzedzających wprowadzenie leku na rynek farmaceutyczny. W procesach biotransformacji zachodzących w organizmie dochodzi do powstania wielu pochodnych metabolizowanego związku. Biotransformacja obejmuje głównie procesy

detoksykacji, prowadzące do powstania bardziej polarnych produktów, które są łatwiej wydalone. Czasem biotransformacja prowadzi z jednej strony – do powstania struktur farmakologicznie aktywniejszych od związku macierzystego, a z drugiej – może prowadzić do powstania związków o większej toksyczności. Dlatego też istnieje konieczność przeprowadzania intensywnych i dokładnych badań nad biotransformacją substancji egzogennych wprowadzanych do organizmu człowieka, np. leków.

Zwykle w badaniach nad metabolizmem wykorzystuje się zwierzęta laboratoryjne, wyizolowane organy (np. mikrosomy szczura) lub linie komórkowe. Badanie takie mają jednak wiele ograniczeń, takich jak stosunkowo wysoki koszt, związane z nimi kwestie etyczne, możliwość stosowania ograniczonych dawek leku. Toteż ostatnio poszukuje się alternatywnych sposobów badań nad biotransformacją leków, np. z wykorzystaniem różnych mikroorganizmów, czy też prowadząc symulacje biotransformacji za pomocą programów komputerowych.

Oksydoredukcyjne właściwości mikroorganizmów, takich jak bakterie, drożdże czy grzyby są ogólnie znane. Na podstawie przeprowadzonych długich badań nad reakcjami katalizowanymi przez te mikroorganizmy można stwierdzić, że sposób transformacji, zachodzący w tych mikroorganizmach może „naśladować” reakcje pierwszej fazy, przebiegające w komórkach ssaków. Jest wiele czynników przemawiających za celowością wykorzystania mikroorganizmów: ich hodowla jest łatwa i tania, dysponują bogatym garniturem enzymatycznym, ponadto dają możliwość pracy z większymi stężeniami badanej substancji.

Wykorzystanie do badań komputera ułatwia i przyspiesza prowadzenie badań. Problem stanowi jednak dokładność określonego programu wynikająca z jakości i rozległości bazy danych.

Przedmiotem naszych zainteresowań jest biotransformacja prazikwantelu (PZQ). Jest to lek stosowany z wyboru w leczeniu schistosomatozy, a obecnie często stosuje się go w terapii malarii. Skuteczność PZQ w leczeniu malarii jest istotna, ponieważ jest to jedna z najgroźniejszych chorób endemicznych, a wiele dotychczas stosowanych leków przeciwzimmicznych nie wykazuje już skuteczności z powodu gwałtownie rozwijającej się oporności (1).

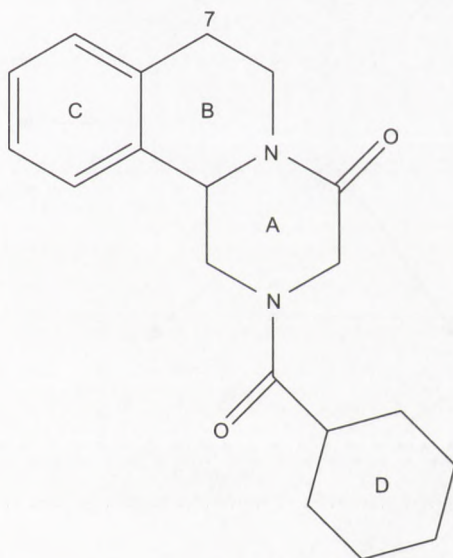
W organizmie człowieka PZQ wchłania się szybko w 80-100%, po 1-3 h zostaje osiągnięte maksymalne stężenie w surowicy. Czas półtrwania wynosi 1-1,5 h, a dla metabolitów 2-4 h. W 80% jest wydalany z moczem, z tego 90% – w ciągu pierwszej doby (2).

PZQ ulega szybkiemu metabolizmowi w organizmie człowieka, głównie w wątrobie pod wpływem izoenzymów cytochromu P-450 2B1 i 3A; charakteryzuje go bardzo silny efekt pierwszego przejścia. Po 3-6,5 h od podania nie stwierdza się jego obecności w surowicy krwi. Głównymi metabolitami I fazy – których struktura została potwierdzona i opisana – są *trans*- i *cis*-4-hydroksyprazikwantel (4-OH-PZQ) (3). Pochodne te w reakcjach II fazy łączą się z kwasem glukuronowym lub siarkowym i w tej postaci zostają wydalone.

W wyniku badań nad biotransformacją **PZQ** zachodzącą w komórkach ssaczy udało się stwierdzić powstawanie mono- i dihydroksypochodnych w obrębie pierścieni B, C i D, których struktura w większości przypadków pozostaje jednak niepotwierdzona, z wyjątkiem **4-OH-PZQ**. W celu dokładniejszych badań nad powstającymi metabolitami stworzono model zwierzęcy, w którym wykorzystuje się hepatocyty szczura indukowane fenobarbitem, stanowiące doskonałe źródło cytochromu P-450. Stwierdzono, że w przypadku użycia jako substratu racemicznej formy **PZQ** otrzymano *trans*- i *cis*-hydroksyprazikwantelu w stosunku 1:4.

Dotychczas za pomocą biotransformacji **PZQ** przez mikroorganizmy udało się otrzymać jego metabolity, wykorzystując grzyby *Cunninghamella echinulata* i *Beauveria bassiana* (4). Były to pochodne hydroksylowe w pozycji C7, oraz w pierścieniu D (nie udało się dokładnie określić miejsca wprowadzenia grupy hydroksylowej) (rys. 1).

Stosując program komputerowy Metabol Expert badano możliwość otrzymania metabolitów **PZQ** *in silico* w komórkach zwierzęcych i roślinnych, a także wskutek fotodegradacji. Jednocześnie rozpoczęto pracę nad stworzeniem nowego modelu biotransformacji **PZQ** w warunkach *in vitro*, wykorzystując do tego celu komórki *Saccharomyces cerevisiae*.



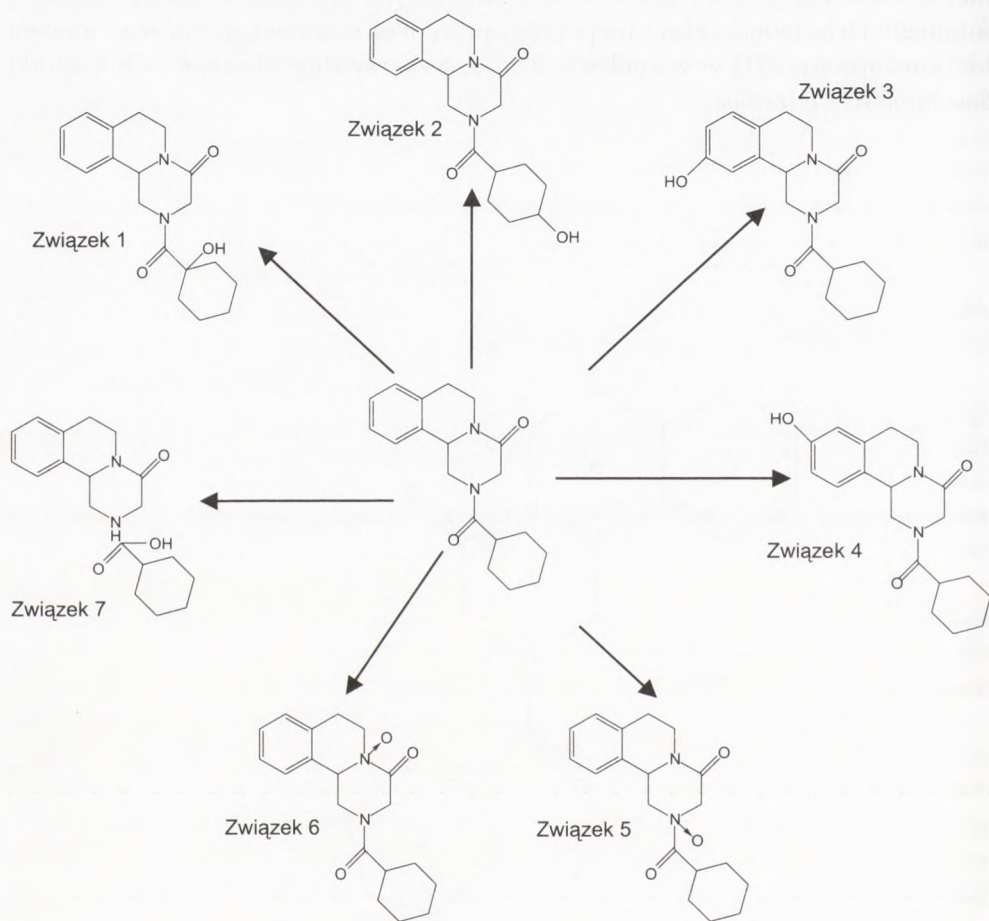
Rys. 1. Prazikwantel (PZQ).

2. Materiały i metody badań

2.1. Badania *in silico*

Za pomocą programu komputerowego Metabol Expert (5) przeprowadzono symulację metabolizmu PZQ zachodzącego w komórkach zwierzęcych, roślinnych oraz pod wpływem światła.

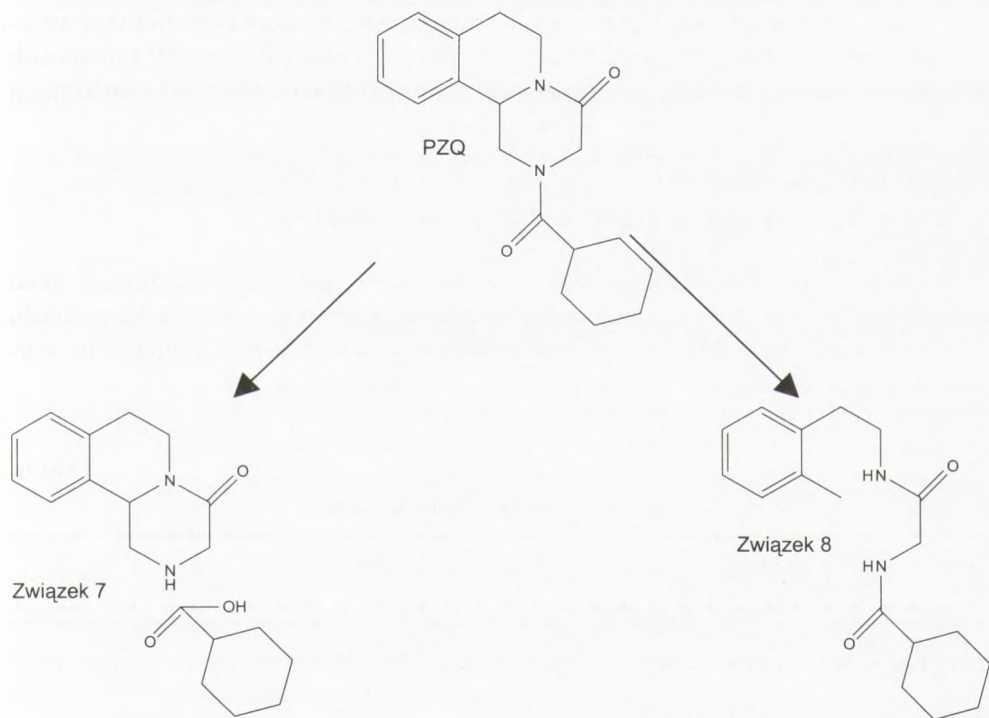
Zbliżoną drogę metabolizmu substratu program Metabol Expert przewiduje poprzez przeszukiwanie i dopasowywanie substratu do najpowszechniejszych szlaków metabolicznych, zawartych w bazie danych umieszczonej w programie. Program ten zawiera trzy bazy danych dla metabolizmu: u zwierząt, roślin i poprzez fo-



Rys. 2. Biotransformacja PZQ w komórkach zwierzęcych.

todegradację. Baza danych dla metabolizmu u zwierząt zawiera szlaki charakterystyczne dla metabolizmu leków u ludzi. Oparta jest głównie na zasadach transformacji leków opisanych w książce *Drug Metabolism* przez Testę i Jennera, które w większości bazują na fizjologii ssaków z pewnymi modyfikacjami w celu zwiększenia prawdopodobieństwa uzyskanych metabolitów. W podobny sposób zostały stworzone bazy danych dla metabolizmu u roślin i w wyniku fotodegradacji. Wszystkie trzy bazy danych w trakcie testowania programu i jego rozwoju były modyfikowane dla osiągnięcia bardziej prawdopodobnych metabolitów substratu.

Na rysunkach 2 i 3 przedstawiono otrzymane metabolity I fazy biotransformacji. Program wygenerował 7 metabolitów powstających w wyniku biotransformacji w komórkach zwierzęcych (związki 1-7). W wyniku biotransformacji w komórkach roślinnych uzyskano dwa metabolity (związki 7-8). Wszystkie przedstawione związki są metabolitami I fazy biotransformacji. W kolejnych etapach mogą powstawać pochodne z kilkoma grupami hydroksylowymi. Otrzymane pochodne hydroksylowe w organizmie zwierzęcym mogą dalej ulegać wiązaniu z kwasem siarkowym lub glukuronowym dając odpowiednie pochodne. Nie uzyskano żadnego produktu będącego efektem fotodegradacji, co może świadczyć o stabilności struktury PZQ.



Rys. 3. Biotransformacja PZQ w komórkach roślinnych.

2.2. Badania *in vitro*

Do badań *in vitro* wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* prasowane firmy Lesaffre (szcep L'hirondelle), oraz drożdże firmy Sigma. Przeprowadzono dwie serie doświadczeń, wykorzystując oba typy mikroorganizmów oraz stosując indukcję poprzez hodowlę na podłożu zawierającym galaktozę i etanol. Hodowlę prowadzono w kolbach o pojemności 500 ml w temperaturze 37°C. W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskano z bardzo małą wydajnością 4 metabolity PZQ (M1, M2, M3, M4). Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach z odwróconą fazą (arkusze aluminiowe RP-18_{F254s} firmy Merck, grubość warstwy 0,2 mm) o długości 20 cm w układzie (malejącym) metanol-woda (95:5; 90:10; 80:20; 75:25; 65:35) oznaczono wartość R_{M0} (6). Technika odwróconej fazy (RP) jest metodą podziałową. Rozdział opiera się na podziale substancji pomiędzy fazę stacjonarną (modyfikowany żel krzemionkowy) a fazę ruchomą (woda w połączeniu z modyfikatorem organicznym, np. z metanolem). W tej technice parametrem opisującym jest współczynnik R_M .

$$R_M = \log (1/R_f - 1)$$

R_f – współczynnik retencji

Wartość R_M koreluje się liniowo z zawartością modyfikatora organicznego w fazie ruchomej i ekstrapoluje do wartości zerowej tego modyfikatora. W ten sposób uzyskuje się znormalizowany chromatograficzny współczynnik hydrofobowości (R_{M0})

$$R_M = R_{M0} + bC$$

b – stała (zależy od układu)

C – stężenie modyfikatora organicznego w fazie ruchomej.

Parametr R_{M0} pozwala oszacować doświadczalnie lipofilność cząsteczek. Jego wartość jest wprost proporcjonalnie zależna od logarytmu współczynnika podziału n-oktanol/woda ($\log P$) (7). W tabeli przedstawiono doświadczalnie wyznaczone wartości R_{M0} dla metabolitów PZQ otrzymanych w metodzie *in vitro*.

Tabela

Wartość parametru R_{M0} dla PZQ i jego metabolitów w badaniach *in vitro*

Nr	$R_M = R_{M0} + b$		
	R_{M0}	r^2	R
1	2	3	4
M1	3,159	0,9919	0,9959
M2	5,057	0,9981	0,9990
M3	3,705	0,9939	0,9969

1	2	3	4
M4	0,120	0,9995	0,9997
PZQ	2,662	0,9925	0,9962
4-OH-PZQ	1,110	0,9821	0,991

R_M , R_{M0} – parametry hydrofobowości, r^2 – kwadrat współczynnika korekcji, R – współczynnik korelacji, M1-M4 – metabolity PZQ, PZQ – prazikwantel, 4-OH-PZQ – 4-hydroksyprazikwantel

3. Omówienie wyników

W organizmie człowieka **PZQ** jest metabolizowany w wątrobie. Dotychczas udało się oznaczyć i zidentyfikować jeden jego metabolit I fazy- 4-OH-PZQ (w dwóch formach izomerycznych *cis*- i *trans*-).

W wyniku badań metabolizmu **PZQ** *in silico* wykorzystujących program Metabol Expert poza znanym **4-OH-PZQ**, program zaproponował utworzenie wielu różnych pochodnych hydroksylowych – np. związki 1-7 (grupy OH mogą zostać wprowadzone zarówno do pierścienia D i C); oprócz nich mogą się tworzyć pochodne o charakterze N-tlenków, a także produkty rozpadu cząsteczki macierzystej (związki 7 i 8).

Znamienny jest fakt występowania tylko jednego wspólnego metabolitu dla komórek roślinnych i zwierzęcych – związek 7.

W badaniach *in vitro* z zastosowaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* otrzymano 4 metabolity. Mała wydajność przeprowadzonego procesu wynikała z różnorodności powstających produktów. Oznaczone doświadczalnie wartości R_{M0} w przypadku trzech metabolitów były wyższe niż dla **PZQ**, a tylko w jednym przypadku znacznie niższa. Wynik świadczył o tym, że powstałe metabolity w większości są bardziej lipofilowe (M1-M3). Jedynie metabolit M4 jest bardziej hydrofilowy od **PZQ**. Związek ten, jak się wydaje, jest jedynym, podobnym do metabolitów otrzymanych *in silico*, oraz opisanych w literaturze (3).

4. Wnioski

Badanie metabolizmu leków jest istotnym etapem badań farmakologicznych. W wyniku procesów zachodzących w organizmie może powstać wiele różnorodnych pochodnych związku. Powstałe metabolity mogą wykazywać działanie podobne do macierzystego leku lub nawet korzystniejsze; mogą też one wykazywać działanie toksyczne. Metabolity wykazujące działanie podobne do leku wyjściowego mogą znaleźć później zastosowanie w lecznictwie, z uwagi na mniejszą ingerencję w procesy zachodzące w organizmie (krótsza droga metabolizmu, szybsze wydalenie).

Procesem bardzo niekorzystnym jest metabolizowanie leku do związku toksycznego. Proces ten należy wyeliminować w trakcie poznawania metabolitów leku, np.

poprzez zablokowanie miejsc w cząsteczce, w których może dojść do przemian prowadzących do powstania związku toksycznego.

Możliwość stworzenia modelu metabolizmu leków *in silico* jest bardzo istotna. Model taki pozwoli przewidywać możliwe modyfikacje cząsteczki w jej miejscach aktywnych, bez konieczności prowadzenia eksperymentów na ludziach i zwierzętach. Metoda ta jest szybka, łatwa i tania. Jedynym jej ograniczeniem jest jakość i dokładność programów komputerowych, a dokładnie baz danych zawierających szlaki metaboliczne, do których dopasowywany jest substrat poddawany metabolizmowi.

W przypadku **PZQ** program Metabol Expert jest, jak się wydaje, wystarczająco dokładny do przybliżonego szacowania możliwych metabolitów. Pozwolił on na wygenerowanie pochodnych, które powstają w organizmie ludzkim. Dodatkowo określił miejsca możliwych przemian, które są prawdopodobne, aczkolwiek dotychczas nie zidentyfikowano ich doświadczalnie. Program komputerowy pozwala na określenie możliwych metabolitów, co umożliwia zawężenie kierunków poszukiwań tych pochodnych.

Inną metodą stosowaną do uzyskania metabolitów niektórych leków jest wykorzystanie mikroorganizmów. W badaniach *in vitro* używa się prostych mikroorganizmów, jak np. drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, lub niektórych grzybów, np. *Cunninghamella echinulata*. Zawierają one bardzo bogaty garnitur enzymatyczny dzięki czemu umożliwiają przeprowadzenie wielu różnorodnych procesów. Problemem jest jedynie ich wydajność.

Wnikliwe badania nad możliwościami biokatalitycznymi mikroorganizmów, obejmujące ich modyfikacje genetyczne, w czasie których można by wprowadzać geny enzymów odpowiedzialnych za metabolizm, dają szansę na odwzorowanie metabolizmu zachodzącego w organizmie człowieka w prostych mikroorganizmach.

Autorki składają podziękowania prof. G. Blaschke z Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Münster za przekazanie próbki leku prazikwantel, użytej w opisanych badaniach.

Literatura

1. Waili N. S., (1998), J. Pak. Med. Assoc., 48, 378-379.
2. Staudt U., Schmahl G., Blaschke G., Mehlhorn H., (1992), Parasitol. Res., 78, 392-398.
3. Högemann A., Kieć-Kononowicz K., Westhoff F., Blaschke G., (1990), Arzneim. Forsch./Drug Res., 10, 1159-1162.
4. Azerad R., (1999), Adv. Biochem. Engin. Biotechnol., 63, 169-218.
5. Pallas, Metabol Expert, (2003), CompuDrug Chemistry Ltd.
6. Biagi G. L., Barbaro A. M., Guerra M. C., (1969), 41, 371-379.
7. Malawska B., (1998), J. Plan. Chromatogr., 11, 137-140.