

ANALITYKA ANTYBIOTYKÓW β -LAKTAMOWYCH W UKŁADZIE *IN SILICO*, *IN VITRO* ORAZ *IN VIVO*

ANALYTICS OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS *IN SILICO*, *IN VITRO* AND *IN VIVO*

**Daria Janiszewska¹, Małgorzata Szultka-Młyńska^{1*},
Bogusław Buszewski^{1,2}**

¹*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
ul. Jurija Gagarina 7, 87-100 Toruń*

²*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń
e-mail: mszultka@chem.umk.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Budowa chemiczna, właściwości fizykochemiczne i mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych
2. Podejście *in silico* w badaniu metabolizmu antybiotyków β -laktamowych
3. Podejście *in vitro* w badaniach metabolizmu antybiotyków β -laktamowych
4. Inkubacja antybiotyków β -laktamowych z enzymami wątrobowymi frakcji mikrosomalnej
5. Zastosowanie reaktora elektrochemicznego i spektrometrii mass
6. Metody analityczne w oznaczaniu i identyfikacji antybiotyków β -laktamowych w próbkach biologicznych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Daria Janiszewska w 2019 roku ukończyła studia drugiego stopnia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, a w 2020 na kierunku Chemia Kryminalistyczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest doktorantką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na tym samym wydziale, wiążąc pracę naukową z Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalitiky. Główne zainteresowania badawcze skupiają się wokół identyfikacji mikrobiologicznej z zastosowaniem technik „-omicznych” oraz poznaniem i interpretacją mechanizmów związanych z działaniem i metabolizmem antybiotyków.



<https://orcid.org/0000-0002-5252-6886>

Dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując kolejno tytuł zawodowy magistra w 2010 roku oraz doktora nauk chemicznych w 2014, a doktora habilitowanego w 2019 roku. Jej zainteresowania badawcze koncentrują się wokół metod przygotowania próbek, technik chromatograficznych, spektrometrii mas, jak również oznaczania i identyfikacji związków biologicznie aktywnych w materiale biologicznym. Jest współautorką ok. 75 publikacji naukowych, 1 patentu i 3 zgłoszeń patentowych oraz wielu prezentacji konferencyjnych. Kierowała projektami naukowymi finansowanymi przez MNiSW oraz NCN. Za działalność naukową była kilkakrotnie wyróżniana nagrodami, m.in. KChA PAN, FNP, MNiSW, JM Rektora UMK.



<https://orcid.org/0000-0002-4499-0128>

Prof. dr hab. Bogusław Buszewski absolwent Chemii UMCS w Lublinie. W 1986 doktorat Słowacki Uniwersytet Techniczny w Bratysławie. W 1992 habilitacja, a w 1999 tytuł profesora chemii. Stypendysta Fundacji AvH. Autorem 15 książek, 68 patentów i ponad 660 artykułów naukowych. Prezes CEGSS, przewodniczącym KChA PAN, członek PAN i EASA. Laureat licznych nagród i wyróżnień w kraju i zagranicą, promotor 48 doktorantów, z których 24 uzyskało stopień doktora habilitowanego. Od 2013 r. pełnomocnik Marszałka Woj. Kujawsko-Pomorskiego ds. rozwoju nauki, badań i wdrożeń oraz innowacyjności. Główne zainteresowania naukowe: bioanalitika, -omika (metabolomika, proteomika, lipidomika itp.), techniki separacyjne (chromatografia i techniki pokrewne, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia i spektrometria, chemometria.



<https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

ABSTRACT

Drug analysis necessitates introducing selective methods of detection and enriching the substances present in biomaterial at low concentration levels (trace analysis). Moreover, there is a continuous demand for increase in the quality of drugs that are being developed, which in turn enforces the development of analytical techniques of increasing sensitivity and accuracy with the application of combined separation techniques. Thus the premise of this review is to compare the *in vitro* metabolic pathways of antibiotic drugs in model conditions such as in the presence of different microsomal fraction enzymes and with the application of electrochemical stimulation of metabolic transformations, as well as to the collected data with the results of *in vivo* experiments.

Keywords: biologically active compounds, chromatographic techniques, electrochemistry, *in vitro*, *in vivo*, mass spectrometry, metabolism, therapeutic drug monitoring

Słowa kluczowe: związki biologicznie aktywne, techniki chromatograficzne, elektrochemia, *in vitro*, *in vivo*, spektrometria mas, metabolizm, terapeutyczne monitorowanie leków

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

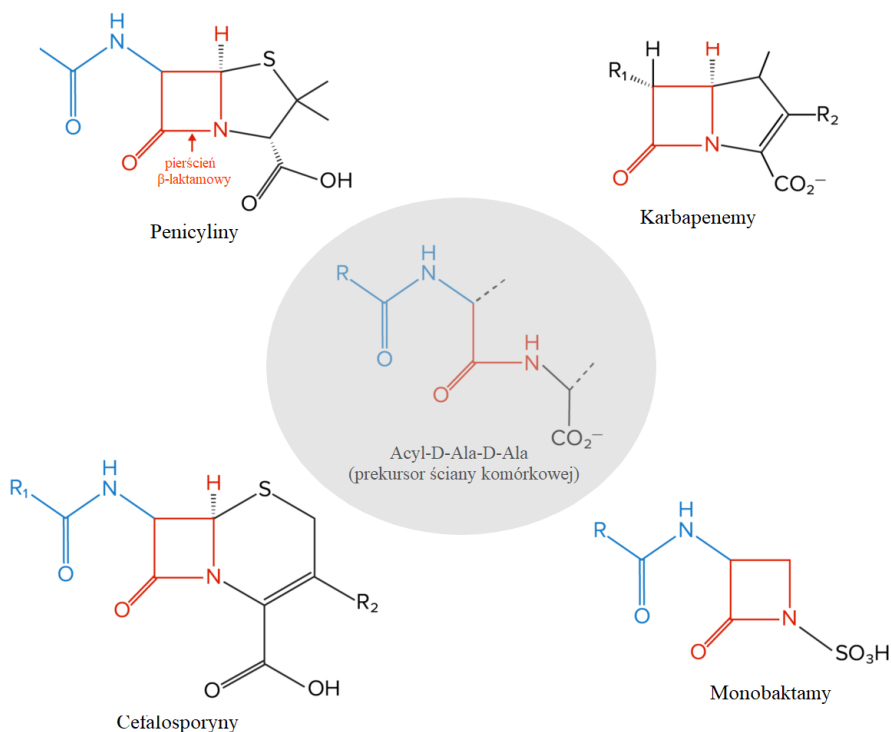
CYP	- Cytochrom P450
EC-MS	- Elektrochemia-spektrometria mas (ang. <i>Electrochemistry-Mass Spectrometry</i>)
EST	- Sulfotransferaza estrogenu
FTIR	- Spektroskopia w podczerwieni transformacją Fouriera <i>transform infrared spectroscopy</i>)
CE	- Elektroforeza kapilarna (ang. <i>Capillary electrophoresis</i>)
GC-MS	- Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas <i>chromatography – mass spectrometry</i>)
GST	- S-transferaza glutationu
LC-MS	- Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>Liquid chromatography – mass spektrometry</i>)
NMR	- Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego <i>magnetic resonance</i>)
PBP	- Białka wiążące penicylinę (ang. <i>Penicillin-binding proteins</i>)
PGN	- Peptydoglikan
PST	- Sulfotranferaza fenolowa
QSAR	- Ilościowa zależność struktura- aktywność (ang. <i>Quantitative structure-activityrelationship</i>)
UDP	- Urydyno-5' difosforan
UGT	- Glukuronozylotransferaza

WPROWADZENIE

Podstawowym krokiem do oceny losów antybiotyków β -laktamowych w organizmie jest charakterystyka budowy chemicznej metabolitów powstających zarówno w I, jak i II fazie biotransformacji. Podstawowe pytanie dotyczące badań nad przemianami metabolicznymi związków biologicznie aktywnych w ludzkim organizmie to takie w jaki sposób skorelować ze sobą wyniki z eksperymentów *in vitro* z badaniami *in vivo* w praktyce klinicznej. W metabolizmie leków zastosowanie znajdują liczne modele *in vitro*, jak hepatocyty, enzymy wątrobowe frakcji mikrosomalnej, pojedyncze frakcje cytoplazmatyczne czy rekombinowane systemy enzymatyczne. Ponieważ komórki wątrobowe wykazują wysoki poziom aktywności cytochromu P450 i często są głównym miejscem przemian metabolicznych, powszechnie stosowanym narzędziem *in vitro* stały się mikrosomy ludzkiej wątroby. Ponadto, metabolizm związków biologicznie aktywnych może być badany za pomocą podejścia *in silico*, czyli programów komputerowych umożliwiających przewidywanie potencjalnych miejsc metabolizmu antybiotyków β -laktamowych wobec różnych izoenzymów cytochromu P450. Ponadto jedno z najbardziej postępowych narzędzi analitycznych do badania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych stanowi obecnie połączenie elektrochemii ze spektrometrią mas, pozwalające wyeliminować wiele żmudnych etapów izolacji metabolitów powstających *in vivo* lub *in vitro*. Mając na uwadze, iż około 90% związków biologicznie aktywnych ulega reakcjom utleniania-redukcji, możemy zauważyć iż procesy katalizowane przez izoenzymy cytochromu P450 znajdują swoje odzwierciedlenie wśród reakcji przeprowadzanych za pomocą celi elektrochemicznej.

1. BUDOWA CHEMICZNA, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I MECHANIZM DZIAŁANIA ANTYBIOTYKÓW BETA- LAKTAMOWYCH

Antybiotyki β -laktamowe są najczęściej stosowanymi środkami przeciwbakteryjnymi na świecie. Strukturalnie β -laktamy zawierają 4-członowy pierścień β -laktamowy zawierający węgiel α i β , azot oraz grupę karbonylową. Obejmują pochodne penicyliny (penamy), cefalosporyny i cefamycyny (cefemy), karbapenemy i monobaktamy. W pierwszych czterech grupach antybiotyków pierścieniem β -laktamowy skondensowany jest z 5-członowym pierścieniem tiazolidynowym i unikalnym łańcuchem bocznym [1] (Rys. 1.).



Rysunek 1. Ogólna struktura podstawowych grup antybiotyków β-laktamowych
Figure 1. General structure of the main groups of β-lactam antibiotics

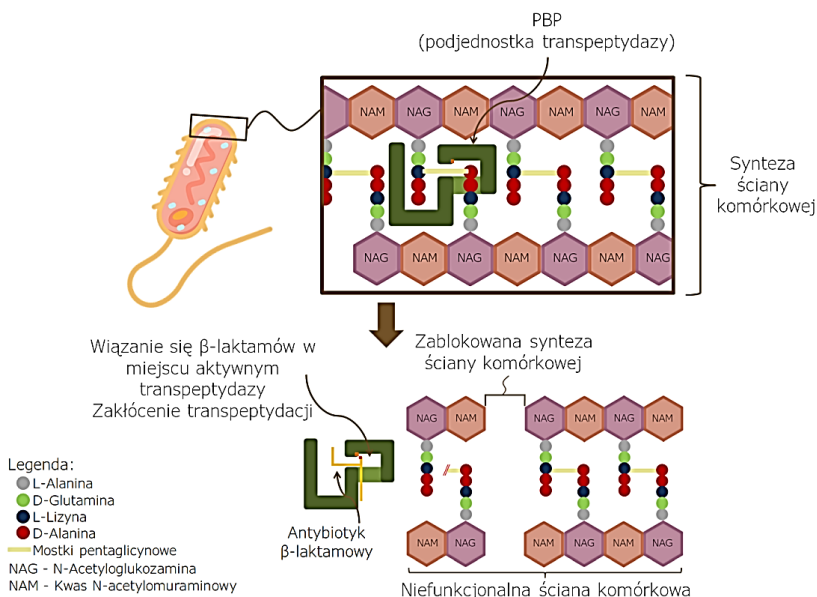
Penicyliny posiadają podstawową bicykliczną strukturę, kwas 6-aminopenicylinowy (6-APA). Struktura składa się z zamkniętego dipeptydu powstałego w wyniku kondensacji L-cysteiny i D-waliny, w wyniku czego powstaje pierścień β-laktamowy i tiazolidynowy. Reaktywny charakter układu pierścieni sprawia, że penicyliny są podatne na procesy degeneracyjne. W środowisku kwaśnym i temperaturze pokojowej pierścień β-laktamowy ulega rekonfiguracji. Proces ten ma znaczenie kliniczne, ze względu na kwasowe środowisko żołądka [2].

Cefalosporyny są grupą półsyntetycznych antybiotyków β-laktamowych, będącymi pochodnymi kwasu 7-aminocefalosporynowego (7-ACA). Zawierają w swojej cząsteczce dwupierścieniową strukturę cefamu, a od cefamycyn odróżnia je obecność grupy 7-metoksylowej. Obecnie istnieje 5 generacji antybiotyków cefalosporynowych różniących się spektrum przeciwbakteryjnym, farmakokinetyką oraz odpornością na β-laktamazy [3]. Kolejną grupą antybiotyków β-laktamowych są strukturalnie spokrewnione z penicylinami i cefalosporynami karbapenemy. Leki te są pochodnymi tienamycyny, antybiotyku wytwarzanego przez drobnoustroje głębokie. Karbapenemy posiadają maksymalne spektrum działania przeciwbakteryj-

nego, co związane jest z ich wewnętrzną opornością na prawie wszystkie β -laktamazy. Stabilność wobec β -laktamaz wynika z obecności podstawnika trans- α -1-hydroksyetylowego [4].

Wyjątkiem od podstawowej struktury chemicznej omawianych antybiotyków są monobaktamy, których postawę stanowi monocykliczny pierścień β -laktamowy, łańcuch boczny -R oraz grupa A-SO₃H [5] (Rys. 1.).

Wszystkie antybiotyki β -laktamowe mają wspólny mechanizm działania polegający na hamowaniu biosyntezy ściany komórkowej bakterii (Rys. 2.).



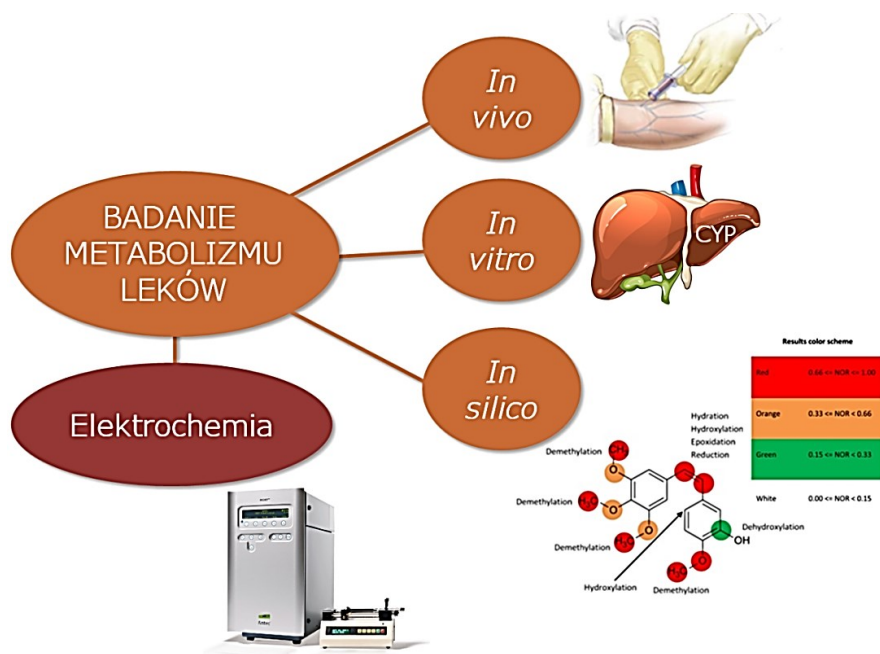
Rysunek 2. Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych

Figure 2. Mechanism of action of β -lactam antibiotics

Ściany komórkowe bakterii są strukturami zbudowanymi z kwasu diaminopimelinowego, muraminowego, teichojowego, aminokwasów, węglowodanów oraz lipidów. Całość tworzy złożoną makrocząsteczkę zwaną peptydoglikanem (PGN), mukopeptydem lub mureiną. Końcowe fragmenty łańcucha peptydowego PGN, które stanowi D-alanylo-D-alanina, tworzą połączenie pod wpływem transpeptydazy z wydzieleniem jednej cząsteczki D-alaniny. β -laktamy zaburzają rozwój ścian komórkowych bakterii przez integrację w enzymy trans peptydazy odpowiedzialne za tworzenie wiązań krzyżowych między nimi peptydoglikany. Enzymy te związane są z białkami wiążącymi penicylinę (PBP). Związki β -laktamowe stanowią analogi D-alanylo-D-alaniny, co ułatwia wiązanie z miejscem aktywnym PBP. Nieodwracalne hamowanie PBP

zapobiega ostatecznemu sieciowaniu (transpeptydacji) powstającej warstwy peptydoglikanu, zakłócając syntezę ściany komórkowej, powoduje utratę żywotności i lizę komórki bakteryjnej [6].

Każdy lek po wprowadzeniu do organizmu musi przejść kilka etapów aby uzyskać odpowiedni efekt farmakologiczny. Antybiotyki ulegają biotransformacji w wątrobie, nerkach, krwi oraz ścianach jelita cienkiego. Powstałe metabolity dzieli się na aktywne, nieaktywne, toksyczne lub te, które pod wpływem odpowiednich czynników fizycznych przekształcają się w związek pierwotny. W zależności od rodzaju wytwarzanego metabolitu, aktywność przeciwdrobnoustrojowa i toksyczność związku pierwotnego może wzrosnąć, co może skutkować pewnymi ograniczeniami w stosowaniu antybiotyków [7]. Analiza biotransformacji potencjalnych leków jest obowiązkowym etapem badań przedklinicznych. W tym celu możliwe jest zastosowanie kilku podejść, takich jak *in silico*, *in vitro*, *in vivo* oraz badań elektrochemicznych (Rys. 3.).



Rysunek 3. Wybrane metody badania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych
Figure 3. Selected methods of β -lactam antibiotics metabolism research

2. PODEJŚCIE *IN SILICO* W BADANIU METABOLIZMU ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH

Los podawanych antybiotyków β -laktamowych, a także wszystkich innych leków determinowany jest przez ich metabolizm w organizmie. Zależą one od trzech głównych faz metabolizmu. Pierwsza faza polega na wprowadzeniu grupy reaktywnej poprzez utlenianie, redukcję lub hydrolizę faza druga na koniugacji z różnymi ugrupowaniami natomiast faza trzecia na usuwaniu metabolitów z komórek wątroby i jelit. Najważniejsze izoenzymy fazy pierwszej należą do cytochromu P450 (CYP), ponieważ wytwarzają najwięcej metabolitów pierwszej generacji i mają wysoki udział metabolitów toksycznych i/lub reaktywnych[8]. Na etapie projektowania lub modyfikowania nowych antybiotyków β -laktamowych istotne jest posiadanie wiedzy o ewentualnych miejscach szczególnie podatnych na działanie enzymów metabolizujących.

Nowoczesne podejścia eksperymentalne pozwalają na szczegółowe wyjaśnienie absorpcji, dystrybucji, mechanizmu, wydalania i toksyczności, ale są kosztowne i czasochłonne, dlatego pożądane jest opracowanie skutecznych i niezawodnych metod *in silico* [9]. Na początku lat 60. opracowana została koncepcja ilościowej zależności struktura-aktywność (ang. *Quantitative structure-activity relationship*, QSAR), później szeroko stosowana w odkrywaniu leków. Koncepcja zakłada, że cząsteczki o podobnej strukturze potencjalnie wykazują podobną aktywność chemiczną i biologiczną. Podejście QSAR wykorzystuje eksperymentalne zbiory danych obejmujące aktywność biologiczną związków chemicznych; ich cechy chemiczne i fizyczne, jak również statystyczne metody korelacji tych cech z aktywnością biologiczną [10]. Modele QSAR, które przewidują przemianę metaboliczną związków endogennych lub egzogennych, są konstruowane dla enzymów wątrobowych z rodziny CYP450 jako związków dostarczających cennych informacji do wirtualnego badania skuteczności leków na dużą skalę [11].

Obecnie stosuje się zaawansowane metody oparte na uczeniu maszynowym definiowanego jako metoda obliczeniowa ucząca się na podstawie zestawu danych testowych celem zbudowania modelu klasyfikowania nieznanymi danymi. Szybki postęp w opracowywaniu nowych metod uczenia maszynowego pozwoliło na rozwój tysięcy modeli QSAR do dokładniejszego przewidywania metabolizmu leków [12]. Uczenie maszynowe lepiej nadaje się do wyodrębniania nieparametrycznych i nieliniowych relacji ze zbiorów danych, co umożliwia tworzenie modeli *in silico* o lepszej wydajności predykcyjnej [13]. Zastosowanie podejść do uczenia maszynowego we współczesnym odkrywaniu leków przyspieszyło proces skanowania i filtrowania nieskutecznych związków, osiągając

znaczną redukcję czasu i kosztów w porównaniu z eksperymentalnymi metodami przesiewowymi [14].

W dziedzinie komputerowego wspomaganie odkrywania leków uczenie maszynowe od niedawna stosuje się w celu przewidywania interakcji między ligandem a białkiem docelowym [15]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na przewidywanie toksyczności leków z wykorzystaniem sieci neuronowych, które są jednymi z metod uczenia maszynowego [16]. Poznanie właściwości strukturalnych białka umożliwia zaprojektowanie skutecznych ligandów, a tym samym stwierdzenie czy dany lek będzie aktywny terapeutycznie, nieaktywny czy toksyczny. Najnowocześniejsze oparte na identyfikacji miejsca metabolizmu obejmują dokowanie obliczeniowe oraz dynamikę molekularną. Metody dokowania zostały skrupulatnie zastosowane do przewidywania *in silico* toksyczności antybiotyków β -laktamowych, co pozwala na identyfikację wiązania związku wiodącego z niekorzystnymi białkami oraz przewidywanie niepożądanych skutków ubocznych [17].

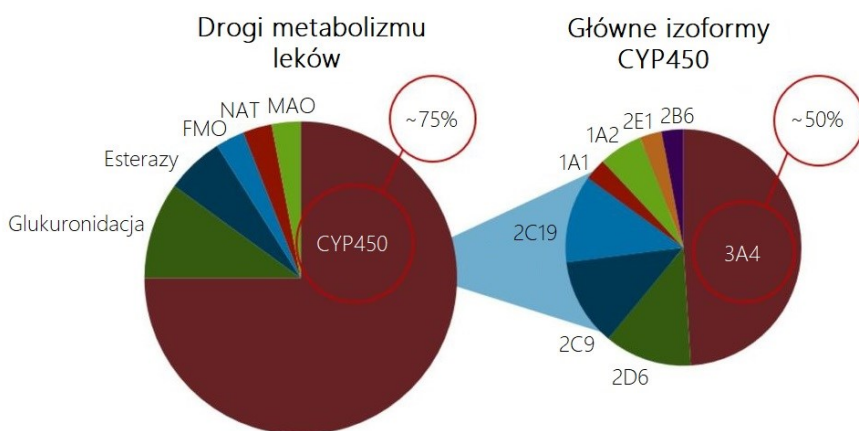
W oparciu o powstałe algorytmy zaprojektowano wiele programów komputerowych umożliwiających przewidywanie metabolizmu nowych cząsteczek o aktywności biologicznej. Jednym z takich programów jest stworzony przez firmę Molecular Discovery Ltd., MetaSite, bazujący na strukturze 2D substratu i 3D enzymu. Program obejmuje obliczenie dwóch zestawów deskryptorów, jednego dla enzymu CYP i jednego dla potencjalnego substratu, reprezentujących odpowiednio chemiczny odcisk palca enzymu i substratu [18]. Innym programem jest Meteor (Lhasa Ltd.), stanowiący bazę danych dotyczącą zależności pomiędzy strukturą danej cząsteczki, a kierunkiem jej biotransformacji (reakcje I i II fazy). Dzięki temu możliwe jest przewidzenie nie tylko powstających metabolitów, ale również określenia prawdopodobieństwa ich wystąpienia *in vivo* [19].

Poważnym problemem jest jednak niespójność dostępnych danych eksperymentalnych wykorzystywanych do budowy modeli *in silico*. Wynika to ze zmienności biologicznej i błędów technicznych, które mogą prowadzić do błędnych danych [20]. Metody *in silico* stanowią ogromną innowację w wysiłkach zmierzających do przewidywania losu leków, jednak konstrukcja wiarygodnych modeli predykcyjnych ciągle pozostaje wyzwaniem [21-22].

3. PODEJŚCIA *IN VITRO* W BADANIACH METABOLIZMU ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH

Dla większości antybiotyków β -laktamowych główną drogą eliminacji jest biotransformacja przy udziale izoenzymów cytochromu P450. Ich działanie ma na celu przekształcenie docelowych związków w bardziej polarne. Tak zmodyfikowane leki mogą być również wykorzystane jako substraty w reakcjach

fazy II. Główne izoformy ludzkiego CYP biorące udział w metabolizmie leków to CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A4, z których ta ostatnia jest odpowiedzialna za przemianę prawie 50% znanych związków biologicznie aktywnych. Do kluczowych enzymów fazy II zaliczyć można zależną od UDP (urydyno-5'-difosforan) glukuronozylotransferazę (UGT), sulfotransferazę fenolową (PST), sulfotransferazę estrogenu (EST) i S-transferazę glutationu (GST). Podobnie jak CYP, enzymy II fazy również istnieją w postaci wielu izoform (Rys. 4). Przebieg biotransformacji jest kluczowym wyznacznikiem ważnych właściwości leku, w tym stabilności metabolicznej, interakcji lek-lek oraz jego toksyczności [23-25].



Rysunek 4. Izoenzymy cytochromu P450 biorące udział w metabolizmie antybiotyków β -laktamowych
 Figure 4. Cytochrome P450 isoenzymes involved in β -lactam antibiotics metabolism

Największym wyzwaniem w badaniach nad metabolizmem antybiotyków β -laktamowych u ludzi jest to, aby dokonać wiarygodnych ekstrapolacji z modelu *in vitro* lub *in vivo* w praktyce klinicznej. Dlatego też celem jest stworzenie warunków eksperymentalnych zapewniających uzyskanie produktów analogicznych do tych, które powstają naturalnie w ludzkim organizmie. W związku z tym opracowano kilka modeli *in vitro* m.in. supersomy ludzkiego CYP i UGT, mikrosomy ludzkiej wątroby, frakcję cytozolową i S9 ludzkiej wątroby, linie komórkowe wątroby, transgeniczne linie komórkowe, hepatocyty, skrawki wątroby oraz izolowaną perfundowaną wątrobę. Dominującym czynnikiem wpływającym na wyniki badań *in vitro* jest jakość pobranego materiału. Optymalny system modelowy zależy od wielu czynników. Zalicza się do nich m.in. podobieństwo *in vivo*, koszt, dostępność oraz względy etyczne [23-25].

4. INKUBACJA ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH Z ENZYMAMI WĄTROBOWYMI FRAKCJI MIKROSOMALNEJ

Ponad 90% reakcji oksydacyjnych fazy I metabolizmu jest katalizowanych przez monooksygenazy obecne w wątrobie z tego też względu w badaniach metabolicznych jako narzędzie *in vitro* powszechnie stosowane są mikrosomy ludzkiej bądź zwierzęcej wątroby. Takie podejście sprawia, że enzymy działają w swoim naturalnym środowisku, umożliwiając tym samym powstawanie pełnego zakresu produktów metabolicznych. Roztwór enzymów frakcji mikrosomalnej otrzymuje się poprzez homogenizację wątroby, a następnie wirowanie homogenatu przy $9.000-10.000 \times g$ w celu uzyskania frakcji supernatantu (znanej jako S9 lub S10). Dalsze wirowanie uzyskanej frakcji przy $100.000 \times g$ prowadzi do powstania osadu mikrosomalnego zawierającego enzymy odpowiedzialne za reakcje fazy I, w tym monooksygenazy cytochromu P450 [23-25].

Największymi zaletami mikrosomów są przede wszystkim niskie koszty, prostota użycia oraz fakt, że jest to najlepiej scharakteryzowany system *in vitro* wykorzystywany do badań biotransformacji antybiotyków β -laktamowych. Poza nimi istnieją jednak pewne wady. Po pierwsze, wyników uzyskanych dla mikrosomów ludzkiej wątroby nie można wykorzystać do ilościowej oceny metabolizmu człowieka *in vivo*, ponieważ CYP i UGT nie konkurują z innymi enzymami, co ma miejsce w naturalnych warunkach. Skutkuje to szybszą biotransformacją leku w porównaniu nie tylko z sytuacją *in vivo* u ludzi, ale także z hepatocytami i skrawkami wątroby. Ponadto brak innych enzymów (np. NAT, GST, ST) i ko czynników cytozolowych może doprowadzić do pominięcia metabolitów powstałych w nienaruszonych komórkach wątroby [23-25].

Do oznaczania i identyfikacji substratów powstających w wyniku reakcji enzymatycznych powszechnie stosowana jest chromatografia cieczowa połączeniu z różnymi systemami detekcji.

5. ZASTOSOWANIE REAKTORA ELEKTORCHEMICZNEGO I SPEKTROMETRII MAS

W celu zbadania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych przed zastosowaniem ich u ludzi istnieje szereg możliwości, od badań *in vitro* po ocenę *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych. Modele zwierzęce dostarczają informacji o metabolitach, które mogą się tworzyć w wyniku biotransformacji związków w organizmie ludzkim. Z drugiej strony próbki biologiczne stanowią na tyle złożoną matrycę, że chcąc wykorzystać wcześniej wspomniane metody *in vitro*, pojawiają się pewne ograniczenia w izolowaniu powstałych produktów metabolizmu. Jedno z najbardziej postępowych narzędzi analitycznych do badania

metabolizmu antybiotyków β -laktamowych stanowi obecnie połączenie elektrochemii oraz spektrometrii mas (EC-MS). Jest to czysto instrumentalna metoda symulacji metabolizmu oksydacyjnego. Początkowo metoda ta wykorzystywana była do badania reakcji redoks różnych biocząsteczek. Rozszerzenie systemu EC-MS o możliwość rozdzielania przy zastosowaniu chromatografii cieczowej sprawiło, że został on z powodzeniem zastosowany do symulacji metabolizmu wielu związków biologicznie aktywnych, w tym antybiotyków β -laktamowych [24,25]. Podczas metabolizmu *in vivo* bezpośrednio po reakcjach fazy I następuje tworzenie koniugatów w fazie II. Możliwe jest elektrochemiczne naśladowanie obu etapów w pojedynczym eksperymencie, co zostało już zbadane na przykładzie sprzęgania leków kardiologicznych i immunosupresyjnych [26-28].

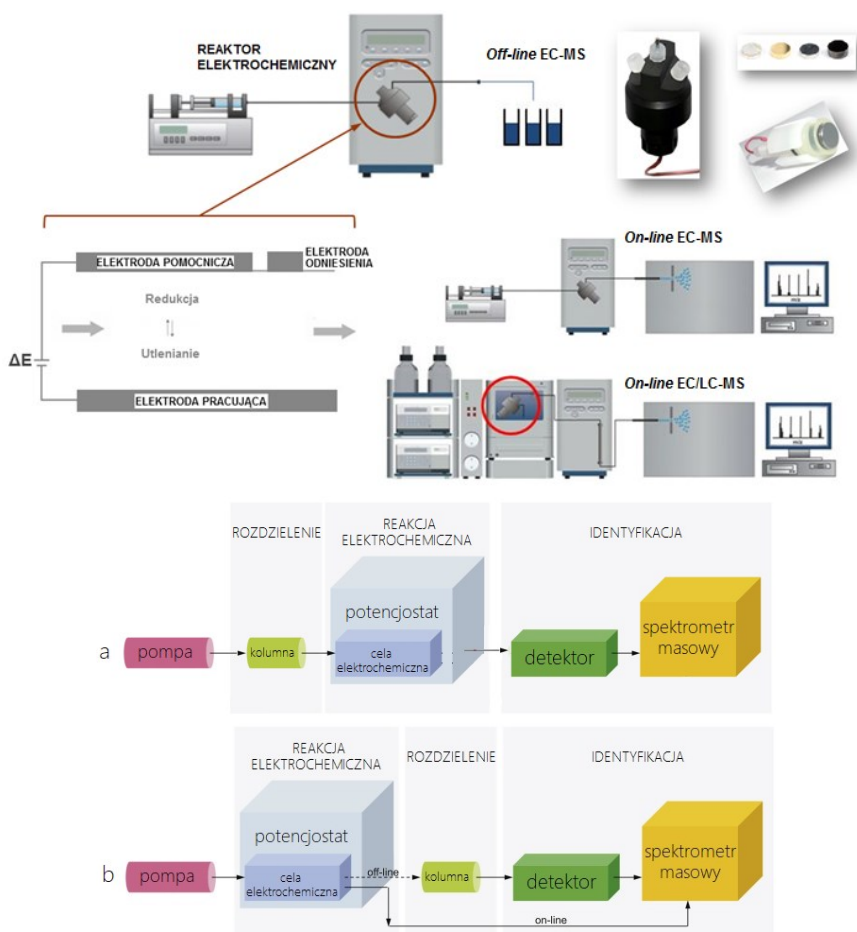
Sprzężenie EC-MS z chromatografią cieczową może odbywać się na dwa sposoby. Pierwszy z nich zakłada, że badanie elektrochemicznej konwersji dowolnej pojedynczej substancji ze złożonej mieszaniny wymaga jej rozdzielania. W tym celu wykorzystuje się procedurę obejmującą rozdzielanie poszczególnych składników metodą chromatografii cieczowej jako etap początkowy, a następnie elektrochemiczną obróbkę oraz wykrywanie za pomocą spektrometrii mas (Rys. 2.a). W ten sposób jednorazowo wykrywane są tylko produkty reakcji jednego związku. W drugim natomiast czysty materiał wyjściowy jest najpierw utleniany elektrochemicznie. Aby rozróżnić różne formy izomeryczne metabolitów oraz ocenić ich polarność, produkty rozdzielane są metodą chromatografii cieczowej, a następnie wykrywane spektrometrią mas (Rys. 2.b).

Utlenianie związków przeprowadza się w cienkowarstwowej celi elektrochemicznej wyposażonej w trzy elektrody: pracującą (WE), pomocniczą (AUX) oraz odniesienia (REF). Potencjał elektrochemiczny wytwarzany jest za pomocą potencjostatu. Aby dokonać obserwacji otrzymanych produktów utlenienia celę elektrochemiczną łączy się bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru mas. W wyniku liniowego zwiększania potencjału elektrody pracującej otrzymuje się woltamperogramy masowe przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnałów leku i jego produktów elektrochemicznych w zależności od przyłożonego napięcia.

Obserwowane procesy obejmują to m.in. reakcje N-dealkilacji, S- i P-utleniania, utleniania alkoholu i dehydrogenacji. Reakcje zapoczątkowane poprzez przeniesienie atomu wodoru nie mogą być imitowane przez bezpośrednie utlenianie elektrochemiczne, np. O-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych, co wynika ze zbyt wysokiego potencjału utleniającego niezbędnego do inicjacji procesu. Ponadto należy zauważyć, że reakcje katalizowane enzymatycznie są regioselektywne, podczas gdy

utlenianie elektrochemiczne jest chemoselektywne i daje produkty powstające z miejsc najbardziej labilnych [26-28].

Naśladowanie mechanizmu działania CYP450 za pomocą EC-MS pozwala na szybszą i znacznie łatwiejszą analizę metabolitów, a co za tym idzie, może być prowadzona na szerszą skalę. Powstające produkty charakteryzują się wysoką czystością i jest ich na tyle dużo, że mogą zostać wykorzystane jako wzorce w kolejnych badaniach. Liczne prace pozwoliły na porównanie reakcji elektrochemicznych szeregu związków biologicznie aktywnych (z różnymi grupami funkcyjnymi) z reakcjami obserwowanymi w mikrosomach wątroby. Metabolity powstające dzięki EC-MS pokazują, że istnieje duże podobieństwo pomiędzy reakcjami przeprowadzanymi przez CYP450 a reakcjami elektrochemicznymi zachodzącymi w odpowiednich warunkach eksperymentalnych.



Rysunek 5. Schemat konfiguracji LC/EC/MS (a) oraz EC/LC/MS (b)
Figure 5. Scheme of LC/EC/MS (a) and EC/LC/MS (b) setup

6. METODY ANALITYCZNE W OZNACZENIU I IDENTYFIKACJI ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH

Techniki analityczne stosowane do wielowymiarowej analizy metabolitów antybiotyków β -laktamowych, w układach biologicznych muszą cechować się wysoką dokładnością, specyficnością i selektywnością w celu monitorowania wielu znanych i nieznanymi cząsteczek o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i masach cząsteczkowych. Jak dotąd, nie wybrano jednej dokładnej metody analitycznej, która pozwoliłaby na identyfikację wszystkich obecnych metabolitów. Spośród metod analitycznych wykorzystywanych w metabolomice powszechnie stosuje się technikę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *Nuclear magnetic resonance*), spektroskopii Ramana oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*) w połączeniu z technikami chromatograficznymi i elektromigracyjnymi. Spektrometria mas jest obecnie najważniejszą metodą identyfikacji substancji wykorzystywaną w metabolomice. Zalety tej techniki to przede wszystkim bardzo wysoka czułość oraz niewielka ilość próbki (μ l) potrzebna do analizy. Należy jednak pamiętać, że wybór źródła jonów, analizatora mas, trybu akwizycji i parametrów instrumentalnych dla danej analizy zależą od właściwości fizykochemicznych badanych analitów oraz celów eksperymentalnych (jakościowych lub ilościowych). Najczęściej stosowanym połączeniem jest sprzężenie spektrometrii mas i technik chromatograficznych (chromatografia ciekłowa, gazowa), o czym świadczą liczne publikacje naukowe. Techniki te charakteryzuje wysoka czułość i selektywność względem badanych analitów [29,30]. Obie te techniki są urozmaiczone poprzez zastosowanie różnych źródeł jonów, analizatorów mas, trybu akwizycji i parametrów instrumentalnych.

Metoda LC-MS zajmuje się oznaczaniem polarnych i niepolarnych związków. Istnieje wiele technik chromatografii ciekłowej, lecz obecnie w połączeniach ze spektrometrami mas zastosowanie znajdują dwie techniki chromatograficzne: wysokosprawna (HPLC) i ultrawysokosprawna (UHPLC) chromatografia ciekłowa. UHPLC to lepsza i bardziej zawansowana technika chromatografii ciekłowej niż HPLC. Poprzez zastosowanie bardzo małych rozmiarów ziaren w kolumnie (1,7 μ m) oraz wysokiego ciśnienia (60 MPa) można uzyskać większą sprawność kolumny, większą czułość, skrócenie czasu analizy oraz mniejsze zużycie odczynników. Mimo różnic obie te techniki są szeroko wykorzystywane w badaniu metabolitów antybiotyków β -laktamowych. Najczęściej stosowaną fazą stacjonarną do tego typu badań jest kolumna z fazą odwróconą (RP, ang. *Reverse phase*), w której do żelu krzemionkowego przyłączone są łańcuchy alkilowe C8 lub C18. Przy rozdzielaniu bardzo polarnych związków stosuje się kolumny z wypełnieniem

hydrofilowym (HILIC, ang. *Hydrophilic interaction chromatography*) oraz kolumny chromatograficzne wypełnione niemodyfikowanym żel krzemionkowym (NP, ang. *Normal phase*) [31,32]. Faza ruchoma powinna zawierać lotne rozpuszczalniki, które nie będą się osadzać we wnętrzu spektrometru mas. W tym celu stosuje się lotne dodatki, takie jak kwas mrówkowy lub octowy (0,1%), albo ich sole – octan amonu/mrówczan amonu (2–10 mmol/l). Do najpopularniejszych technik stosowanych do wykrywania i identyfikacji metabolitów antybiotyków β -laktamowych należą: jonizacja typu elektrorozpylanie (ESI, ang. *Electrospray ionization*), jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. *Atmospheric pressure chemical ionization*) i jonizacja laserowa wspomagana matrycą pod ciśnieniem atmosferycznym (API-MALDI, ang. *Atmospheric pressure ionization-matrix assisted laser desorption/ionization*). W technice tej można wykorzystywać różne analizatory mas, takie jak analizator czasu przelotu (TOF), wysokorozdzielczy analizator mas typu Orbitrap oraz pułapkę jonów (IT, ang. *Ion trap*), lecz coraz częściej zastosowanie znajdują układy analizatorów w tandemowych spektrometrach mas (MS/MS), gdzie występują dwa analizatory i komora zderzeń. Do najpopularniejszych układów MS/MS należą: potrójny kwadrupol (QQQ) i analizator czasu przelotu w połączeniu z kwadrupolem (Q-TOF) (Tab. 1).

Techniką ściśle związaną z chromatografią jest również elektroforeza kapilarna (CE, ang. *Capillary electrophoresis*). To stosunkowo nowa technika stosowana do oznaczania i identyfikacji różnych leków, w tym antybiotyków β -laktamowych. W zależności od mechanizmu separacji wyróżnić można elektroforezę stref kapilarnych (CZE, ang. *Capillary zone electrophoresis*), micelną elektrokinetyczną chromatografię kapilarną (MEKC, ang. *Micellar electrokinetic chromatography*), elektroforezę kapilarną w układzie niewodnym (NACE, ang. *Non-aqueous capillary electrophoresis*) oraz izotachoforezę kapilarną (CITP, ang. *Capillary isotachopheresis*). Istotną zaletą CE jest jej dostępność i prostota wyposażenia, a także zastosowanie niewielkich stężeń rozpuszczalników organicznych w buforze oraz przede wszystkim krótki czas trwania analizy i wysoka skuteczność separacji analitów, w tym antybiotyków β -laktamowych.

Większość proponowanych metod elektroforetycznego rozdzielania antybiotyków β -laktamowych w różnych matrycach opiera się na wykorzystaniu różnych sposobów detekcji, w tym spektrofotometrii (UV) w połączeniu z matrycą diodową (DAD, ang. *Diode array detection*), fluorescencji (FD, ang. *Fluorescence detection*), detekcji elektrochemicznej (ECD, ang. *Electrochemical detection*) oraz fluorescencji wzbudzonej laserem (LIF, ang. *Laser induced fluorescence*). Ponadto ostatnio stosowane są również inne, bardziej nowatorskie metody detekcji, takie jak bezkontaktowe wykrywanie przewodności (C⁴D, ang. *Capacitively coupled*

contactless conductivity detection) czy wykrywanie potencjalnego gradientu (PGD, ang. *Procedure design gradient*).

Tabela 1. Porównanie parametrów różnych analizatorów mas stosowanych w identyfikacji antybiotyków β -laktamowych

Table 1. Comparison of parameters of various mass analyzers applied for identification of β -lactam antibiotics

Parametr	Kwadrupol (Q)	Pułapka jonowa (IT)	Analizator czasu przelotu (TOF)	Orbitrap
Szybkość zbierania danych [Hz]	2–10	2–10	10–100	1–18
Dokładność pomiaru masy [ppm]	Niska	Niska	1–10	1–5
Zakres pomiaru masy, m/z	< 3000	< 6000	< 100 000 bez ograniczeń	< 6000
Rozdzielczość	Jednostka	Jednostka	< 50 000	< 500 000
Zalety	Łatwa aplikacja różnych źródeł jonizacji Szeroki zakres dynamiczny	Łatwa aplikacja różnych źródeł jonizacji Szeroki zakres dynamiczny MS ⁿ	Duża szybkość skanowania Szeroki zakres mas Duża dokładność pomiaru masy	Duża dokładność pomiaru masy Możliwość analizy w dwóch polaryzacjach jednocześnie
Wady	Niska rozdzielczość Mała dokładność pomiaru masy Wąski zakres mas Mała szybkość skanowania MS/MS wymaga kilku analizatorów	Niska rozdzielczość Mała dokładność pomiaru masy Wąski zakres mas Mała szybkość skanowania	Węższy zakres dynamiczny w porównaniu z Q	Mniejsza szybkość skanowania w porównaniu z Q-TOF Węższy zakres dynamiczny w porównaniu z Q

MS – spektrometria mas, m/z – stosunek masy do ładunku elektrycznego,ⁿ – wielokrotna fragmentacja

UWAGI KOŃCOWE

Związki biologicznie aktywne, w tym antybiotyki β -laktamowe, występują w próbkach biologicznych na stosunkowo niskich poziomach stężeń. Istotnym etapem w analizie leków dla potrzeb metabolomicznych jest wybór metody przygotowania próbki. Badania te wymagają również aplikacji odpowiedniej techniki analitycznej dla oznaczenia endogennych metabolitów obecnych w matrycy biologicznej. Poszukiwanie alternatywnych metod badania biotransformacji antybiotyków β -laktamowych jest bardzo pożądane, ze względu na możliwość zmniejszenia liczby zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w badanych biomedycznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca została sfinansowana z GRANTU MŁODYCH dla uczestników studiów doktoranckich z zakresu chemii oraz szkoły doktorskiej nauk ścisłych i przyrodniczych (PDB/granty wydziałowe, 2021, D. Janiszewska).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.B. Holten, E.M. Onusko, *Am FamPhysican*, 2000, **62**, 611.
- [2] J.F. Martín, R.V. Ullán, *MicrobBiotechnol*, 2010, **3**, 285.
- [3] K.M. Percival, *J InfusNurs*, 2017, **40**, 55.
- [4] G.G. Zhanel, R. Wiebe, L. Dilay, K. Thomson, E. Rubinstein, D.J. Hoban, A.M. Noreddin, J.A. Karlowsky, *Drugs*, 2007, **67**, 1027.
- [5] S.B. Singh, K. Young, L.L. Silver, *BiochemPharmacol*, 2017, **133**, 63.
- [6] P.B. Eckburg, T. Lister, S. Walpole, T. Keutzer, L. Utley, J. Tomayko, E. Kopp, N. Farinola, S. Coleman, *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, **3**, e00892.
- [7] K. Pauter, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Molecules*, 2020, **25**, 2556.
- [8] B. Testa, A. Pedretti, G. Vistoli, *Drug Discov Today*, 2012, **17**, 549.
- [9] J. Kirchmair, A.H. Göller, D. Lang, J. Kunze, B. Testa, I.D. Wilson, R.C. Glen, G. Schneider, *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14**, 387.
- [10] K. Roy, S. Kar, R.N. Das, *Chemical Information and Descriptors, Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, Academic Press, Boston, 2015.
- [11] M.P. Gleeson, A.M. Davis, K.K. Chohan, S.W. Paine, S. Boyer, C.L. Gavaghan, C.H. Arnbj, C. Kankkonen, N. Albertson, *J Comput Aided Mol Des*, 2007, **21**, 559.
- [12] M.I. Jordan, T.M. Mitchell, *Science*, 2015, **349**, 255.
- [13] J.B.O. Mitchell, *Wiley Interdiscip Rev Comput. Mol. Sci*, 2014, **4**, 468.
- [14] N. Fleming, *Nature*, 2018, **557**, 55.
- [15] Y.-C. Lo, S.E. Rensi, W. Torng, R.B. Altman, *Drug Discov Today*, 2018, **23**, 1538.
- [16] S. Ekins, *Pharm Res*, 2016, **33**, 2594.
- [17] Z. Yao, Z. Lin, T. Wang, D. Tian, X. Zou, Y. Gao, D. Yin, *Chemosphere*, 2013, **92**, 1169.
- [18] G. Cruciani, E. Carosati, B. De Boeck, K. Ethirajulu, C. Mackie, T. Howe, R. Vianello, *J Med Chem*, 2005, **48**, 6970.
- [19] C.A. Marchant, K.A. Briggs, A. Long, *ToxicolMech Methods*, 2008, **18**, 177.
- [20] A.B. Raies, V.B. Bajic, *Wiley Interdiscip Rev ComputMolSci*, 2016, **6**, 147.
- [21] M.T.D. Cronin, J.C. Madden, *In Silico Toxicology Principles and Applications*, RSC Publishing, Liverpool, 2010.
- [22] S.R. Kazmi, R. Jun, M.-S. Yu, Ch.Jung, D. Na, *ComputBiol Med*, 2019, **106**, 54.
- [23] F.A. Esther, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, J. H.M. Schellens, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, **189**, 233.
- [24] M. Szultka, R. Krzeminski, M. Jackowski, B. Buszewski, *Chromatogr.*, 2014, **77**, 1027.
- [25] M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, **176**, 112799.
- [26] U. Karst, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2476.
- [27] M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski, *Talanta*, 2016, **160**, 694.
- [28] M. Szultka-Mlynska, D. Janiszewska, B. Buszewski, *Materials*, 2021, **14**, 1.
- [29] W.M. Mullet, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2007, **70**, 263.
- [30] M. Szultka-Mlynska, P. Pomastowski, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2018, **1086**, 153.
- [31] S. Noga, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, **402**, 231.

[32] B. Buszewski, M. Szultka-Mlynska, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2012, **42**, 198.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 listopada 2021 r.

