



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Przemysław Danek

Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

Prof. dr hab. Władysława Anna Daniel (Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN)

Prof. dr hab. Wojciech Piekoszewski (Wydział Chemii UJ)

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Enzymy cytochromu P450 odpowiedzialne są za metabolizm większości leków i innych ksenobiotyków (promutageny, prokancerogeny) oraz substancji endogennych, takich jak cholesterol, steroidy, neuroprzekaźniki monoaminergiczne oraz witaminy. Największe stężenie tych enzymów stwierdza się w wątrobie, gdzie mają miejsce procesy detoksykacyjne w organizmie, lecz zostały one także zidentyfikowane w innych tkankach, takich jak mózg.

Podczas leczenia schizofrenii neuroleptyki są podawane przewlekle i mogą być łączone z innymi lekami psychotropowymi lub lekami należącymi do innych grup farmakologicznych (np. z lekami kardiologicznymi lub antybiotykami), które pacjenci przyjmują jednocześnie. Może to prowadzić do interakcji farmakokinetycznych na poziomie metabolizmu katalizowanego przez cytochrom P450, które czasami są niebezpieczne dla pacjentów. Ze względu na różnice w składzie jakościowym i ilościowym izoenzymów cytochromu P450 w mózgu i wątrobie, a także różnice w regulacji enzymów w poszczególnych narządach lub tkankach, wydaje się celowe zbadanie wpływu długotrwałego podawania nowych atypowych neuroleptyków na ekspresję cytochromu P450 nie tylko w wątrobie, ale także w mózgu, tj. w miejscu działania leków psychotropowych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu atypowych neuroleptyków – asenapiny, iloperidonu i lurasidonu na aktywność oraz ekspresję cytochromu P450 w mózgu i wątrobie. W tym celu wykorzystano kilka modeli badawczych. W **modelu I** badano bezpośredni wpływ leków na aktywność enzymów CYP w ludzkich mikrosomach wątrobowych oraz Supersomach zawierających rekombinowane ludzkie enzymy CYP o zdefiniowanej ekspresji. Szybkość specyficznych reakcji metabolicznych mierzono w nieobecności oraz obecności leku przeciwpsychotycznego dodanego *in vitro*. Uzyskane wyniki badań wskazują, że asenapina silnie hamowała CYP1A2 i CYP2D6 i słabo zmniejszała aktywność CYP3A4. Iloperidon silnie hamował CYP3A4 i CYP2D6. Ponadto, umiarkowanie zmniejszał aktywność CYP2C19 i słabo wpływał na CYP1A2. W przypadku lurasidonu obserwowano silne hamowanie CYP2C9, umiarkowane hamowanie CYP1A2 i CYP2C19 oraz CYP3A4.

W **modelu II** badano pośredni wpływ leków na aktywność oraz ekspresję enzymów CYP w ludzkich kriokonserwowanych hepatocytach, które traktowane były neuroleptykami przez 72 h. Szybkość specyficznych reakcji metabolicznych mierzono przy pomocy specyficznych substratów dodanych do medium inkubacyjnego, a ekspresję genów CYP mierzono za pomocą oznaczenia poziomu mRNA enzymów CYP w komórkach wątroby. W hodowli ludzkich hepatocytów asenapina i iloperidon w stężeniach terapeutycznych zmniejszały ekspresję i aktywność odpowiednio enzymów CYP1A2 i CYP3A4. Lurasidon w tym badaniu nie wpływał na zmiany aktywności i ekspresji badanych enzymów CYP. Hamowanie ekspresji enzymów CYP przez badane neuroleptyki może spowolnić metabolizm substratów tych enzymów *in vivo* i zwiększyć ich stężenie, co może skutkować większą częstością i/lub nasileniem działań niepożądanych.

W **modelu III** przeprowadzono badania porównawcze bezpośredniego wpływu neuroleptyków na aktywność enzymu CYP2D w szczurzej wątrobie i mózgu. W tym modelu doświadczalnym zostały użyte szczurze kontrolne mikrosomy wątrobowe oraz mikrosomy mózgowe otrzymane z całych mózgów. Szybkość specyficznej reakcji metabolicznej mierzono w nieobecności oraz obecności leku przeciwpsychotycznego dodanego *in vitro*. Atypowe neuroleptyki hamują aktywność enzymu CYP2D (poprzez wiązanie z enzymem) w mikrosomach mózgowych. Wyznaczone stałe hamowania K_i dla mikrosomów mózgowych są znacznie wyższe od tych wyznaczonych w mikrosomach wątrobowych. Efekt ten może wynikać z słabszego powinowactwa badanych leków do centrum aktywnego CYP2D w mózgu niż do CYP2D w wątrobie.

W **modelu IV** badano wpływ chronicznego podania neuroleptyków na aktywność oraz ekspresję enzymów CYP w szczurzej wątrobie. W doświadczeniu tym posłużono się mikrosomami wątrobowymi zwierząt, którym podawano lek przez okres dwóch tygodni. Specyficzne substraty dodawano do mieszaniny inkubacyjnej *in vitro*, a szybkość specyficznych reakcji badano w

nieobecności leków, które podane chronicznie *in vivo* zostały wyflukane *in vitro*. W otrzymanych mikrosomach zmierzony został poziom białka odpowiednich enzymów CYP, a także poziom mRNA odpowiednich genów enzymów CYP. Dodatkowo, w surowicy oraz w przysadkach mózgowych oznaczono poziomy hormonów regulujących ekspresję genów CYP, przy użyciu zestawów ELISA. Otrzymane wyniki wykazały, że chroniczne podawanie asenapiny i iloperidonu obniża ekspresję (poziom mRNA i białka) i aktywność cytochromu P450 i może spowolnić metabolizm substratów CYP1A, CYP2B, CYP2C11, CYP2D i CYP3A (steroidów i/lub leków). Obserwowany wpływ badanych neuroleptyków na cytochrom P450 może być związany z ich działaniem farmakologicznym (w szczególności na receptory D₂, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} i α₂), co wpływa na regulację endokrynną wątrobowych enzymów CYP oraz szlaki sygnałowe pośredniczące w ekspresji enzymów w wątrobie.

W **modelu V** badano wpływ chronicznego podania leków na aktywność oraz ekspresję enzymu CYP2D w szczurzym mózgu. W modelu tym użyto mikrosomów pochodzących z struktur mózgowych szczura, którym podawano lek przez okres dwóch tygodni. Specyficzny substrat dodawano do mieszaniny inkubacyjnej *in vitro*, a szybkość specyficznej reakcji badano w nieobecności leków, które podane chronicznie *in vivo* zostały wyflukane *in vitro*. Zmierzony został również poziom białka i mRNA enzymu CYP2D4. Badane atypowe neuroleptyki wpływały na enzym CYP2D w mózgu w sposób zależny od struktury. Poprzez modulację enzymów CYP w mózgu leki te mogą wpływać na lokalny metabolizm leków i substancji endogennych, takich jak neurosteroidy i przekaźniki monoaminergiczne. Zmniejszenie aktywności CYP2D przez badane leki może spowolnić metabolizm oksydacyjny neurosteroidów (poprzez 21-hydroksylację) i wywierać korzystny wpływ na objawy schizofrenii. Natomiast, zwiększenie aktywności CYP2D w strukturach mózgu szlaku czarnoprążkowiowego może nasilać lokalną syntezę dopaminy (poprzez hydroksylację tyraminy) i serotoniny (poprzez O-demetylację 5-metoksytryptaminy), a tym samym łagodzić uboczne objawy pozapiramidowe neuroleptyków.

Wydaje się zatem, że leki psychotropowe mogą wpływać na cytochrom P450 w wątrobie poprzez różne mechanizmy bezpośrednie i pośrednie, na poziomie wątroby i mózgu. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność testowania nowych leków neuroaktywnych pod kątem ich interakcji z cytochromem P450 nie tylko *in vitro*, ale także *in vivo*, co pozwala na obserwację pełnego spektrum ich mechanizmów działania na ekspresję i aktywność cytochromu P450, biorąc pod uwagę ich działanie w mózgu i narządach obwodowych (w wątrobie), w tym ich wpływ na regulację neuroendokrynną enzymu.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)

Cytochrome P450 enzymes are responsible for the metabolism of most drugs and other xenobiotics (promutagens, procarcinogens) and endogenous substances, such as cholesterol, steroids, monoaminergic neurotransmitters and vitamins. The highest concentrations of these enzymes are found in the liver, where detoxification processes take place in the body, but they have also been identified in other tissues, such as the brain.

During treating schizophrenia, neuroleptics are administered for a long time and may be combined with other psychotropic drugs or drugs belonging to other pharmacological groups (e.g. with cardiological drugs or antibiotics), which patients are taking simultaneously. This can lead to pharmacokinetic interactions at the level of cytochrome P450 metabolism that are sometimes dangerous for patients. Due to the differences in the qualitative and quantitative composition of the cytochrome P450 enzymes in the brain and liver, as well as the differences in the regulation of enzymes in individual organs or tissues, it seems advisable to investigate the effect of long-term administration of new atypical neuroleptics on the expression of cytochrome P450 not only in the liver, but also in the brain, i.e. at the site of action of psychotropic drugs.

The aim of this dissertation was to investigate the influence of atypical neuroleptics – asenapine, iloperidone and lurasidone on the activity and expression of cytochrome P450 in the brain and liver. For this purpose, several experimental models were used. **Model I** investigated the direct effect of drugs on the activity of CYP enzymes in the human liver. Human liver microsomes and supersomes containing recombinant human CYP enzymes with defined expression were used in this experimental model. The rate of specific metabolic reactions was measured in the absence and presence of an *in vitro* added antipsychotic. The obtained results indicate that asenapine strongly inhibited CYP1A2 and CYP2D6 and weakly decreased the activity of CYP3A4. Iloperidone strongly inhibited CYP3A4 and CYP2D6. In addition, it moderately decreased the activity of CYP2C19 and had little effect on CYP1A2. Strong inhibition of CYP2C9, moderate inhibition of CYP1A2 and CYP2C19, and CYP3A4 were observed with lurasidone.

Model II investigated the indirect effect of drugs on the activity and expression of CYP enzymes in the human liver. For this purpose, cultures of human cryopreserved hepatocytes were used, which had been treated with drugs for 72 h. The rate of specific metabolic reactions was measured with the specific substrates added to the incubation medium, and the expression of CYP genes was measured by determining the mRNA level of CYP enzymes in liver cells. In human hepatocyte culture, asenapine and iloperidone at therapeutic concentrations reduce the expression and activity of the

enzymes CYP1A2 and CYP3A4, respectively. Lurasidone in this study did not influence on the activity and expression of the tested CYP enzymes. Strong inhibition of CYP enzymes by the tested neuroleptics may slow down the metabolism of substrates of these enzymes *in vivo* and increase their concentration, which may result in a higher frequency and/or severity of side effects.

Model III examined the direct effects of drugs on CYP2D enzyme activity in rat liver and brain. Rat liver microsomes control and whole brain brain microsomes were used in this experimental model. The rate of the specific metabolic reaction was measured in the absence and presence of an *in vitro* added antipsychotic. Atypical neuroleptics inhibit the activity of the enzyme CYP2D (by binding to the enzyme) in the brain microsomes. The K_i inhibition constants determined for the brain microsomes are significantly higher than those determined for the liver microsomes. This effect may be due to a lower affinity of test drugs for the CYP2D active site in the brain than for CYP2D in the liver.

Model IV investigated the effect of chronic drug administration on the activity and expression of CYP enzymes in the rat liver. Liver microsomes from animals treated with the drug for two weeks were used in this experiment. Specific substrates were added to the *in vitro* incubation mixture, and the rate of specific reactions was tested in the absence of drugs which, when administered chronically *in vivo*, were washed out *in vitro*. In the obtained microsomes, the protein level of the respective CYP enzymes was measured, as well as the mRNA level of the respective CYP enzyme genes. Additionally, the levels of hormones regulating the expression of *CYP* genes in the serum and in the pituitary glands were determined using ELISA kits. The obtained results indicate that chronic administration of aripiprazole and iloperidone to rats lowers the expression (mRNA and protein levels) and activity of cytochrome P450 and may slow down the metabolism of CYP1A, CYP2B, CYP2C11, CYP2D and CYP3A substrates (steroids and / or drugs). The observed effect of the studied drugs on cytochrome P450 may be related to their pharmacological action (in particular on D_2 , 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} and α_2 receptors), which affects the endocrine regulation of hepatic CYP enzymes and signaling pathways mediating in the expression of enzymes in the liver.

Model V investigated the effect of chronic drug administration on the activity and expression of the CYP2D enzyme in the rat brain. In this model, microsomes from the appropriate brain structures of rats that had been administered the drug for a period of two weeks were used. The specific substrate was added to the *in vitro* incubation mixture, and the rate of the specific reaction was tested in the absence of drugs which, when administered chronically *in vivo*, were washed out *in vitro*. The level of CYP2D4 protein and mRNA was also measured. The atypical neuroleptics under study act on the enzyme CYP2D in the brain in a manner specific for the structure of the brain. By modulating CYP enzymes in the brain, these drugs can affect the local metabolism of drugs and endogenous

substances such as neurosteroids and monoaminergic messengers. Reduction of CYP2D activity by the studied drugs may slow the oxidative metabolism of neurosteroids (*via* 21-hydroxylation) and have a beneficial effect on symptoms of schizophrenia. On the other hand, an increase in CYP2D activity in selected brain structures (the nigrostriatal pathway) may increase the local synthesis of dopamine (through tyramine hydroxylation) and serotonin (through *O*-demethylation of 5-methoxytryptamine), and thus alleviate extrapyramidal symptoms.

It therefore seems possible that psychotropic drugs may affect the cytochrome P450 in the liver through various mechanisms involving direct and indirect mechanisms. The obtained results indicate the need to test new neuroactive drugs in terms of their interaction with the cytochrome P450 not only *in vitro*, but also *in vivo*, which allows for the observation of the full spectrum of their mechanisms of action on the expression and activity of cytochrome P450 operating in the organism, including their action in the brain and the neuroendocrine regulation of the enzyme.