

Dino Đurinek

Praćenje metabolizma anaboličko-androgenih
steroida

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko–biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemijske osnove toksičnosti endobiotika i ksenobiotika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Mirze Bojića.

Zahvaliti se želim svojim roditeljima na mogućnosti da dosegнем ovu točku obrazovanja i njihovoj neizmjernoj potpori te svojem mentoru na stručnom vodstvu kroz cijeli proces pisanja ovog rada i sveukupnoj pomoći.

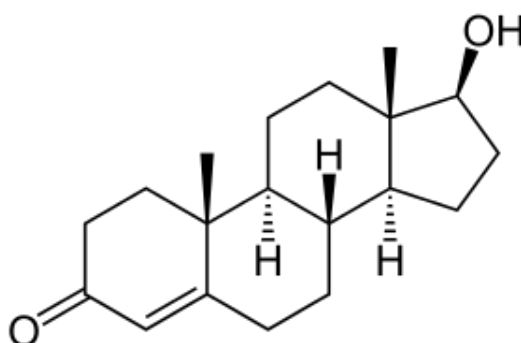
Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Povijest istraživanja anaboličko-androgenih steroida (AAS) | 2 |
| 1.2. Anaboličko-androgena svojstva steroida | 3 |
| 1.3. Odnos strukture i djelovanja anaboličko-androgenih steroida | 6 |
| 1.4. Klinička primjena anabolika | 8 |
| 1.4.1. Kaheksija i anoreksija u HIV pozitivnih i tumorskih pacijenata | 8 |
| 1.4.2. Plućne bolesti | 10 |
| 1.4.3. Jetrene bolesti | 10 |
| 1.4.4. Bubrežno zatajenje | 11 |
| 1.5. Enzimi citokroma P450 | 12 |
| 1.5.1. CYP enzimi i steroidni hormoni | 14 |
| 2. Obrazloženje teme | 15 |
| 3. Materijali i metode | 18 |
| 3.1. Kemikalije, reagensi i otapala | 19 |
| 3.2. Oprema i kemijsko posuđe | 19 |
| 3.3. Priprema reagensa | 19 |
| 3.4. HPLC analiza | 20 |
| 3.5. Oksidacija testosterona ljudskim jetrenim mikrosomima – inkubacije | 20 |
| 4. Rezultati i rasprava | 21 |
| 4.1. Rezultati | 22 |
| 4.2. Rasprava | 25 |
| 5. Zaključak | 30 |
| 6. Literatura | 32 |
| 7. Sažetak/ <i>Summary</i> | 36 |
| 8. Temeljna dokumentacijska kartica/ <i>Basic Documentation Card</i> | 39 |

1. Uvod

1.1. Povijest istraživanja anaboličko-androgenih steroida (AAS)

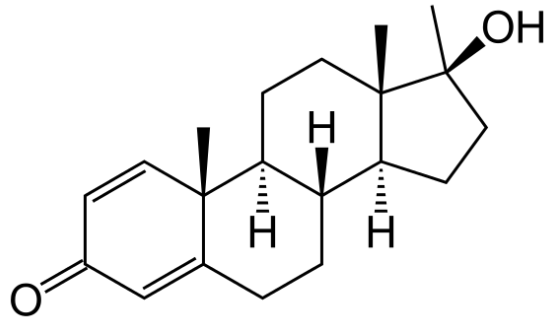
1927. godine američki profesor kemije Fred Koch te njegov asistent Lemuel McGee izolirali su tvar iz goveđih testisa i tim ekstraktom remaskulinizirali kastrirane štakore, svinje i pijetlove. Postalo je jasno da tvari prisutne u ekstraktu testisa imaju direktan utjecaj na razvoj sekundarnih spolnih karakteristika, odnosno maskulinizacije (Kuhn, 2002.). Kasnije se utvrdilo da je bila riječ o testosteronu (slika 1.). 1931. godine njemački kemičar Adolph Butenandt izolirao je androsteron iz ljudskog urina i naznačio početak jedne sasvim nove ere u kemiji, kemije steroida. U 1930-ima došlo je i do velikog međunarodnog zanimanja za steroide što je omogućilo ubrzani razvoj i sinteze mnogih strukturnih analoga testosterona.



Slika 1. Kemijska struktura testosterona

Znanstvenici Karoly David i Ernst Laqueur bili su prvi farmaceutski tim koji je izolirao i odredio strukturu testosterona. Metoda izolacije iz testisa zahtijevala je prilično veliku količinu sirovine te su 1935. godine uslijedile jeftinije metode sinteze ovih spojeva. U tim sintezama sudjelovale su tvrtke Ciba i Schering, te u prvospomenutoj i hrvatski organski kemičar Lavoslav Ružička. Zbog znatnih doprinosa kemiji steroida timovi ovih kompanija dobili su 1939. Nobelovu nagradu za kemiju. Uz testosteron, L. Ružička sintetizirao je i tri do tada nepoznata steroida: metiltestosteron, mestanolon i metandriol. Zbog ubranog razvoja i velikog interesa za steroidne spojeve do 1937. god. uslijedio je plasman injekcija testosteron-propionata te tableta metiltestosterona, poglavito u medicinske i istraživačke svrhe. Nešto kasnije, američki istraživač Charles Kochakian zajedno sa svojim suradnicima prvi je znanstveno dokumentirao vezu između upotrebe testosterona te posljedičnog povećanja mišićne mase. 1956. god. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) odobrila je primjenu sintetskog oralnog anabolika noretandrolona, pod trgovačkim nazivom Nilevar. Većina sintetskih anabolika koja je i danas u primjeni svoju

sintezu doživjela je između 1950. i 1965. godine (Müller, 2009.). Neka trgovačka imena od njih su: Dianabol, Anavar, Winstrol, Durabolin, Trenbolon acetat. Za napomenuti je da je popularni Dianabol (slika 2.) jedan od najkorištenijih sintetskih steroida ikad, prvenstveno s ciljem poboljšanja atletskih performansi i razvoja mišićne mase u svijetu natjecateljskog, ali i amaterskog bodybuilding-a (Kopera, 1985.)



Slika 2. Kemijska struktura metandienona

1.2. Anaboličko-androgena svojstva steroida

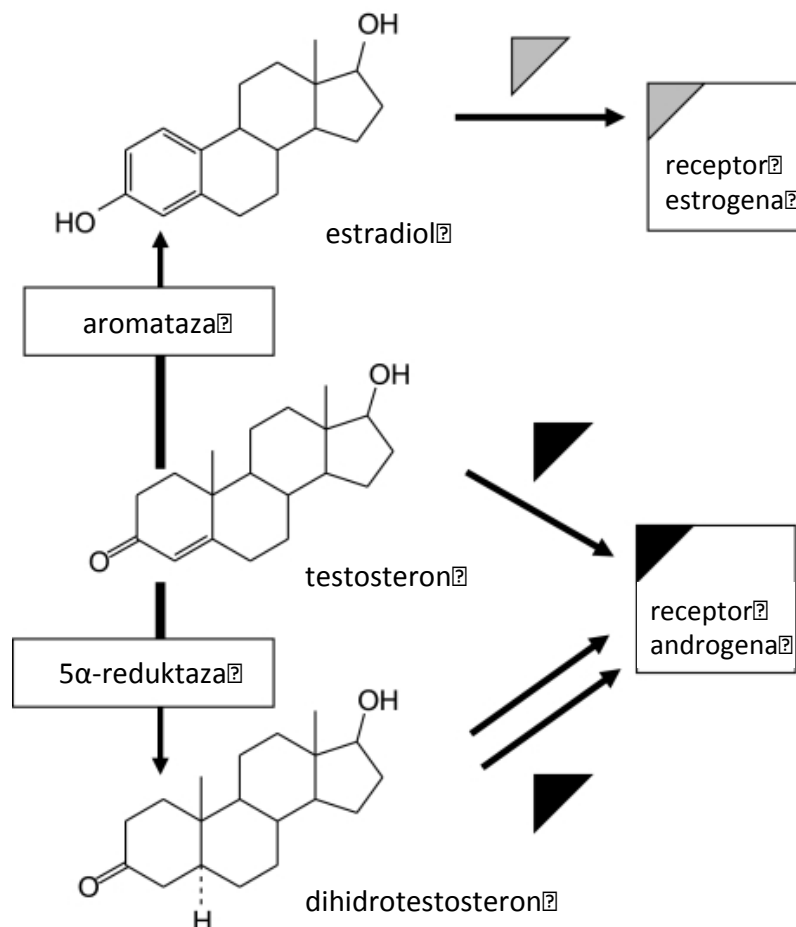
Anaboličko-androgena skupina spojeva okuplja sintetske varijante muškog spolnog hormona testosterona s pripadajućim androgenim i anaboličkim učincima. Svoj androgeni učinak ispoljavaju u mnogim dijelovima tijela, uključujući mišićno i koštano tkivo, reproduktivni sustav, folikule dlaka, jetru i bubrege. Također, velik utjecaj ostvaruju i u hematopoetskom, imunološkom i središnjem živčanom sustavu. Općenito, androgeni učinak vidljiv je kao proces eksterne maskulinizacije tijela, dok se anabolički učinak očituje kao povećana sinteza proteina, uglavnom u mišićno – koštanom tkivu. Svoj učinak androgeni već imaju u razvoju muškog fetusa, kada stimuliraju razvoj Wolffianovih kanala i vanjskih genitalija. Tijekom puberteta ponovo dolazi do povećane steroidogeneze u testisima, točnije u Leydigovim stanicama gdje se odvija oko 95% ukupne sinteze muških spolnih hormona u muškom tijelu. Promjene androgene prirode koje se događaju u tom periodu brojne su: povećanje larinksa te posljedično produbljenje glasa, povećanje aktivnosti žlijezda u koži, rast dlaka u području lica te pubičnom i aksilarnom području, povećani libido i moguća agresivnost kao posljedica djelovanja na središnji živčani sustav. Anabolički učinci u vrijeme puberteta vidljivi su kao povećanje linearnog rasta koje traje do zatvaranja koštanih epifiza, rast skeletnih mišića i kosti.

Svoj anabolički učinak steroidi ostvaruju direktnim i indirektnim mehanizmima. Mnoge studije pokazale su da primijenjeni anabolici povećavaju udio nemasne tjelesne mase

u hipogonadalnih mlađih i starijih muškaraca (Katznelson i sur., 1996.). Direktni mehanizmi kojim anabolici ostvaruju svoj anabolički učinak su: povećanje sinteze kontraktilnih i nekontraktilnih proteina skeletnih mišića, povećano iskorištavanje aminokiselina i povećana količina mRNA androgenih receptora kao posljedica pojačane transkripcije (Basaria i sur., 2001.). Kao indirektni mehanizmi moguć je antiglukokortikoidni utjecaj testosterona i drugih androgena (Basaria i sur., 2001.). To se objašnjava velikim stupnjem homologije između androgenih i glukokortikoidnih receptora. Tvrdnju nadalje podupire i činjenica da se antagonizmom glukokortikoida sprječava mišićna atrofija u muškaraca koji su doživjeli orhidektomiju. Nadalje, administracija visokih doza anabolika tim muškarcima rezultirala je povećanim izlučivanjem slobodnog kortizola urinom (Wu, 1997.). Pokazano je i da su androgeni potrebni za lokalnu produkciju inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1, engl. *insulin growth factor 1*) neovisno o razinama IGF-1 u krvi i brzini stvaranja hormona rasta (GH, engl. *growth hormone*). Još jedan indirektni mehanizam anaboličkog djelovanja androgena se trenutno istražuje s vjerojatnim povoljnim ishodima. Naime, kako s godinama razine androgena opadaju moguće je da to utječe na povećane razine miostatina. Miostatin, kao protein, nepovoljno djeluje na mišićni tonus i pogoduje razvoju atrofije mišića. Dakle, androgeni bi mogli sudjelovati u direktnoj ili indirektnoj supresiji ekspresije miostatina i na taj način djelovati anabolički (Basaria i sur., 2001.).

U odraslih muškaraca, androgeni su neophodni za održavanje reproduktivnih i kognitivnih funkcija, mišićne i koštane strukture te općeg osjećaja dobrog stanja organizma. Zdravi odrasli muškarac proizvede dnevno između 2,5 i 11 mg testosterona. Oko 40% izlučenog testosterona vezano je u krvi na globulin koji veže spolne hormone (SHBG, engl. *sexual hormone binding globuline*), a oko 50% vezano je na albumin manjim afinitetom nego na SHBG te mnogo lakše disocira s njega i postaje bioraspoloživ, dok je samo oko 2% slobodnog testosterona (Basaria i sur., 2001.). Konstanta afiniteta SHBG-a za testosteron iznosi $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Kada se govori o transportu steroida u krvi prisutan je još jedan vezujući protein. To je globulin koji veže kortikosteroide te najveći afinitet ima prema kortizolu, no veže i testosteron s konstantom afiniteta (K_a) od $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Kicman, 2009.). Preostalih 5% androgena sintetizira se u nadbubrežim žlijezdama i to uglavnom kao dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) te androstendion. Perifernom biotransformacijom ovi spojevi prelaze u testosteron, a zatim se, ovisno o tkivu, može metabolizirati sam testosteron u dihidrotestosteron ili estradiol (slika 3.). Još jedan slabi endogeni androgen, androstendiol, veže se i na estrogenske receptore. Učinci androgena

modulirani su na staničnoj razini putem enzima koji pretvaraju steroida iz jednog oblika u drugi u određenom ciljnom tkivu.



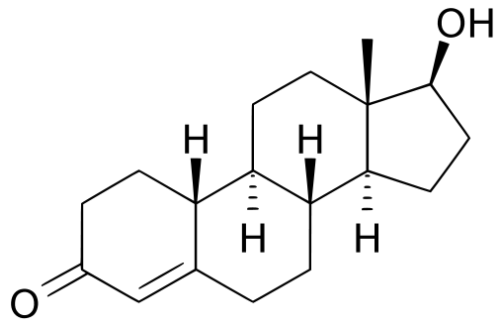
Slika 3. Biotransformacija testosterona u estradiol i dihidrotestosteron pod utjecajem aromataze i 5α-reduktaze

U reproduktivnom tkivu, žlijezdama lojnicama i koži pubičnog područja testosteron možemo smatrati prohormonom zbog brze ireverzibilne konverzije pomoću 5α-reduktaze u 5α-dihidrotestosteron koji je potentniji androgen u odnosu na testosteron jer se većim afinitetom veže za androgeni receptor (Kicman, 2008.). U nekim drugim tkivima, kao npr. masnom tkivu i određenim dijelovima mozga, testosteron se prevodi djelovanjem enzima aromataze u estrogeni hormon estradiol i kao takav ispoljava fiziološki učinak. Dakle, učinak testosterona ovisi u kojem ciljnom tkivu djeluje te o prisutnosti enzima koji ga na tom mjestu i metaboliziraju. No, testosteron i 5α-dihidrotestosteron mogu biti prevedeni u slabije androgene što će uvelike ovisiti o ciljnom tkivu u kojem djeluju i potrebnoj enzimskoj aktivnosti, kao npr. o prisutnosti enzima 3α-hidroksisteroidne dehidrogenaze ili 17β-

hidroksisteroidne dehidrogenaze. Razlike u djelovanju androgena mogu biti i posljedica nejednake distribucije koregulatora androgenih receptora u različitim tkivima. Koregulatori su proteinske molekule koje imaju utjecaj na transkripcijsku aktivnost samog androgenog receptora unutar stanice. Ovo područje se tek istražuje i napori se ulažu kako bi se otkrila važnost koregulatora u transkripcijskim procesima te njihovoj važnosti u različitim ciljnim tkivima. Jedino na staničnoj razini moguće je odvojiti anabolički od androgenog učinka ovih spojeva što uvelike ovisi o pristunim unutarstaničnim metaboličkim putevima, poglavito o prisutnosti enzima 5α -reduktaze. Inače, svaki član ove skupine spojeva ispoljava svoj anabolički i androgeni učinak u većem ili manjem opsegu. Strukturnim modifikacijama moguće je povećati samo anabolički učinak, no nije moguće potpuno odvojiti ga od androgenog učinka gledano kao ukupni učinak koji spoj ostvaruje na cijelo tijelo. Daljnji razvoj selektivnih modulatora androgenih receptora ponuditi će bolju disocijaciju bioloških učinaka te potencijalne terapijske koristi. U kahektičnih pacijenata na citostatskoj terapiji ili u HIV pozitivnih pacijenata s pretjerano smanjenom tjelesnom masom mogla bi se obnovljati izgubljena mišićna masa te snaga. Noviji specifični antagonisti moći će se upotrebljavati za terapiju tumora prostate u muškaraca te liječenje hirsutizma u žena. Uvidjevši veliki potencijal ovih spojeva kao moguće alternative anabolicima s ciljem povećanja atletske izvedbe, Svjetska antidopinška agencija (WADA, engl. *World Anti Doping Agency*) stavila ih je na listu zabranjenih supstanci 2008. godine (Müller, 2009.)

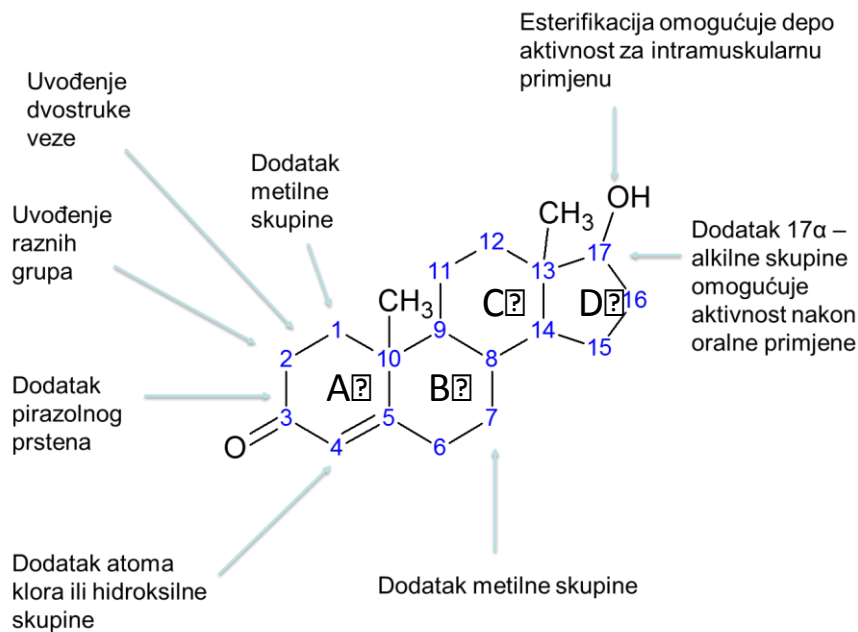
1.3. Odnos strukture i djelovanja anaboličko-androgenih steroida

U svojem osnovnom obliku testosteron se vrlo brzo apsorbira te razgrađuje, neovisno o načinu unosa u organizam. Primarno je metaboliziran pomoću citokrom P450 jetrenih enzima te ima vrlo malu bioraspodivnost i kratko vrijeme polueliminacije u nativnoj formi nakon peroralne primjene. No, razvijeni su drugi kemijski oblici testosterona upravo zato da bi se otežao i usporio jetreni metabolizam te na taj način povećala njegova sistemska bioraspodivnost. Tri su osnovne grupe androgenih analoga razvijene u tu svrhu. U prvoj grupi izvršena je esterifikacija na 17β -hidroksilnoj grupi dodavanjem ostatka određene karboksilne kiseline. Ti esteri uključuju cikloheksilpropionat, dekanat, laurat i fenilpropionat za nandrolon (slika 4.); acetat, cipionat, dekanat, enantat, izokaproat, fenilpropionat, propionat i undekanoat za testosteron; undecilenat za boldenon i acetat za trenbolon (Kicman, 2008.).



Slika 4. Kemijska struktura nandrolona

Što je kiselinski lanac duži, odnosno sadrži više ugljikovih atoma, to su ovi esteri topljiviji u lipidnim nosačima i sporija im je brzina apsorpcije od onih s manje ugljikovih atoma u bočnom lancu. Intravenskom primjenom lipidnih formulacija steroidni esteri podliježu bržoj apsorpciji te metabolizmu pomoću esteraza kako bi se oslobodila aktivna komponenta. No, takva primjena se ne preporučuje zbog povećane vjerojatnosti od razvoja tromboembolizma te se prednost daje intramuskularnoj primjeni. Općenito govoreći, esteri su manje polarni od samog testosterona te se sporije apsorbiraju iz nosača u krvotok i okolna tkiva te je i sam proces metabolizma usporen kada su primijenjeni intramuskularno. Druga grupa analoga je alkilirana na 17α položaju, kao npr. metiltestosteron. Alkilna zamjena sprječava ubrzanu razgradnju steroida tijekom prvog prolaza kroz jetra sterički otežavajući oksidaciju 17β -OH grupe (Kicman, 2008.). Metilna skupina na C-1 atomu može povećati bioraspoloživost nakon oralne primjene, kao npr. u metenolonu, no ovaj steroid ima smanjenu farmakološku aktivnost. U trećoj grupi analoga učinjene su strukturne promjene na A, B ili C prstenu steroidne jezgre, kao npr. kod mesterolona (slika 5.). Postoje i kombinacije ovih strukturnih promjena, tako da su određeni anabolici esterificirani na 17β -OH skupini te su učinjene promjene u strukturi kao u trećoj, ranije navedenoj skupini analoga.



Slika 5. Strukturne modifikacije na molekuli testosterona za povećanje anaboličke aktivnosti

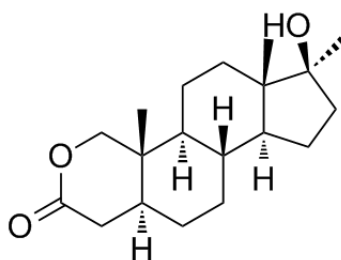
Za peroralnu primjenu u obzir dolaze spojevi iz druge i treće skupine te njihove kombinacije. Neki od njih podliježu metabolizmu prve i druge faze te se izlučuju kao konjugati, dok se neki od njih izlučuju nepromijenjeni. Ozbiljne jetrene abnormalnosti gotovo uvijek su povezane s oralno aktivnim 17α -alkiliranim steroidima kao što su metiltestosteron, metandrostenolon, oksandrolon i stanazolol (Wu, 1997.). Stupanj oštećenja razmjernan je ukupno dozi lijeka, odnosno vremenskom periodu u kojem se lijek uzimao. Postoje i transdermalne formulacije, razvijene kao oblik za nadomjesnu terapiju, uglavnom na bazi samog testosterona. To mogu biti sustavi koji se lijepe na kožu te polagano otpuštaju hormone u organizam ili oblici poput hidroalkoholnih gelova koji se primjenjuju utrljavanjem u kožu. Ovi oblici primjenjuju se na dnevnoj bazi. Drugi oblici prisutni kao brzodjelujući s izbjegavanjem prvog prolaza kroz jetra su za bukalnu ili sublingvalnu primjenu.

1.4. Klinička primjena anabolika

1.4.1. Kaheksija i anoreksija u HIV pozitivnih i tumorskih pacijenata

Kaheksija nastaje zbog disbalansa između unosa nutrijenata i potrošnje energije u stanju mirovanja, a često prati HIV pozitivne pacijente. Stupanj gubitka tjelesne mase u muških HIV pozitivnih pacijenata je u pozitivnoj korelaciji sa smanjenjem cirkulirajućih razina testosterona (Coodley i sur., 1994.). Iz toga možemo predvidjeti da bi se nadomjesnom

terapijom preparatima testosteron moglo utjecati na stanje kaheksije, odnosno povećati mišićna masa i sinteza proteina na koje upravo i endogeni testosteron utječe. Randomizirano, dvostruko slijepo, placebo-kontrolirano 16-tjedno ispitivanje testosteron enantata (100 mg/tjedno) i tjelovježbe, sami ili u kombinaciji, uspoređeno je s placebo u HIV pozitivnih muškaraca s hipogonadizmom (ukupni testosteron <350 ng/dL) te 5%-tnim smanjenjem tjelesne mase (Bhasin i sur., 2000.). Pacijentima koji su primali hormonski preparat izmjereno je ukupno povećanje tjelesne mase za 2,6 kg, od čega 2,3 kg u nemasnoj tjelesnoj masi. Isto tako, primijećeno je povećanje mišićne snage. U grupi koja je samo vježbala, bez primanja preparata, zabilježeno je povećanje ukupne tjelesne i nemasne tjelesne mase. No, u grupi koja je dobivala i hormonski preparat i odrađivala je tjelovježbu nije zabilježen veće povećanje tjelesne mase od svake ove intervencije pojedinačno. U grupa koja je primala placebo te nije vježbala zabilježen je gubitak tjelesne mase. U studiji Millera i sur. (1998.) po prvi puta je pokazano da transdermalnom primjenom testosterona u kahektičnih HIV pozitivnih žena omogućuje povećanje ukupne tjelesne mase te poboljšanje kvalitete života. Nikakve nuspojave nisu zabilježene ovom primjenom. Aktivni preparati uobičajeno se ne primjenjuju oralno zbog hepatotoksičnosti, a samom primjenom testosterona peroralno ostvaruje se vrlo mala bioraspodivnost. No oksandrolon (slika 6.), oralno aktivni analog testosterona, mogao bi biti prikladan za upotrebu kod HIV pozitivnih pacijenata s povećanim gubitkom tjelesne mase.



Slika 6. Kemijska struktura oksandrolona

Značajno povećanje ukupne i nemasne tjelesne mase zabilježeno je primjenom oksandrolona. U četveromjesečnoj randomiziranoj, placebo-kontroliranoj studiji oksandrolona (15 mg/dnevno) u 63 pacijenta s AIDS-om s više od 10%-tnim gubitkom tjelesne mase, zabilježeno je značajno povećanje tjelesne težine i apetita te poboljšane fizičke aktivnosti

(Berger i sur., 1996.). Anoreksija i gubitak tjelesne mase česta su pojava i u pacijenata s karcinomima. Za napomenuti je da kaheksija uzrokovana dugotrajnim gladovanjem nije ista kao i kaheksija uzrokovana malignim tvorbama u kojoj dolazi do jednakomjernog gubitka masti i proteina zbog pojačanog procesa glukoneogeneze (Tisdale, 1997.). Kahektični učinci karcinoma doprinose malnutriciji, ali i androgenom nedostatku (Todd, 1988.).

1.4.2. Plućne bolesti

Studije pokazuju potencijalnu primjenu anaboličkih steroida u pacijenata s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB) te povezanim gubitkom tjelesne težine. Režim koji se sastojao od tjelovježbe, 250 mg testosterona intramuskularno na početku ispitivanja te 12 mg/dnevno peroralno stanozolola kroz 27 tjedana pokazao je značajno povećanje tjelesne mase, indeksa tjelesne mase, nemasne tjelesne mase i mišićne veličine u odnosu na skupinu koja je samo vježbala (Ferreira i sur., 1998.). No, nisu zabilježene promjene maksimalnog inspiracijskog kapaciteta i fizičke izdržljivosti. Jedna studija pratila je 217 pacijenata s KOPB-om koji su nasumično podijeljeni u dvije grupe. Prva grupa dobivala je nandrolon dekanoat, adekvatnu prehranu i bavila se tjelovježbom, dok u drugoj grupi nije bilo primjene nandrolona. Na kraju je zabilježeno značajno poboljšanje maksimalnog inspiracijskog kapaciteta te povećanje nemasne tjelesne mase u skupini koja je primala nandrolon (Schols i sur., 1995.). Terapija oksandrolonom (20 mg/dnevno) u tetraplegičnih pacijenata dovela je do poboljšanja respiratornih parametara te povećanja tjelesne mase (Spungen i sur., 1999.). Oprez je potreban kod upotrebe anabolika u pacijenata s KOPB-om zbog mogućeg razvoja policitemije tako da su potrebna dodatna istraživanja kako bi primjena ove skupine lijekova postala rutina za navedenu indikaciju.

1.4.3. Jetrene bolesti

AAS imaju ulogu i u tretmanu pacijanata s hepatitis povezanom malnutricijom (Basaria i sur., 2001.). U studiji koja je uključivala 271 pacijenta s alkoholnim hepatitisom uspoređivan je utjecaj na jetra oksandrolona zajedno s visokim dnevnim kalorijskim unosom u odnosu na placebo te niski dnevni kalorijski unos. U skupini koja je primala oksandrolon zamijećeno je poboljšanje jetrenih funkcija te povećana stopa preživljavanja (Mendenhall i sur., 1984.). U pacijenata s jetrenim poremećajima bitan je veliki oprez u korištenju anabolika

zbog mogućeg pogoršanja stanja i dobro poznate veze između peroralne primjene 17 α -alkiliranih steroida i jetrenih oštećenja.

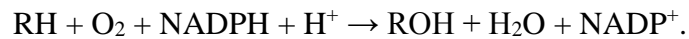
1.4.4. Bubrežno zatajenje

Malnutricija i sarkopenija su često viđena stanja u pacijenata sa završnom fazom bubrežnog zatajenja na dijalizi (Hakim i Levin, 1993.). Kako se parenteralna prehrana pokazala neučinkovitom u poboljšanju prehranbenog statusa ovih pacijenata, anabolike bi se moglo smatrati alternativom. U dvostruko slijepom, placebo – kontroliranom ispitivanju, 29 pacijenata na dijalizi je nasumično dobivalo ili placebo ili nandrolon dekanat (100 mg/tjedno) intramuskularno kroz period od 6 mjeseci (Johansen i sur., 1999.). Serumski kreatinin i bezmasna tjelesna masa su uvelike bili povećani u skupini koja je primala nandrolon. Pokazani su i značajni rezultati funkcionalnih fizičkih ispitivanja, kao što su prehodano vrijeme u određenom vremenskom periodu i penjanje uz stepenice, dok su se rezultati tih testova pogoršali u skupini koja nije primala nandrolon. Uz povećanje nemasne tjelesne mase, pacijenti s kroničnim bubrežnim bolestima mogu imati dobiti zbog povećane eritropoeze kao posljedica uzimanja anaboličkih spojeva (Evans i Amerson, 1974.). Studija s 25 muških anemičnih pacijenata s razinama željeza u referentnom rasponu pokazala je povećanje sinteze eritropoetina u 15 pacijenata koji su primali nandrolon dekanat (200 mg/tjedno) intramuskularno kroz 6 mjeseci (Teruel i sur., 1995.). Iako se vrijednost eritropoetina vratila na onu prije primjene lijeka, do toga je došlo 6 tjedana nakon zadnje primljene doze. Razina hemoglobina ostala je u referentnom rasponu do 16 tjedana nakon prestanka primjene lijeka. Uspoređujući rezultate kombinirane terapije anemije nandrolon-dekanatom i humanim rekombinantnim eritropoetinom te monoterapije eritropoetinom došlo se do zaključka da je povećanje hematokrita veće u grupi koja je primala oba lijeka (Gaughan i sur., 1997.). Eksperiment je trajao šest mjeseci, a svi primaoci terapije bili su anemični pacijenti s kroničnom bubrežnom bolesti na hemodijalizi.

1.5. Enzimi citokroma P450

Citokromi P450 su hemoproteini s ferri ionom na aktivnom mjestu vezanom na porfirinski prsten i cisteinski ostatak na apoproteinskom dijelu. Njihov položaj je na membranama endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, a funkcionalno predstavljaju

monooksigenaze koje inkorporiraju hidroksilnu skupinu iz molekuskog kisika u supstrat i vodu:



Prema tome i katalitička svojstva enzima ovise o svojstvima ostalih dijelova membrane, posebice fosfolipidnog sloja koji čini najveći dio suhe mase endoplazmatskog retikuluma (ER engl. *endoplasmatic reticulum*) (30-40%). Uz hidroksilaciju su moguće brojne druge reakcije katalizirane ovim enzimima, kao npr. *N*-oksidacija, *S*-oksidacija, epoksidacija, dealkilacija, ciklizacija, metilacija i dr. Fluidnost i naboj membrane mogu značajno utjecati na katalitička svojstva enzima, budući da o ovim čimbenicima ovisi pokretljivost proteina u membrani. Lipofilna svojstva membrane utjecat će na izbor supstrata (hidrofilnih ili lipofilnih svojstava), a membrana može poslužiti i kao svojevrsni spremnik za kemijske tvari lipofilnih svojstava. Od tuda i dolazi akumulacijski učinak nekih veoma lipofilnih lijekova koji se skladište u organizmu, a naglim gubitkom masne tjelesne mase može doći do njihovog ponovnog dolaska u krvni optok i ostvarenja farmakološkog učinka. Fluidnost membrane ovisi o zastupljenosti nezasićenih masnih kiselina. Arahidonska kiselina ima najveći udio u sastavu mikrosomskih fosfolipida (25%), a prisutne su i druge nezasićene masne kiseline. Promjenom prehrane može doći i do promjene u sastavu membrane, a posljedično i do promjene fluidnosti membrane. Ukupan negativni naboj membrane kod fiziološkog pH posljedica je sastava fosfolipida membrane koji čini: 55% fosfatidilkolina, 20-25% fosfatidiletanolamina, 8-10% fosfatidilserina, 5-10% fosfatidilinozitola i 4-7% sfingomijelina. Komponente sustava za monooksigenaciju lijekova mogu biti ugrađene u unutrašnji, hidrofilni dio membrane, pri čemu su dijelovi proteinskog lanca u uskom kontaktu s lancima masnih kiselina kao dijelova fosfolipida. Drugi način je da se hidrofilni dijelovi proteina, npr. ionizirane skupine (kod citokroma b_5 i citokrom P450-reduktaze) vežu na ograničen broj mjesta na hidrofobnom dijelu membrane. Prema tome se može očekivati značajniji utjecaj fizičkog stanja lipida i strukture fosfolipida na aktivnost enzima citokrom P450, nego na dijelove sustava koji prenose elektrone. Zbog ovakvog načina interakcija s membranom ER, komponente sustava za monooksigenaciju lijekova mogu se razdvojiti i pročistiti u zasebne homogene cjeline (npr. na citokrom P450, citokrom P450-reduktazu i lipidnu komponentu). Interakcija između fosfolipida i enzima u membrani je niske specifičnosti, tako da se različiti neionski detergentski mogu koristiti kao zamjena za prirodne fosfolipide kod rekonstitucije izoliranih čistih komponenti. Takvi rekonstituirani sustavi iskazuju enzimsku aktivnost sličnu

aktivnosti enzima u prirodnom okruženju. Utjecaj fosfolipidne komponente može se odraziti na vezanje lijeka-supstrata na enzim, na specifičnost enzima prema različitim supstratima, na konformaciju molekule enzima i na interakcije s dijelovima sustava za transport elektrona. Sinteza enzima citokrom P450 događa se na membranski vezanim polisomima, a ugradnja u membrane odvija se specifičnim procesom koji je reguliran hidrofobnim svojstvima *N*-terminalnog dijela proteina. Kao što je prethodno navedeno, aktivnost enzima citokrom P450 se osim u ER nalazi i u drugim membranskim strukturama eukariota, kao što su membrana jezgre, plazmatska membrana i membrana Golgijeva aparata. Najveći dio strukturnih značajki citoplazmatskih bakterijskih enzima (sekundarna struktura) zadržan je i u membranski vezanim enzimima eukariota. Prema tome se može očekivati da će i tercijarna struktura većim dijelom odgovarati bakterijskim enzimima koji se nalaze u citoplazmi. Mogućnost da je tijekom evolucije sačuvana tercijarna struktura, od topljivih do membranski vezanih enzima, osobito dolazi do izražaja ako se uzme u obzir da je citokrom P450, samo s jednim ili najviše dva transmembranska segmenta vezan za membranu. Vezni segmenti su dio *N*-terminalnog dijela molekule enzima i čine integralni dio strukture membrane (ER, mitohondriji). Razlike u načinu vezanja na ER upućuju na različitosti u katalitičkoj aktivnosti koje mogu postojati među enzimima citokrom P450. Prostetska skupina enzima (protoporfirin IX) smještena je u lumenu enzima, a orijentirana je prema površini membrane. Prema tome hidrofobni supstrati će na mjesto vezanja doći kroz membranu, dok će hidrofilni prijeći iz citosola. Ovo ujedno objašnjava sposobnost enzima citokrom P450 da metaboliziraju i hidrofobne i hidrofilne supstrate. Enzimi citokrom P450 mogu u membranama tvoriti proteinske komplekse sastavljene od 6-10 proteina tzv. rotamere (Medić-Šarić i Rendić, 2013.a). Takvo nakupljanje enzima olakšava transport metabolita između enzima. Tako se npr. enzimi CYP1A1 i CYP1A2 mogu funkcionalno povezati na način da CYP1A1 katalizira npr. nastajanje fenola, a da CYP1A2 dalje metabolizira fenole u diolepokside. U slučaju CYP3A4 prisutan je širok raspon kemijskih struktura koje podliježu metabolizmu ovim enzimom, kao npr. eritromicin, nifedipin, aflatoxin B₁, progesteron i testosteron. Varijacije u ekspresiji *CYP3A4* gena, kao i učinci lijekova induktora ili inhibitora, mogu dovesti do različitih fenotipova u brzini metaboliziranja i uzrokovati različite odgovore na primljene lijekove (Sohl, 2009.).

1.5.1. CYP enzimi i steroidni hormoni

Biosinteza steroidnih hormona započinje od kolesterola i odvija se pretežito u adrenalnom korteksu, gonadama i placenti, a katalizirana je enzimima citokrom P450 od kojih važnu ulogu imaju enzimi koji pripadaju porodicama CYP11, CYP17, CYP19 i CYP21. Biosinteza započinje cijepanjem postraničnog lanca kolesterola, reakcijom koju katalizira enzim CYP11A1, a odvija se uzastopnim hidroksilacijama postraničnog lanca na položajima C20 i C22, prvo na C22, a onda na C20 kako bi se dobio 20,22R-dihidroksikolesterol. Taj spoj se zatim cijepa kako bi nastao C21 steroid pregnenolon i C6 izokaproični aldehid koji se oksidira u izokaproičnu kiselinu (Kicman, 2009.). Pregnenolon se zatim prenosi u glatki endoplazmatski retikulum gdje se koristi kao prekursor za daljnju steroidnu sintezu. Stvaranje testosterona iz pregnenolona se odvija kroz dva glavna puta. Prvi put je kroz nekoliko međuprodukata, svaki od njih s dvostrukom vezom između C-5 i C-6 i 3 β -hidroksi skupinom; ovaj put se uobičajeno naziva Δ^5 put. Drugi put je preko serije međuprodukata s dvostrukom vezom između C-4 i C-5 i 3-okso skupinom; to se naziva Δ^4 put. *In vitro* eksperimenti s tkivom ljudskog testisa pokazali su važnost i Δ^4 i Δ^5 puta s time da je posljednji glavni put sinteze testosterona u ljudi (Kicman, 2009.). Pregnenolon se oksidacijom C3-karbonilne skupine katalitičkim učinkom 3 β -hidroksisteroidne dehidrogenaze (3 β -HSD) prevodi u progesteron i hidroksilira u položaju C17, odnosno 17-hidroksiprogesteron djelovanjem CYP17A1. Cijepanjem postraničnog lanca u strukturi 17-hidroksipregnenolona nastaje dehidroepiandrosteron. Oksidacijom C3 hidroksilne skupine dehidroepiandrosterona, katalitičkim učinkom 3 β -HSD nastaje androstendion, a redukcijom karbonilne skupine u položaju C17 (enzim 17 β -HSD) nastaje androgeni i anabolički hormon testosteron. Redukcijom dvostruke veze testosterona između C-4 i C-5, uz katalitički učinak 5 α -reduktaze nastaje najvažniji androgeni hormon 5 α -dihidrotesteron, a redukcijom C3-karbonilne skupine 3 α - i 3 β -dioli (3 α - i 3 β -androstandioli). Reakcije se odvijaju nakon redukcije testosterona u 5 α -dihidrotesteron, a koji će od enzima katalizirati reakciju ovisit će o prisutnosti enzima u određenom tkivu. 3 α -diol smatra se krajnjim metabolitom testosterona, dok se 3 β -diol dalje hidroksilira u triole (3 β -, 5 α -, 6 α -, 17 β -triol i 3 β -, 5 α -, 7 α -, 17 β -triol) katalitičkim učinkom citokroma P450 i smatra se glavnim metabolitom najvažnijeg androgenog hormona 5 α -dihidrotesterona. Odvojenim pokusima ustanovljeno je da androstendion može nastati iz testosterona i iz epitestosterona (Medić-Šarić i Rendić, 2013.b).

2. Obrazloženje teme

U uvodnom dijelu dan je pregled o odnosu strukture i djelovanja anaboličko-androgenih steroida s posebnim naglaskom na izmjene u strukturi koje doprinose metaboličkoj stabilnosti na djelovanje citokrom P450 enzima i posljedično povećanoj bioraspoloživosti anaboličko-androgenih steroida. Jedan od osnovnih problema jest zloraba steroida u sportu (doping) te posljedično njihovo praćenje i analiza (antidopinška kontrola).

Popis zabranjenih tvari uključuje neodobrene tvari (tvari u različitim fazama predkliničkih i kliničkih ispitivanja), peptidne hormone i čimbenike rasta, hormone i modulatore metabolizma, β 2-agoniste, diuretike i maskirna sredstva. Najeskenzivniji dio liste predstavljaju anabolička sredstva:

1. anabolički androgeni steroidi (AAS)

a. egzogeni AAS: 1-androstendiol (5α -androst-1-en- 3β , 17β -diol), 1-androstendion (5α -androst-1-en-3, 17 -dion), bolandiol (estr-4-en- 3β , 17β -diol), bolasteron, boldenon, boldion (androst-1,4-dien-3, 17 -dion), kalusteron, klostebol, danazol ([1,2] oksazol[4',5':2,3]pregna-4-en-20-in- 17α -ol), dehidroklormetil-testosteron (4-kloro- 17β -hidroksi- 17α -metilandrosta-1,4-dien-3-on), dezoksimetil-testosteron (17α -metil- 5α -androst-2-en- 17β -ol), drostanolon, etilestrenol (19-norpregna-4-en- 17α -ol), fluoksimesteron, formebolon, furazabol (17α -metil[1,2,5]oksadiazol[3',4':2,3]- 5α -androstan- 17β -ol), gestrinon, 4-hidroksi-testosteron (4, 17β -dihidroksiandrost-4-en-3-on), mestanolon, mesterolon, metandienon (17β -hidroksi- 17α -metilandrosta-1,4-dien-3-on), metenolon, metandriol, metasteron (17β -hidroksi- 2α , 17α -dimetil- 5α -androstan-3-on), metildienolon (17β -hidroksi- 17α -metilestra-4,9-dien-3-on), metil-1-testosteron (17β -hidroksi- 17α -metil- 5α -androst-1-en-3-on), metilnortestosteron (17β -hidroksi- 17α -metilestr-4-en-3-on), metiltestosteron, metribolon (metiltrienolon, 17β -hidroksi- 17α -metilestra-4,9,11-trien-3-on), miboleron, nandrolon, 19-norandrostendion (estr-4-en-3, 17 -dion), norboleton, norklostebol, noretandrolon, oksabolon, oksandrolon, oksimesteron, oksimetolon, prostanazol (17β -[(tetrahidropiran-2-il)oksi]-1'H-pirazol[3,4:2,3]- 5α -androstan), kvinbolon, stanozolol, stenbolon, 1-testosteron (17β -hidroksi- 5α -androst-1-en-3-on), tetrahydrogestrinon (17-hidroksi- 18α -homo-19-nor- 17α -pregna-4,9,11-trien-3-on), trenbolon (17β -hidroksiestr-4,9,11-trien-3-on) i druge tvari slične kemijske strukture ili sličnog biološkog djelovanja.

b. endogeni AAS primijenjeni egzogeno: androstendiol (androst-5-en-3 β ,17 β -diol), androstendion (androst-4-en-3,17-dion), dihidrotestosteron (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on), prasteron (dehidroepiandrosteron, DHEA, 3 β -hidroksiandrost-5-en-17-on), testosteron i njihovi metaboliti i izomeri, uključujući, ali ne ograničavajući se na: 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol, 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 α -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, androst-4-en-3 α ,17 α -diol, androst-4-en-3 α ,17 β -diol, androst-4-en-3 β ,17 α -diol, androst-5-en-3 α ,17 α -diol, androst-5-en-3 α ,17 β -diol, androst-5-en-3 β ,17 α -diol, 4-androstendiol (androst-4-en-3 β ,17 β -diol), 5-androstendion (androst-5-en-3,17-dion), epi-dihidrotestosteron, epitestosteron, etiokolanolon, 7 α -hidroksi-DHEA, 7 β -hidroksi-DHEA, 7-keto-DHEA, 19-norandrosteron, 19-noretiokolanolon (*www.antidoping-hzta.hr*)

2. druga anabolička sredstva, uključujući, ali ne ograničavajući se na: klenbuterol, selektivni modulatori androgenskih receptora (SARMs, npr. andarin i ostarin), tibolon, zeranol, zilpaterol.

Cilj ovog rada bio je pokazati kako pratiti metabolizam testosterona primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s UV-Vis detektorom. Humani jetreni mikrosomi primijenjeni su kao modelni sustav za praćenje metabolizma.

U konačnici dobiveni rezultati stavljeni su u kontekst drugih analitičkih tehnika koje se koriste u praćenju anaboličko-androgenih steroida.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije, reagensi i otapala

- Diklormetan (Kemika, Hrvatska)
- Glukoza-6-fosfat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kalijev fosfat (Fisher, SAD)
- Kvaščeve glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (Sigma-Aldrich, SAD)
- Ljudski jetreni mikrosomi (Sigma-Aldrich, SAD)
- Metanol (Fisher, SAD)
- NADP⁺ (Sigma-Aldrich, SAD)
- Testosteron (Sigma-Aldrich, SAD).
- Ultračista voda (FBF, Zagreb)

3.2. Oprema i kemijsko suđe

- Epruvete 16 mm x 100 mm (Fisher, SAD)
- HPLC sustav (20 µl petlja) s DAD detektorom (Agilent, SAD)
- Manifold (Supelco, SAD)
- Oktadecilsilan (C₁₈) obrnuto-fazna kolona Zorbax SB, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, (Agilent, SAD)
- Termostatirana vodena kupelj s miješanjem (Amerex Instruments, SAD)
- Vijali s insertima (Agilent, SAD)
- Vorteks uređaj (Fisher Scientific, SAD)

3.3. Priprema reagensa

- Fosfatni pufer: 25,9 g monobazičnog kalijevog fosfata i 141,0 g dibazičnog kalijevog fosfata otopi se u 1000 ml vode da bi se pripremila 1,0 M otopina pH vrijednosti 7,4
- 0,1 M glukoza-6-fosfata pripremi se otapanjem u vodi
- 10 mg/mL NADP⁺ pripremi se otapanjem NADP⁺ natrijeve soli u vodi
- 10³ IU/mL kvaščeve glukoza-6-fosfat dehidrogenaze pripremi se kao 1 mg/mL u 10 mM Tris acetatnom puferu (pH 7,4) s dodatkom 1 mM EDTA i 20% glicerolom (vol/vol)

- NADPH generirajući sustav. Pomiješa se 50 dijelova 0,1 M glukoza-6-fosfata, 25 dijelova 10 mg/mL NADP⁺ i 1 dio 1 mg/mL kvaščeve glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (Sustav se priprema dnevno svjež i čuva na ledu prije upotrebe.)
- 20 mM otopinu testosterona pripremi se otapanjem standarda u metanolu.

3.4. HPLC analiza

Za HPLC-DAD analizu oksidacije testosterona, pripremi se mobilna faza sačinjena od metanola i vode u volumnom omjeru 64:36. Provodi se izokratna analiza u trajanju od 25 min uz detekciju na 240 nm.

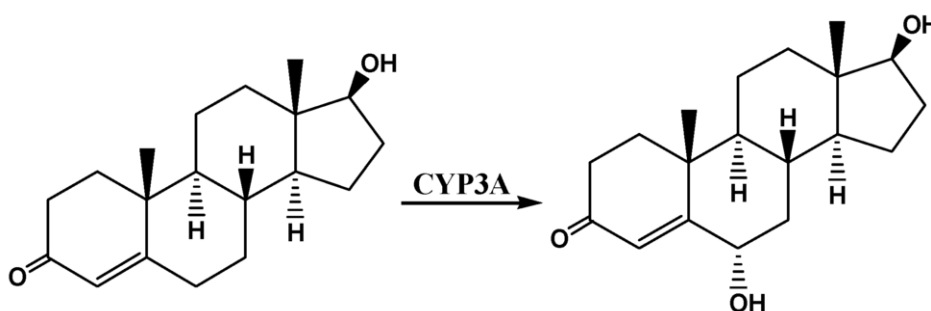
3.5. Oksidacija testosterona ljudskim jetrenim mikrosomima - inkubacije

- Pripremi se inkubacijska otopina koji sadrži 50 mM fosfatnog pufera (pH 7,4), ljudske jetrene mikrosome s 500 pmol citokroma P450 i 210 μ M testosterona (Pri tome udio organskog otapala vol/vol ne smije biti veći od 1%). Za inkubacije se koriste staklene epruvete. Konačni volumen iznosi 100 μ l.
- U razdvojenim epruветama preinkubira se inkubacijska otopinu i NADPH-generirajući sustav na vodenoj kupelji (100 okr./min, 37 °C, 3 min). Potrebno je pripremiti dovoljnu količinu NADPH-generirajućeg sustava tako da njegov udio bude 15% u svakoj inkubacijskoj epruветi.
- Reakcija se pokreće dodatkom generirajućeg sustava.
- Nakon 10 min na 37 °C, reakcija se prekida dodatkom 400 μ L diklormetana u inkubacijsku otopinu uz miješanje na vorteks uređaju.
- Inkubacijska otopina se centrifugira 10 min na 3000 g, sobna temperatura, kako bi se odvojila dva sloja.
- Donji organski sloj se odstrani i prebaciti u vijal.
- Organsko otapalo se upari pod strujom N₂ bez zagrijavanja.
- Detekcija 6 β -hidroksilacije testosterona se provodi nakon što se suhi uzorci testosterona ponovno otope u 30 μ l metanola, promiješaju vorteksom, te se potom 20 μ l otopine injektira na HPLC kolonu na uređaju opremljenom s UV detektorom koji bilježi signal na 240 nm.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati

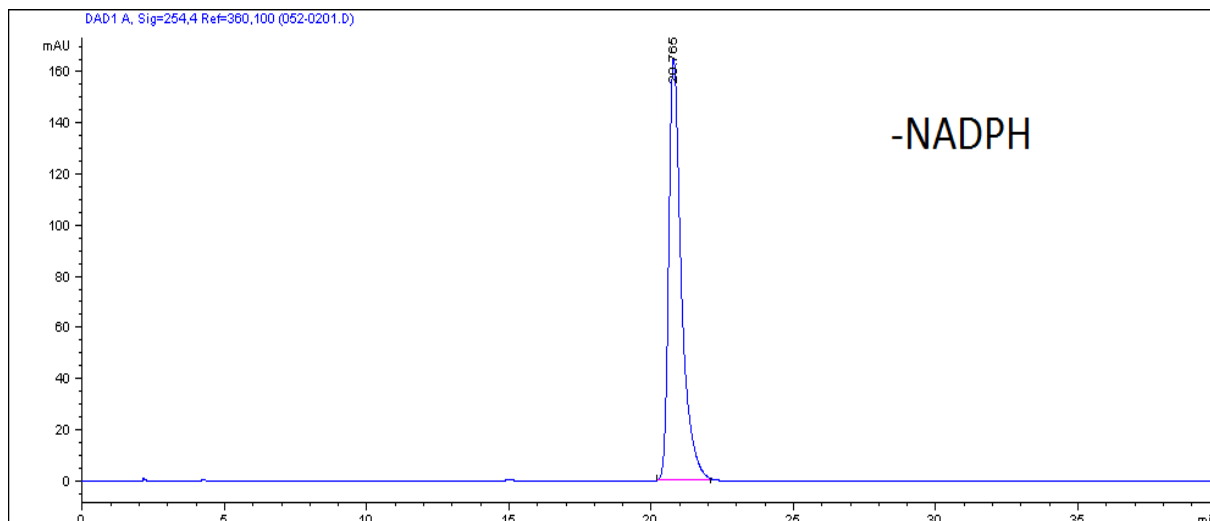
Najčešće korištena metoda za praćenje metabolizma lijekova je obruto fazna tekućinska kromatografija spregnuta s UV-Vis ili DAD detektorom (HPLC-DAD). Kod istraživanja metabolizma novih lijekova identitet metabolita utvrđuje se spektrometrijom masa. Potvrda identiteta se bazira na sintezi metabolita predviđenog spektrometrijom masa. Najčešće korišteni supstrati CYP3A4/5 su nifedipin i testosteron čiji se metabolizam prati RP-HPLC na C₁₈ koloni (slika 7.).



Slika 7. 6 β – hidroksilacija testosterona

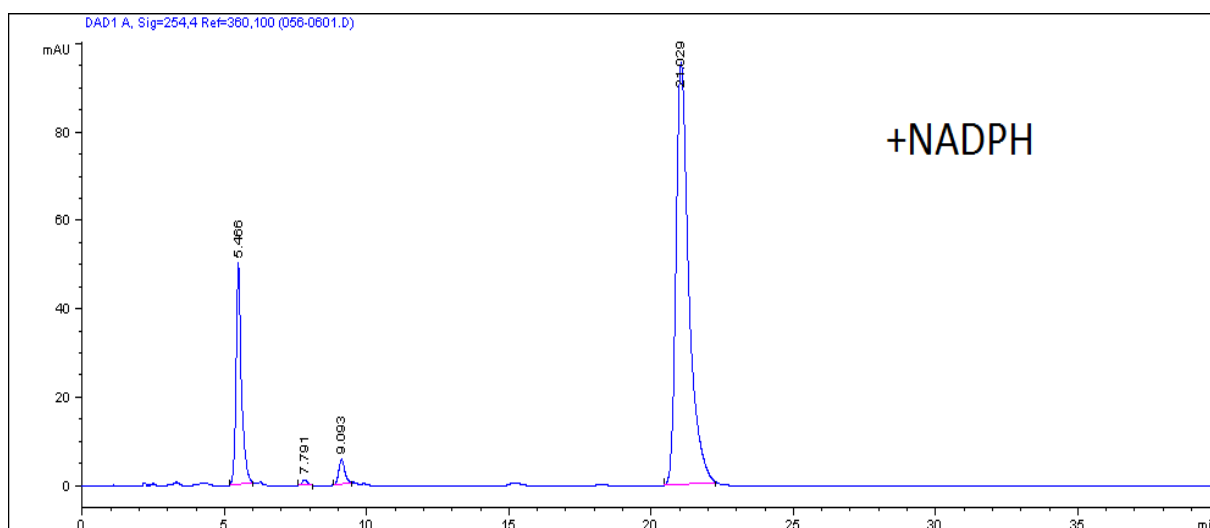
Prednost testosterona i nifedipina kao marker supstrata u analitičkom smislu je mogućnost izokratne separacije metabolita supstrata (pokretna faza 64% metanol + 36% voda) koja zavisno o veličini čestica u koloni može biti iznimno brza (do desetak minuta na HPLC analitičkim kolonama).

U slučaju kada se inkubacija provodi bez dodatka generirajućeg sustava u inkubacijsku smjesu uočava se jedino pik supstrata (slika 8.).



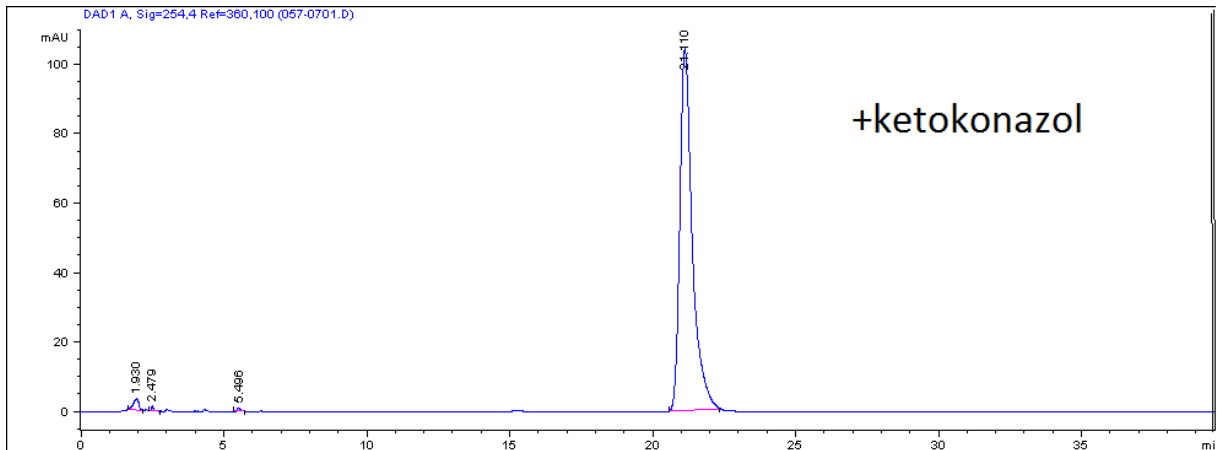
Slika 8. Kromatogram uzorka inkubacijske smjese bez dodanog NADPH – ne dolazi do stvaranja metabolita odnosno 6 β -hidroksitestosterona

Ako se u inkubacijsku smjesu doda generirajući sustav koji proizvodi NADPH – koenzim citokrom P450 enzima, tada dolazi do metaboličke pretvorbe testosterona. Testosteron se primarno metabolizira u 6 β -hidroksitestosteron, ali dolazi i do nastanka drugih hidroksiliranih produkata što može biti posljedica djelovanja drugih citokroma P450 izuzev CYP3A4/5.



Slika 9. Kromatogram uzorka inkubacijske smjese nakon dodanog NADPH – dolazi do stvaranja metabolita tj. 6 β -hidroksitestosterona

Kako bi se utvrdilo koji pik predstavlja 6 β -hidroksitestosterona u inkubacijsku smjesu uz generirajući sustav dodan je i specifični inhibitor CYP3A4 ketokonazol – fungistatik azolnog tipa. Pri tome dolazi do smanjenja pika čiji je maksimum na 5,5 min.



Slika 10. Kromatogram uzorka inkubacijske smjese nakon dodanog ketokonazola (inhibitor CYP3A4) – ne dolazi do stvaranja metabolita odnosno 6 β -hidroksitestosterona

Rezultat analize može se prikazati u obliku ostatne aktivnosti tj. postotka metabolita u odnosu na kontrolu. Ovakav pristup može se primjeniti i na praćanje drugih anaboličko-androgenih steroida derivata testosterona kao što su androstandioli, androstendioli, androstendion, epidihidrotestosteron, epitestosteron i drugi.

4.2. Rasprava

Ovim radom htio se pokazati utjecaj mikrosomske aktivnosti na metabolizam testosterona, a u svrhu praćenja anaboličko-androgenih steroida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnute s DAD detektorom. Reakcija od interesa je bila 6 β -hidroksilacija testosterona metaboličkim djelovanjem CYP3A4 enzima. Nositelj enzimske aktivnosti bili su humani jetreni mikrosomi. Mikrosomalna frakcija se dobiva frakcionim centrifugiranjem, a kao najčešće korišten izvor enzima relevantnih za praćenje metabolizma lijekova koristi se tkivo jetre miševa, štakora ili ljudi. Homogenizirano tkivo jetre i samo se može primjenjivati za praćenje metaboličkih reakcija. Nakon homogenizacije slijedi centrifugiranje na 10.000 g pri čemu se u supernatantu zadržava mikrosomalna frakcija koja se taloži ultracentrifugiranjem na 100.000 g. Dobivenu frakciju potrebno je nekoliko puta isprati od glikogena što se postiže ponavljanjem homogenizacije i ultracentrifugiranja. Cjelokupni se postupak provodi na 4 °C u pirofosfatnom puferu uz dodatak agensa za kompleksiranje metalnih iona (EDTA) i antioksidansa (butilhidroksitoluen, BHT). Primjenom EDTA i BHT nastoji se izbjeći lipidna peroksidacija, a pirofosfatni pufer je koristan za uklanjanje hemoglobina i nukleinskih kiselina. Ovisno iz kojeg tkiva se mikrosomi pripremaju potrebno je dodati i fenilmetilsulfonilfluorid za inhibiciju proteaza koje bi mogle razgraditi citokrome. Dobiveni mikrosomi se nakon posljednjeg taloženja resuspendiraju u otopini s fosfatnim puferom i 20% glicerola koji služi za konzerviranje mikrosoma na temperaturama -20/-80 °C. Mikrosomi se uobičajeno karakteriziraju sadržajem proteina i citokroma P450.

Glavna je uloga metaboličkih reakcija eliminacija strane tvari (ksenobiotika) uvođenjem novih funkcionalnih skupina te konjugacijama. Za očekivati je da metaboliti u slučaju obrnuto fazne kromatografije imaju kraće retencijsko vrijeme od supstrata zbog njihove veće polarnosti nakon metaboličkih reakcija, poglavito reakcija glukuronidacije i sulfokonjugacije. Pri provedbi inkubacija supstrat se uvijek dodaje u suvišku kako bi se metabolička aktivnost pratila pri maksimalnoj saturaciji (odnosno brzini, v_{max}) zbog čega je u kromatogramu dominantan pik supstrata. Uobičajeno se supstrat dodaje u koncentraciji koja odgovara vrijednosti $5xK_m$ (Michaelis-Menteničina konstanta). Na slici 9. prikazan je metabolizam testosterona djelovanjem humanih jetrenih mikrosoma. U slučaju da NADPH (negativna kontrola) nije prisutan nema produkcije metabolita testosterona (slika 8.). Dodatkom koenzima citokroma P450 (NADPH) testosteron se biotransformira u 6 β -hidroksitestosteron određenom brzinom. U slučaju dodatka određenog inhibitora enzima CYP3A4 ne dolazi do

stvaranja metabolita ili metabolit nastaje u manjoj količini u odnosu na pozitivnu kontrolu testosterona (slika 10.). Kako se na humanim jetrenim mikrosomima, uz CYP3A4 i CYP3A5 koji u manjoj mjeri prevode testosteron u 6 β -hidroksitestosteron, nalaze i drugi enzimi citokroma P450, dolazi do nastanka drugih hidroksi metabolita testosterona kao što su 1 β -, 2 β - i 15 β -hidroksi produkti. No primarni produkt oksidacije testosterona P450 3A4 enzimom je 6 β -hidroksitestosteron, a ta reakcija je i korištena kao model u proučavanju enzimske kinetike CYP3A4. Najveća količina CYP3A potporodice enzima u ljudi je eksprimirana u jetri, a uključena je i u metabolizam oko 50% svih korištenih lijekova. Kao rezultat toga interakcije lijek-lijek u kojima dolazi do promjene metabolizma putem CYP3A mogu biti od značajne kliničke važnosti. Kada se ekspresija CYP3A5 enzima ispitivala u različitim dobnim skupinama, pokazano je da se u značajno višem postotku pojavljuje u mlađim dobnim skupinama (19 godine te mlađi) u odnosu na ostatak populacije (odnosno 47% naspram 24%) (Patki, 2003.). CYP3A5 pokazuje 84%-tnu homologiju u aminokiselinskom slijedu s CYP3A4, te od tuda i značajno preklapanje u njihovoj specifičnosti prema supstratima. Sadržaj jetrenog CYP3A5 kreće se u rasponu od 2 do 202 pmol/mg mikrosomalnog proteina i pokazuje znatne interindividualne varijacije. Sadržaj jetrenog CYP3A4 kreće se u rasponu od 47 do 523 pmol/mg mikrosomalnog proteina, te isto pokazuje značajne interindividualne razlike. Dakle, CYP3A5 može prilično doprinositi ukupnom metaboličkom klirensu supstrata CYP3A potporodice u ljudi s polimorfizmom u ekspresiji istog, odnosno u ljudi kod kojih je povećana ekspresija CYP3A5 enzima. Potrebno je i napomenuti da se specifičnost prema supstratima enzima CYP3A4 i CYP3A5 može razlikovati bez obzira na pripadnost istoj enzimskoj potporodici. No, ipak je pokazano da je metabolička sposobnost CYP3A5 enzima jednaka ili smanjena u odnosu na CYP3A4 te nikako ne može biti veća zbog njegove manje relativne količine u ekspresiji. Reakcije kao što su hidroksilacija midazolama, triazolama i testosterona te oksidacija dihidropiridinskog prstena u nifedipinu smatraju se relativno specifičnim marker reakcijama za CYP3A posredovani metabolizam i njegova klinička istraživanja te *in vitro* studije. Testosteron sam može utjecati na daljnji metabolizam prethodno spomenutih spojeva.

Dosad se razmatrala aktivnost CYP3A4/5 enzima te posebno metabolička reakcija 6 β -hidroksilacije testosterona. Ta sama reakcija zaslužna je za stvaranje oko 75-80% svih stvorenih metabolita kada je u pitanju ukupna biotransformacija testosterona (Draper, 2007.). Koristeći tu reakciju može se proučavati i enzimska kinetika te utjecaj raznih potencijalnih

inhibitora ili induktora na aktivnost spomenutog enzima. HPLC metode se pokazala primjenjiva i kod niskih koncentracija supstrata (Draper, 2007.).

Uz opisane metode određivanja metaboličke aktivnosti CYP3A4/5 sustava putem hidrosilacije testosterona primjenjuje se i niz drugih metoda za određivanja testosterona i ostalih anabolika u biološkom materijalu, poglavito korištenim u antidoping testovima. Te metode su važne jer pomoću njih dokazujemo metabolite steroida u biološkom materijalu, a doprinose i potpunijem shvaćanju kroz koje sve metaboličke procese sami steroidi prolaze. Područja koja uključuju detekciju anabolika u biološkom materijalu i njihov put kroz organizam međusobno su vrlo povezana i konstantno se isprepliću. Detekcija primijenjenih androgena kao što je testosteron koji je normalno prisutan u tjelesnim tekućinama bazirana je na određivanju ključnih parametara urinarnog steroidnog profila, najčešće određivanih metodom plinske kromatografije vezane uz masenu spektrometriju (GC/MS, engl. *Gas Chromatography/Mass spectrometry*), iako se od nedavno koristi i sustav tekućinske kromatografije vezan s masenom spektrometrijom (LC/ESI-MS, engl. *Liquid Chromatography/Electron Spray Ionization-Mass spectrometry*) za direktnu analizu slobodnih i konjugiranih metabolita egzogenih steroida. U slučaju termolabilnih spojeva i onih s visokim stupnjem polarnosti prednost u analizi se ipak daje vezanom sustavu LC/MS. Kroz godine, identificirani su biljezi kojima se dokazuje unošenje egzogenih steroida u organizam, utvrđeni su referentni rasponi metabolita te njihovi omjeri u dobrovoljaca i u populaciji sportaša, te njihova individualna stabilnost. Direktna potvrda uzimanja iz egzogenih izvora dolazi od mjerenja $\delta^{13}\text{C}$ vrijednosti koja reflektira sintetsko podrijetlo steroida isključujući potencijalnu fiziološku anomaliju (Ayotte, 2009.). Osim administriranja testosteronu sličnog steroida, nekoliko faktora može mijenjati individualni GC/MS steroidni profil kao što su npr. mikrobiološka degradacija uzorka, primjena inhibitora 5α -reduktaze ili nekog drugog steroida, uzimanje maskirajućih agensa kao što je probenecid, povećana konzumacija alkohola. Nadalje, uz primjenu određenih steroida s kratkim poluvijekom eliminacije ili topikalnih formulacija, promjene u urinarnom steroidnom profilu su manje naglašene i vrlo brzo nestaju. Metaboliti steroida se uglavnom izlučuju putem urina i to kao glukokonjugati te su prikladni za GC/MS analizu, no uz stanovitu pripremu uzorka. Iz urina steroidi se izoliraju, odnosno pročišćuju tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom nakon enzimskog cijepanja glukuronida i derivatizacije. Za potrebe ekstrakcije najčešće se koristi dietil ili terc-butil metil eter, a nakon ekstrakcije se organski sloj upari do suhog te suhi ostatak podliježe derivatizaciji za GC/MS ili ponovnom otapanju za LC/MS potrebe analize. Njihova GC/MS detekcija u

rasponu vrlo niskih koncentracija (ng/mL) provodi se nadziranjem specifičnih iona relevantnih metabolita, često molekularnih iona ili fragmenata koji odgovaraju strukturama s gubitkom metilne grupe. Uzorci se uglavnom podešavaju na pH vrijednost od 5,0-5,2. Pročišćena β -glukuronidaza iz *Escherichiae coli* zadržava integritet steroidnog profila, dok se kemijska hidroliza nije pokazale prikladnom za tu primjenu (Ayotte, 2009.). Tijekom analize kromatograma od iznimne je važnosti imati referentne interne standarde kako bi se rezultati mogli usporediti. Još jedna važna stvar je i vođenje računa o stabilnosti steroidnih konjugata u urinu. U slučaju testosteron glukuronida stabilnost je očuvana najmanje godinu dana ukoliko je uzorak pohranjen ispod -20°C . No, uz glukokonjugate u urinu mogu biti u većoj ili manjoj mjeri prisutni i sulfokonjugati što otežava analitički pristup jer se hidrolitička svojstva te dvije vrste konjugata znatno razlikuju. Iz tog su razloga znanja o metaboličkoj sudbini određenog analita od presudne važnosti za odluku o tome da li će biti upotrijebljena kemijska ili enzimaska hidroliza, sa ili bez sulfatazne aktivnosti te potrebni inkubacijski uvjeti (temperatura, pH vrijednost, količina enzima, potrebno vrijeme inkubacije). Što se tiče određivanja podrijetla organskih tvari jedna od najboljih metoda je GC/C/IRMS (engl. *Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry*), koja je također prikladna i za određivanje urinarnih metabolita endogenih anaboličkih steroida (Ayotte, 2009.). Tom metodom dobiva se vrijednost $\delta^{13}\text{C}$ koja upućuje na to da li određeni identificirani metabolit je endogenog ili sintetskog podrijetla, odnosno biljnog podrijetla. Princip metode je u preciznoj analizi ugljikovih izotopa, odnosno razlika u prisutnosti ugljikovog izotopa ^{13}C u metabolitima steroida. Odvojeni i eluirani analiti plinskom kromatografijom prevode se u ugljikov dioksid prolazeći kroz cijev za spaljivanje napravljenu od bakrovog oksida. Maseni spektrometar je podešen za simultano mjerenje iona pri m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2=^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) i 46 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$); zadnji ion se koristi u izračunu i oduzimanju doprinosa izotopomera koji sadrži ^{17}O u m/z 45. Voda nastala tijekom procesa spaljivanja odvaja se kriogenskom zamkom ili polupropusnom membranom kako bi se spriječilo stvaranje interferirajuće vrste kao što je HCO_2^+ . Dakle, omjer iona (R) pri m/z 45-44 odražava količinu ^{13}C prema ^{12}C od analita; no ne iskazuje se kao omjer već prema međunarodnoj referenci izražen je u standardnoj δ -notaciji u promilima (‰), prema jednadžbi: $\delta^{13}\text{C}_{\text{analit}} = (R_{\text{analit}}/R_{\text{referenca}}-1) \times 1000$ (‰). Ovisno o njihovom podrijetlu, $\delta^{13}\text{C}$ vrijednost organskih spojeva može varirati i više od 10‰. Biljni steroli ekstrahirani iz soje, diosgenin i kemijski promijenjeni prekursori sterola služe kao početni materijal u sintezi komercijalno dostupnih steroida i prohormona kao što su androstendion i dehidroepiandrosteron koji posjeduju

ugljičkov izotopni otisak u kojem se ogleda njihovo biljno podrijetlo karakteristično za biljke koje ugrađuju ugljičkov dioksid u svoje organske molekule kroz Calvinov ciklus. Danas, vezani sustav GC/C/IRMS je rutinski implementiran u detekciji i potvrđivanju unošenja endogenih anabolika u organizam, kao i epitestosterona koji se može koristiti kao maskirajući agens T/E vrijednosti, omjeru površina kromatografskih pikova testosterona i epitestosteron. Pikovi koji odgovaraju analitima, metabolitima ili referentnim steroidima moraju biti odjeljeni, primjerenih oblika i slobodni od interferencija. Kako bi se umanjile individualne i analitičke varijacije, u svakom uzorku određuje se razlika između vrijednosti svakog od dijagnostičkih metabolita i drugih urinarnih steroida izabranih kao interni standardi i uspoređuje s odgovarajućim vrijednostima u kontrolnim uzorcima. Razlika neće biti ista za svaki analit i mora biti veća od normalne varijacije kako bi potvrdila egzogeno podrijetlo metabolita. Markere kojima dokazujemo uzimanje anaboličkih steroida možemo podijeliti na slabe i jake. U slabije markere spadaju androsteron i etiokolanolon, dok u jake spadaju sam testosteron, 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, i dehidroepiandrosteron koji osim što su jaki i pouzdaniji markeri. Najčešće izabrani kao endogeni referentni steroidi su pregnandiol, 5α -androsten- 3α -ol, 11-ketoetiokolanolon i 11-hidroksiandrosteron. Primjena sintetskih anaboličko-androgenih steroida može mijenjati izlučivanje metabolita endogenih steroida normalno prisutnih u urinarnom profilu steroida, iako niti jedan od njih ne nastaje iz egzogenih spojeva. Finasterid, inhibitor 5α -reduktaze ima zamjetni utjecaj na steroidni profil, mijenjajući omjere 5α - prema 5β -metabolitima (Ayotte, 2009.).

5. Zaključak

U ovom radu pokazano je na koji način je moguće pratiti metaboličku aktivnost CYP3A sustava unutar humanih jetrenih mikrosoma kroz reakciju biotransformacije testosterona, točnije kroz reakciju 6 β -hidroksilacije na koju opada oko 75-80% pretvorbe testosterona *in vivo*. U ljudskom organizmu jedini sustav koji obavlja hidroksilaciju testosterona jest CYP3A sustav, još poznat kao i hidroksilaza testosterona. Pomoću HPLC metode spregnute s DAD detektorom moguće je nadzirati reakciju te odrediti parametre enzimske kinetike kao što su brzina same reakcije (v), konstanta afiniteta enzima prema supstratu (K_m), maksimalna brzina reakcije (v_{max}). Nadalje, primjenom različitih ksenobiotika tijekom ove reakcije moguće je ispitivati njihov potencijal kao inhibitora, odnosno aktivatora CYP3A enzimskog sustava. U ovom radu prikazan je utjecaj ketokonazola kao marker inhibitora CYP3A4/5 enzima.

Biotransformacijskim putevima kojima endogeni i egzogeni steroidi prolaze pridodan je osvrt na analitičke metode korištene u području dokazivanja steroida u biološkom materijalu, poglavito urinu. U pogledu korištenih metoda, najviše nalazimo vezane sustave plinske ili tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom. Uz analitičke metode, naglašena je važnost pravilne pripreme uzorka i uzimanje u obzir stabilnosti određenih steroidnih konjugata. Opisano područje danas je prvenstveno poznato kao antidoping analiza te je prostor u kojem se nove spoznaje o metabolizmu steroida i njihovom dokazivanju međusobno isprepliću. Ovo područje ostavlja daljnje mogućnosti za istraživanja koja svoju primjenu lako mogu pronaći u znanstvenim disciplinama kao što su biokemija lijekova, s njom vezana enzimologija te kao opće znanje u području biomedicinskih znanosti.

6. Literatura

- Ayotte C. Detecting the administration of endogenous anabolic androgenic steroids. U: Handbook of experimental pharmacology. Hemmersbach P, Thieme D, urednici, New York, Springer, 2009, str. 78-93.
- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 5108-5117.
- Berger JR, Lorraine P, Hall CD, Simpson DM, Berry PS, Dudley R. Oxandrolone in AIDS-wasting myopathy. *AIDS*, 1996, 10, 1657-1662.
- Bhasin S, Storer TW, Javanbakht M, Berman N, Yarasheski KE, Phillips J, Dike M, Sinha-Hikim I, Shen R, Hays RD, Beall G. Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. *JAMA*, 2000, 283, 763-770.
- Coodley GO, Loveless MO, Nelson HD, Coodley MK. Endocrine functions in the HIV wasting syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1994, 7, 46-51.
- Draper AJ, Madan A, Smith K, Parkinson A. Development of a non-high pressure liquid chromatography assay to determine testosterone hydroxylase (CYP3A) activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1997, 26, 299-304.
- Evans RP, Amerson AB. Androgens and erythropoiesis. *J Clin Pharmacol*, 1974, 14, 94-101.
- Ferreira IM, Verrexchi IT, Nery LE, Goldstein RS, Zamel N, Brooks D, Jardim JR. The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body mass and respiratory muscles in undernourished COPD patients. *Chest*, 1998, 114, 19-28.
- Gaughan WJ, Liss KA, Dunn SR, Mangold AM, Buhsmer JP, Michael B, Burke JF. A 6-month study of low-dose recombinant human erythropoietin alone and in combination with androgens for the treatment of anemia in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 1997, 30, 495-500.
- Hakim R, Levin N. Malnutrition in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 1993, 21, 99-105.
- Johansen KL, Mulligan K, Schambelan M. Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis. *JAMA*, 281, 1275-1281.

- Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 4358 - 4365.
- Kicman AT. Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. U: Handbook of experimental pharmacology. Hemmersbach P, Thieme D, urednici, New York, Springer, 2009, str. 26-54.
- Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*, 2008, 154, 502-521.
- Kopera H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta Endocrinol*, 1985, 271, 11-18.
- Kuhn CM. Anabolic steroids. *Prog Horm Res*, 2002, 57, 411-434.
- Medić-Šarić, M. Rendić, S. Enzimi oksido-redukcijskih reakcija. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013a, str. 132-153.
- Medić-Šarić M, Rendić S. Reakcije biotransformacije fizioloških tvari i lijekova. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013b, str. 303-333.
- Mendenhall CL, Anderson S, Garcia-Pont P, Goldberg S, Kiernan T, Seeff LB, Sorrell M, Tamburro C, Weesner R, Zetterman R, Samanta A. Short-term and long-term survival in patients with alcoholic hepatitis treated with oxandrolone and prednisolone. *N Eng J Med*, 1984, 311, 1464-1470.
- Miller K, Corcoran C, Armstrong C, Caramelli K, Anderson E, Cotton D, Basgoz N, Hirschhorn L, Tuomala R, Schoenfeld D, Daugherty C, Mazer N, Grinspoon S. Transdermal testosterone administration in women with acquired immunodeficiency syndrome wasting: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 2717-2725.
- Müller RK. History of doping and doping control. U: Handbook of experimental pharmacology 195. Hemmersbach P, Thieme D, urednici, New York, Springer, 2009, str. 1-18.
- Patki KC, Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes P450: Role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31, 938-944.

- Popis zabranjenih sredstava, 2015., <http://www.antidoping-hzta.hr> , pristupljeno 10.04.2015.
- Schols AM, Soeters PB, Mostert R, Pluymers RJ, Wouters EF. Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroid in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A placebo-controlled randomized trial. *Am J Resp Crit Care Med.* 1995, 152, 1268-1274.
- Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Nat Protoc*, 2009, 4, 1-16.
- Spungen AM, Grimm DR, Strakhan M, Pizzolato PM, Bauman WA. Treatment with an anabolic agent is associated with improvement in respiratory function in persons with tetraplegia: a pilot study. *Mt Sinai J Med*, 1999, 66, 201-205.
- Teruel JL, Marcen R, Navarro JF, Villafruela JJ, Fernandez Lucas M, Liano F, Ortuno J. Evolution of serum erythropoietin after androgen administration to hemodialysis patients: a prospective study. *Nephron*, 1995, 70, 282-286.
- Tisdale MJ. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition*, 1997, 13, 1-7.
- Todd BD. Pancreatic carcinoma and low serum testosterone; a correlation secondary to cancer cachexia ?. *Eur J Surg Oncol*, 1988, 14, 199-202.
- Wang RW, Newton DJ, Scheri TD, Lu AYH. Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 β -hydroxylation and erythromycin N-demethylation. *Drug Metab Dispos*, 1997, 25, 502-507.
- Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem*, 1997, 43, 1289-1292.

7. Sažetak/*Summary*

Uvod: 6 β -hidroksilacija testosterona predstavlja marker reakciju enzima CYP3A4/5. Ova reakcija korištena je kao ogledni primjer praćenja najznačajnije skupine nedozvoljenih tvari u sportu - anaboličko-androgenih steroida.

Metode: U svrhu praćenja 6 β -hidroksilacije testosterona primjenjen je vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s diodnim nizom. Za provedbu reakcije neophodan je koenzim citokroma P450 odnosno NADPH, te drugi enzimi koji sudjeluju u prijenosu elektrona kao što su NADPH reduktaza i citokrom b₅. Kako su citokromi P450 vezani na membrane endoplazmatskog retikuluma i eksprimirani u jetri idealan sustav za praćenje metaboličke aktivnosti su humani jetreni mikrosomi.

Rezultati: Rezultati analize prikazuju se u obliku ostatne aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu, a kao negativna kontrola primjenjuje se marker inhibitor CYP3A4/5 na primjer ketokonazol.

Zaključak: HPLC spregnut s DAD predstavlja osnovni analitički sustav za praćenje anaboličko-androgenih steroida koji se nadograđuje sa spektrometrijom masa i nadopunjuje s plinskom kromatografijom.

Introduction: 6 β -hydroxylation of testosterone represents a marker reaction of CYP3A4/5 enzyme. This reaction was used as an example for monitoring the most significant group of prohibited substances in sports – anabolic-androgenic steroids.

Methods: High performance liquid chromatography with diode array detector was used for monitoring 6 β -hydroxylation. In order to perform the reaction, it is essential to have a coenzyme of cytochrome P450 - NADPH, and other enzymes involved in electron transfer; NADPH-reductase and cytochrome b₅. Human liver microsomes are ideal system for monitoring the metabolic activity because cytochrom P450 enzymes are linked to membranes of endoplasmatic reticulum and are expressed in liver.

Results: The results of analysis are usually presented as residual activity in comparison to positive control. Ketoconazole, as a marker inhibitor of CYP3A4/5, was used as a negative control.

Conclusion: High performance liquid chromatography with diode array detector represents a basic analytical system for monitoring anabolic-androgenic steroids accompanied with mass spectrometry and gas chromatography.

8. Temeljna dokumentacijska kartica/
Basic Documentation Card

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRAĆENJE METABOLIZMA ANABOLIČKO-ANDROGENIH STEROIDA

Dino Đurinek

SAŽETAK

6 β -hidroksilacija testosterona predstavlja marker reakciju enzima CYP3A4/5. Ova reakcija korištena je kao ogledni primjer praćenja najznačajnije skupine nedozvoljenih tvari u sportu - anaboličko-androgenih steroida.

U svrhu praćenja 6 β -hidroksilacije testosterona primjenjen je vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s diodnim nizom. Za provedbu reakcije neophodan je koenzim citokroma P450 odnosno NADPH, te drugi enzimi koji sudjeluju u prijenosu elektrona kao što su NADPH reduktaza i citokrom b5. Kako su citokromi P450 vezani na membrane endoplazmatskog retikuluma i eksprimirani u jetri idealan sustav za praćenje metaboličke aktivnosti su humani jetreni mikrosomi.

Rezultati analize prikazuju se u obliku ostatne aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu, a kao negativna kontrola primjenjuje se marker inhibitor CYP3A4/5 na primjer ketokonazol.

HPLC spregnut s DAD predstavlja osnovni analitički sustav za praćenje anaboličko-androgenih steroida koji se nadograđuje sa spektrometrijom masa i nadopunjuje s plinskom kromatografijom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranice, 10 grafičkih prikaza i 31 literaturna navoda.

Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CYP3A4/5, testosteron, 6 β -hidroksitestosteron, biotransformacija, detekcija

Mentor: **Dr. sc. Mirza Bojić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mirza Bojić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Basic Documentation Card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

METABOLISM MONITORING OF ANABOLIC-ANDROGENIC STEROIDS

Dino Đurinek

SUMMARY

6 β -hydroxylation of testosterone represents a marker reaction of CYP3A4/5 enzyme. This reaction was used as an example for monitoring the most significant group of prohibited substances in sports – anabolic-androgenic steroids.

High performance liquid chromatography with diode array detector was used for monitoring 6 β -hydroxylation. In order to perform the reaction, it is essential to have a coenzyme of cytochrome P450 - NADPH, and other enzymes involved in electron transfer; NADPH-reductase and cytochrome b₅. Human liver microsomes are ideal system for monitoring the metabolic activity because cytochrom P450 enzymes are linked to membranes of endoplasmatic reticulum and are expressed in liver.

The results of analysis are usually presented as residual activity in comparison to positive control. Ketoconazole, as a marker inhibitor of CYP3A4/5, was used as a negative control.

High performance liquid chromatography with diode array detector represents a basic analytical system for monitoring anabolic-androgenic steroids accompanied with mass spectrometry and gas chromatography.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis include: 41 pages, 10 figures and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CYP3A4/5, enzyme, testosterone, 6 β -hydroxytestosterone, biotransformation, detection

Mentor: **Mirza Bojić, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mirza Bojić, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Željko Maleš, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Renata Jurišić Grubešić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry