

Ispitivanje mogućnosti inhibicije tiopurin S-metiltransferaze pripravcima odabranih biljnih vrsta

Mataija, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:576138>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marko Mataija

**Ispitivanje mogućnosti inhibicije tiopurin S-
metiltransferaze pripravcima odabranih biljnih vrsta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i neposrednim vodstvom dr. sc. Edvina Brusača.



Rad je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva“ (HRZZ-UIP-2017-05-3949).

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, na svim savjetima i potpori prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i dr. sc. Edvinu Brusaču na svojoj pozitivnoj atmosferi u labosu, ali i pomoći koja je uvelike olakšala izradu ovog rada. I za kraj, neizmjereno hvala mojoj obitelji i djevojci Katarini što su kroz cijeli studij bili netko na koga sam se mogao osloniti.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA | 1 |
| 1.1.1. Crohnova bolest..... | 1 |
| 1.1.2. Ulcerozni kolitis | 2 |
| 1.2. 6-MERKAPTOPURIN | 4 |
| 1.3. TIOPURIN S-METILTRANSFERAZA | 7 |
| 1.4. BILJNI PRIPRAVCI U LIJEČENJU UPALNIH BOLESTI CRIJEVA..... | 8 |
| 1.4.1. Kurkuma..... | 8 |
| 1.4.2. Indijski tamjanovac | 9 |
| 1.4.3. Kineski androfagis..... | 11 |
| 1.4.4. Crni papar | 12 |
| 1.5. OSNOVE MICHAELIS-MENTENIČINE KINETIKE | 13 |
| 1.5.1. Inhibicije enzima | 14 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 18 |
| 3.1. MATERIJALI | 18 |
| 3.1.1. Standardi i pomoćne tvari | 18 |
| 3.1.2. Otapala, soli, kiseline i lužine | 18 |
| 3.1.3. Ostalo | 18 |
| 3.2. INSTRUMENTACIJA..... | 19 |
| 3.3. METODE | 19 |
| 3.3.1. Ispitivanje potencijala inhibicije tiopurin S-metiltransferaze uzrokovane ekstraktima podanka kurkume, listova kineskog androfagisa, smole indijskog tamjanovca i plodova crnog papra..... | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje aktivnosti tiopurin S-metiltransferaze u hemolizatu | 24 |
| 4.2. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin S-metiltransferaze | 29 |
| 4.3. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost tiopurin S-metiltransferaze | 33 |
| 5. ZAKLJUČCI | 35 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 36 |
| 7. LITERATURA | 37 |
| 8. SAŽETAK..... | 41 |

1. UVOD

1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva bolesti su koje predstavljaju globalni zdravstveni problem, a u zadnjih nekoliko desetljeća bilježi se porast njihove incidencije. Kao dva najznačajnija predstavnika ističu se Crohnova bolest i ulcerozni kolitis koje karakterizira kronična recidivirajuća upala. Iako njihova etiologija nije u potpunosti poznata, smatra se da su čimbenici koji u konačnici uzrokuju nastanak ovih bolesti kombinacija genetske predispozicije, okolišnih čimbenika, specifičnosti crijevne mikroflore i poremećenog imunološkog odgovora (Zhang i Li, 2014).

1.1.1. Crohnova bolest

Incidencija Crohnove bolesti u svijetu iznosi od 3 do 20 ljudi na 100 000 stanovnika godišnje te je učestalija u zemljama Zapadne Europe i Sjeverne Amerike. Više zahvaća bjelačko stanovništvo (3:1 u odnosu na crnačko stanovništvo) te žene u odnosu na muškarce (Feuerstein i Cheifetz, 2017). Patofiziologija je složena te je rezultat više čimbenika koji uključuju genetske mutacije (mutacije NOD2 gena na 16. kromosomu najviše koreliraju s incidencijom Crohnove bolesti), okolišne čimbenike (pušenje 2 puta povećava rizik za nastanak bolesti), disbalans mikrobioma (kod oboljelih uočeno smanjenje broja bakterija iz rodova *Bacteroides* i *Firmicutes*) i poremećen intestinalni imunološki odgovor (Torres i sur., 2017).

Crohnova bolest karakterizirana je diskontinuiranom upalom koja može zahvatiti bilo koji dio probavnog trakta od usne šupljine do anusa. Upala je posredovana Th1 stanicama, javlja se u tzv. „patchevima“ između kojih se nalaze zdravi dijelovi crijeva, a bolest može uzrokovati oštećenje i dubljih dijelova stijenke crijeva. Ukoliko se ne liječi, progresivno napreduje te u konačnici dovodi do oštećenja crijeva i nemogućnosti normalnog života za oboljele. Iako može zahvatiti cijeli probavni trakt, najčešće je zahvaćeno područje terminalnog ileuma i kolona, ali sama bolest može imati i ekstraintestinalne komplikacije (Torres i sur., 2017). Gastrointestinalni simptomi bolesti uključuju proljev, abdominalnu bol, rektalno krvarenje, vrućicu i gubitak težine. S druge strane, anemija, osteoporoza, *erythema nodosum*, nefrolitijaza, venske tromboembolije i skleritis samo su neki od mogućih ekstraintestinalnih manifestacija Crohnove bolesti (Veauthier i Hornecker, 2018).

Glavni ciljevi liječenja Crohnove bolesti uključuju postizanje i održavanje remisije. Prva linija liječenja akutne upale uključuje primjenu kortikosteroida. Lijek prvog izbora za liječenje blage do umjerene bolesti je 5-aminosalicilat budezonid iz razloga što djeluje lokalno na ileum i kolon, a ukoliko se njime ne postigne ulazak u remisiju, preporuča se primjena sistemskih kortikosteroida (prednizolon odnosno metilprednizolon). Nakon ulaska u remisiju, preporuča se uporaba tiopurinskih analoga (azatioprin (AZA) i njegov aktivni oblik 6-merkaptopurin (6-MP)), kao i metotreksata koji imaju imunosupresivni učinak i kontroliraju ponovni nastanak upale.

Kod pacijenata koji nemaju zadovoljavajući odgovor na terapiju kortikosteroidima idući korak uključuje primjenu biološke terapije. U tu skupinu spadaju inhibitori faktora nekroze tumora (TNF- α) (infliksimab, certolizumab pegol, adalimumab te golimumab) koji suprimiraju upalni odgovor organizma vezanjem na TNF- α koji je glavni proupalni citokin u ljudskom organizmu, vedolizumab koji upalni put inhibira vezanjem na integrin $\alpha 4\beta 7$ koji se nalazi na pomagačkim T limfocitima u crijevima te ustekinumab koji se veže na podjedinice interleukina IL-12 i IL-23 te sprječava daljnju aktivaciju imunskog sustava posredovanu tim interleukinima. Početak liječenja nekim od ovih lijekova u Republici Hrvatskoj odobrava Bolničko povjerenstvo za lijekove.

Zadnji korak liječenja uključuje operativno liječenje, a primjenjuje se kod onih pacijenata koji su razvili određene komplikacije (maligne promjene i apscesi) (Lamb i sur., 2019; Torres i sur., 2017, 2020).

1.1.2. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis je, kao i Crohnova bolest, bolest koja zahvaća stanovništvo cijelog svijeta, ali ponajprije onog razvijenijeg pa je tako njegova najveća incidencija u Sjevernoj Americi i u Europi, a ovisno o promatranom području iznosi između 0,5 do 31,5 novooboljelih na 100 000 stanovnika godišnje. Većinom zahvaća ljude između 30 i 40 godina te podjednako zahvaća muškarce i žene. Zanimljivo je također da više obolijevaju ljudi iz sjevernih krajeva u odnosu na južne (sjeverna \rightarrow južna Europa i sjever \rightarrow jug SAD-a) (Da Silva i sur., 2014).

Bolest je složene patofiziologije te se smatra da je poremećaj epitelne i mukozne barijere crijeva, kao i samih kolonocita, glavni razlog nastanka bolesti. Rizični čimbenici za razvoj

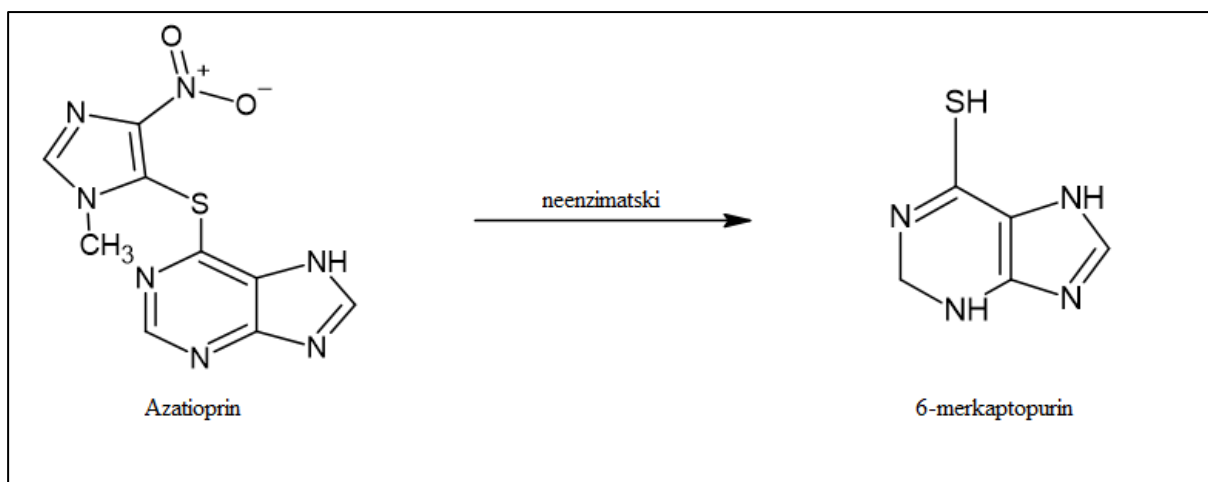
bolesti uključuju pojedine genetske mutacije, obiteljsku predispoziciju, kao i urbani način života. Također, uočeno je da oboljeli od ulceroznog kolitisa imaju smanjenu aktivnost PPAR- γ receptora u kolonocitima (negativan regulator NF- κ B posredovane upale), povećanu gensku ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora te smanjenu bioraznolikost crijevne mikroflore u odnosu na zdrave pojedince (smanjen udio bakterija roda *Firmicutes*) (Ungaro i sur., 2017). Zanimljiva je i činjenica da, za razliku od Crohnove bolesti gdje je pušenje jedan od rizičnih faktora za razvoj bolesti, kod ulceroznog kolitisa pušenje ima protektivan učinak na nastanak bolesti te da pušačima sama bolest sporije napreduje (Da Silva i sur., 2014).

Ulcerozni kolitis karakterizira kronična, difuzna, mukozna upala koja u većini slučajeva zahvaća rektum te se dalje kontinuirano širi u proksimalne dijelove debelog crijeva. Upala je posredovana Th2 stanicama te povećanom koncentracijom interleukina IL-4 i IL-13 što je još jedan od faktora koji ovu bolest razlikuju od Crohnove bolesti. Bolest prvenstveno karakteriziraju učestali proljevi i krvave stolice. Uz navedene simptome ostali uključuju umor, urgenciju, inkontinenciju, noćne defekacije, abdominalne bolove i grčeve u crijevima. Uz gastrointestinalne simptome, jedan dio oboljelih (trećina pacijenata) razvije i one ekstraintestinalne koji uključuju periferni artritis, primarni sklerodirajući kolangitis, *pyoderma gangrenosum* i venske tromboembolije (Ungaro i sur., 2017).

Smjernice liječenja ulceroznog kolitisa uključuju primjenu različitih lijekova kako bi se postigla i u konačnici očuvala remisija bolesti i pacijentima omogućilo normalno životno funkcioniranje. Prvi korak liječenja uključuje primjenu 5-aminosalicilata (5-ASA) (sulfasalazin odnosno mesalazin) koji djeluju protuupalno, a mogu se primijeniti oralno i rektalno (u obliku supozitorija i rektalnih suspenzija) te pokazuju pozitivne učinke u akutnoj fazi bolesti kao i u održavanju remisije. Kao dodatna terapija kod umjereno teških oblika bolesti koristi se i budesonid ili neki od sistemskih kortikosteroida (prednizolon te metilprednizolon) ukoliko prethodno navedeni pokušaji liječenja ne dovedu do remisije. Za održavanje remisije, ukoliko 5-ASA nisu djelotvorni, koriste se tiopurinski analozi (AZA i 6-MP) koji svojim djelovanjem „štete“ uporabu kortikosteroida. Kod težih oblika bolesti koristi se i biološka terapija koja uključuje primjenu antagonista TNF- α (adalimumab, certolizumab pegol, golimumab i infliksimab), protutijela na integrin α 4 β 7 (vedolizumab), protutijela na podjedinice interleukina IL-12 i IL-23 (ustekinumab) i inhibitora JAK kinaze proupalnog signalnog puta (tofacitinib). Zadnja linija liječenja obuhvaća kirurško liječenje (Kucharzik i sur., 2020).

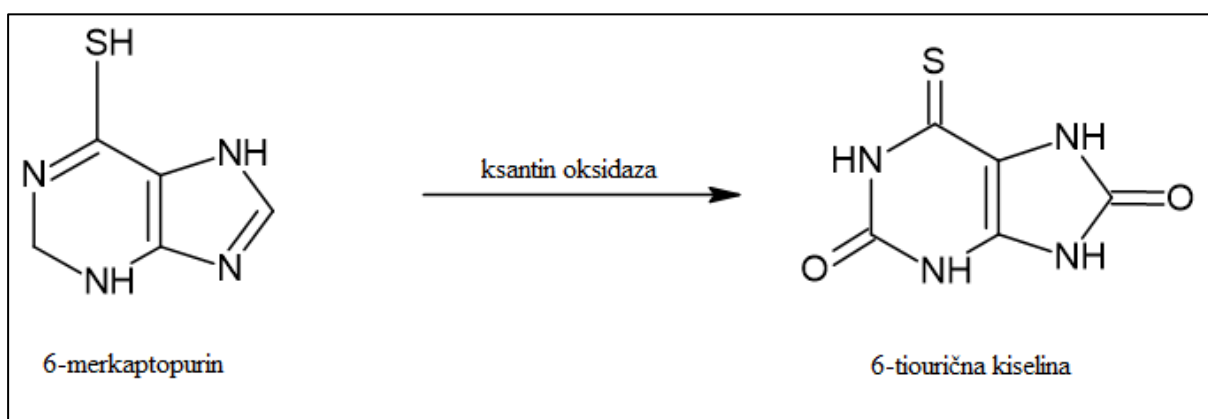
1.2. 6-MERKAPTOPURIN

6-MP je lijek koji zajedno s AZA, čiji je aktivni metabolit, spada u skupinu tiopurinskih imunomodulatora. Indikacije za njihovu upotrebu uključuju liječenje bolesti za koje je nužno, samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima (najčešće kortikosteroidima), suprimirati imunosti odgovor pacijenta. Indicirani su za poboljšanje preživljavanja transplantiranih organa (bubreg, srce i jetra) te liječenje reumatoidnog artritisa, akutne limfoblastične leukemije, sistemskog eritematoznog lupusa, dermatomiozitisa i polimiozitisa, autoimunog kroničnog aktivnog hepatitisa, vulvularnog pemfigusa kao i za liječenje umjerene do teške upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis). 6-MP aktivni je metabolit AZA iz kojeg nastaje brzim neenzimatskim procesom (Slika 1). Osim što nastaje iz AZA može se primjenjivati i kao samostalan lijek za kojeg onda nije potrebna prethodna metabolička aktivacija iz AZA. Njegova transformacija u aktivne metabolite započinje prelaskom u tiiozin monofosfat (TiMP) koji je posredovan hipoksantin fosforiboziltransferazom. Iz TiMP-a se odvija brza konverzija u tiogvaninske nukleotide (6-TGN). Smatra se da je imunosupresivni i citotoksični učinak 6-MP posredovan nastankom 6-TGN koji se ugrađuju u stanične nukleinske kiseline, što u konačnici dovodi do inhibicije proliferacije limfocita. Uz ovu teoriju farmakološkog djelovanja 6-MP smatra se i da 6-TGN mogu dovesti do apoptoze limfocita inhibirajući Rac1 posredovanu aktivaciju T stanica (Dubinsky, 2004).

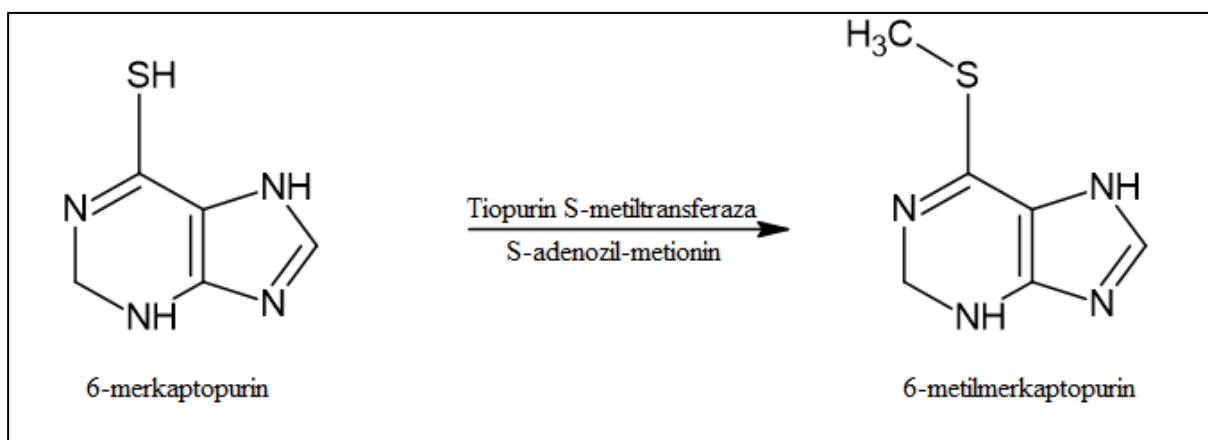


Slika 1. Pretvorba AZA u 6-MP

Metabolizam 6-MP, osim onog koji vodi njegovoj aktivaciji i farmakološkom učinku, uključuje i procese njegove inaktivacije u organizmu. 6-MP podložan je intenzivnom metabolizmu prvog prolaska posredovanog ksantin oksidazom (XO) u intestinalnoj mukozi i jetri koja uvelike utječe na njegovu sistemsku bioraspodjelu (Slika 2). Uz XO, važan enzim koji sudjeluje u inaktivaciji 6-MP je i tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) čijim posredstvom nastaju metilirani produkti merkaptopurina (Slika 3). TPMT je enzim koji je podložan genetskoj varijabilnosti te je iz tog razloga kod bolesnika bitno odrediti njegovu aktivnost kako bi terapija pokazala svoj učinak i kako bi se izbjegla njezina toksičnost (Dubinsky, 2004).

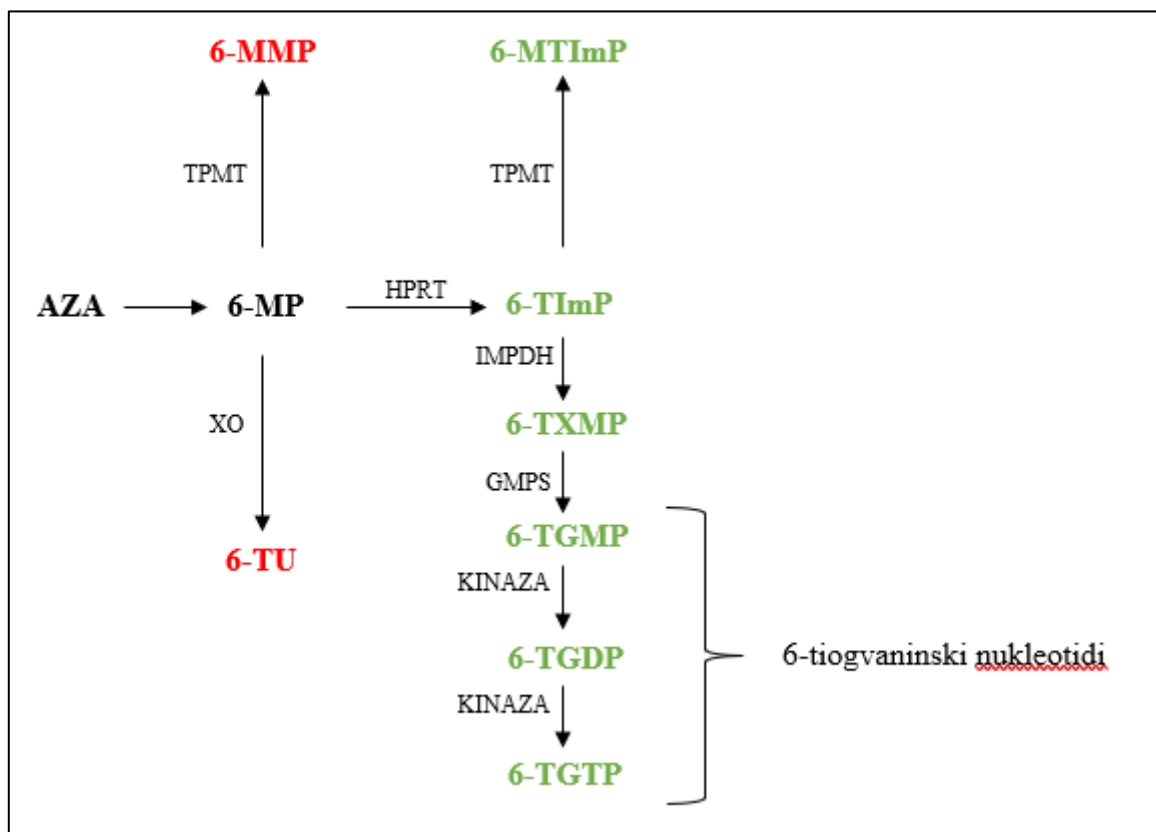


Slika 2. Metabolizam 6-MP putem XO



Slika 3. Metabolizam 6-MP putem TPMT

Nuspojave 6-MP mogu se podijeliti na one neovisne o dozi (idiosinkratske), kao i na one ovisne o njoj. Nuspojave neovisne o dozi uključuju simptome poput vrućice, abdominalnih bolova, osipa, malaksalosti, pankreatitisa i hepatitisa, a nastupaju obično 2 do 4 tjedna nakon početka terapije te ih nije moguće prevenirati. Nuspojave na koje je moguće utjecati jesu one ovisne o dozi. U njih spadaju hepatotoksičnost, potencijalne maligne promjene, ali i mijelosupresija (prezentira se kao leukopenija) kao najčešća nuspojava ovisna o dozi (Dubinsky, 2004). Istraživanja potencijalne toksičnosti 6-MP u trudnoći nisu dala jednoznačan odgovor, ali prilikom registracije lijeka u RH navedeno je kako je potrebno pažljivo procijeniti odnose rizika i koristi prije primjene 6-MP trudnicama i ženama koje planiraju trudnoću. S druge strane, primjena AZA kontraindicirana je kod trudnica. Također, kontraindicirano je dojenje osobama koje su na terapiji 6-MP, kao i AZA (SMPC Imuran 50 mg, SMPC Xalopurine 20 mg/ml).



Slika 4. Metabolički putevi AZA i 6-MP u ljudskom organizmu (crvenom bojom su prikazani produkti kataboličkih reakcija tj. onih koje dovode do nastanka inaktivnih produkata, dok su zelenom bojom prikazani produkti anaboličkih reakcija). 6-MMP – 6-metilmerkaptopurin; 6-TU – 6-tiourična kiselina; HPRT - hipoksantin fosforiboziltransferaza; (6-TImP) - 6-tioinozin

monofosfat; IMPDH - inozin monofosfat dehidrogenaza; GMPS - gvanozin monofosfat sintetaza; 6-TGMP - 6-tiogvanozin monofosfat

1.3. TIOPURIN S-METILTRANSFERAZA

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT, E.C. 2.1.1.67) citosolni je enzim koji je u ljudskom organizmu najviše zastupljen u srcu i jetri, a najmanje u mozgu i plućima. Metabolizira reakcije S-metilacije aromatskih i heterocikličnih sulfhidrilnih skupina kao što su tiopurinski i tiopirimidinski lijekovi. U tim reakcijama, kao kofaktor, sudjeluje S-adenozil-metionin (SAM) koji prenosi metilnu skupinu konačnom produktu. Među ksenobiotike koje TPMT metabolizira spadaju i AZA i 6-MP koji se u reakciji posredovanom ovim enzimom inaktiviraju. TPMT je podložan genetskom polimorfizmu i primjer je „*single nucleotide polymorphism*“ pa ga tako nalazimo u 3 različita oblika: homozigotnom divljem tipu s visokom enzimskom aktivnošću (86-97 % populacije), heterozigotnom tipu sa smanjenom enzimskom aktivnošću (3-14 % populacije) i homozigotnom recesivnom tipu s najslabijom enzimskom aktivnošću (0,027-0,56 % populacije) (Asadov i sur., 2017). Osim genetskog polimorfizma, na aktivnost samog enzima mogu utjecati i neki ksenobiotici što, u konačnici, može utjecati na uspješnost terapije. Neki od ksenobiotika za koje je u *in vitro* uvjetima dokazano da inhibiraju TPMT jesu mefenaminska kiselina, naproksen i ketoprofen (Oselin i Anier, 2007), kao i diuretici furosemid, triklormetiazid i bendroflumetiazid (Lysaa i sur., 1996).

AZA i 6-MP lijekovi su uske terapijske širine te su iz tog razloga utjecaj genetskog polimorfizma, ali i primjena određenih ksenobiotika, važni čimbenici koji utječu na uspješnost liječenja bolesnika oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Razina aktivnosti TPMT negativno korelira s koncentracijom aktivnih metabolita 6-MP u plazmi što znači da osoba, pri uobičajenom doziranju, koja ima smanjenu aktivnost ovog enzima, ima povećane šanse za razvijanje ozbiljnih nuspojava kao što je mijelosupresija. Upravo iz tog razloga, prije početka terapije ovim lijekovima, preporuka je provjeriti individualnu TPMT aktivnost kako bi se rizik nuspojava ovisnih o dozi sveo na najmanju moguću mjeru (Bessa i sur., 1994).

1.4. BILJNI PRIPRAVCI U LIJEČENJU UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Pored konvencionalne farmakoterapije, o kojoj je više govora bilo u prethodnim poglavljima, sve se više pacijenata okreće komplementarnoj i alternativnoj medicini. Razlog tomu može biti nezadovoljavajuća učinkovitost ili loša podnošljivost standardne terapije koja, nekim pacijentima, ne pruža nadu u oporavak (Holleran i sur., 2020). Narodna medicina je, kroz stoljeća korištenja, uočila određenu terapijsku učinkovitost pojedinih biljnih vrsta u liječenju širokog spektra bolesti koje su nekad, ali i danas, narušavale ljudsko zdravlje. Tako su se, na temelju njihovog protuupalnog i imunomodulatornog učinka, izdvojile biljke koje su primjenjivali u liječenju upalnih bolesti crijeva. U daljnjem tekstu detaljnije će se obraditi neke od njih, uključujući kurkumu (*Curcuma longa*), crni papar (*Piper nigrum*), indijski tamjanovac (*Boswellia serrata*) i kineski androfagis (*Andrographis paniculata*).

1.4.1. Kurkuma

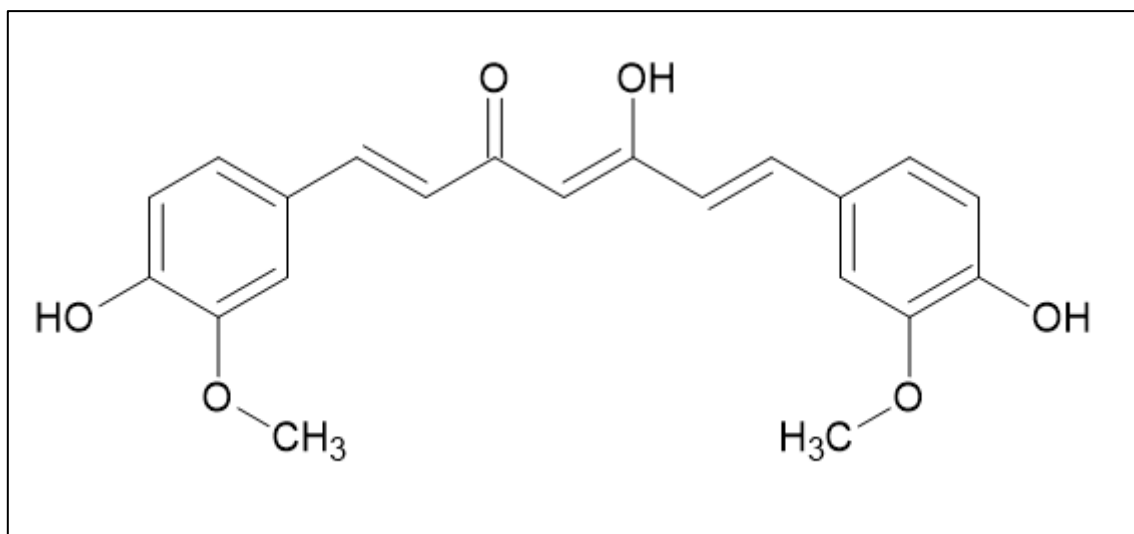
Kurkuma (*Curcuma longa*) je višegodišnja biljka iz porodice Zingiberaceae koja podrijetlo vuče iz Indije i drugih dijelova jugoistočne Azije. U tim krajevima, ali i diljem svijeta, koristi se kao začim, ali i kao tradicionalni biljni lijek za liječenje nekih ginekoloških, kožnih i gastrointestinalnih bolesti, uključujući i upalne bolesti crijeva. Aktivni sastojci, koji se izoliraju iz podanka i pokazuju navedene učinke, nazivaju se kurkuminoidima, uz kurkumin kao glavnu djelatnu tvar kurkume (uz kurkumin, farmakološku aktivnost pokazuju dimetoksikurkumin i bisdemetoksikurkumin) (Pagano i sur., 2018).

Kurkumin je lipofilna fenolna molekula (Slika 5) koja, upravo zbog svoje lipofilnosti, bilježi slabu intestinalnu apsorpciju. Iz tog razloga kurkumin je pogodan za liječenje određenih gastrointestinalnih bolesti, ali pokazuje slabiji sistemski učinak (Pagano i sur., 2018). Kako bi došlo do poboljšanja njegove sistemske apsorpcije, kurkumin se često kombinira s crnim paprom (*Piper nigrum*) koji poboljšava njegovu bioraspodjeljivost (Shoba i sur., 1998).

Mehanizam djelovanja kurkumina uključuje inhibiciju NF- κ B i JAK/STAT posredovanog upalnog odgovora te redukciju ekspresije iNOS i COX-2 enzima. Također, zabilježena je smanjena produkcija proupalnih citokina TNF- α , IFN- γ , IL-1 β i IL-6, a povećana onih

protuupalnih IL-4 i IL-10. Na temelju ovih mehanizama iskazuje antimikrobno, protuupalno, antioksidativno i antikarcinogeno djelovanje (Holleran i sur., 2020).

Provedene kliničke studije uspoređivale su učinkovitost kurkumina u liječenju ulceroznog kolitisa u odnosu na placebo, ali i u odnosu na terapiju 5-aminosalicilatima mesalazinom i sulfasalazinom. Neke studije dokazale su njegovu učinkovitost u postizanju remisije i smanjenju simptoma bolesti (Hanai i sur., 2006; Lang i sur., 2015) dok, s druge strane, pojedine studije nisu našle značajne razlike između placeba i korištenja kurkumina (Kedia i sur., 2017; Singla i sur., 2014).



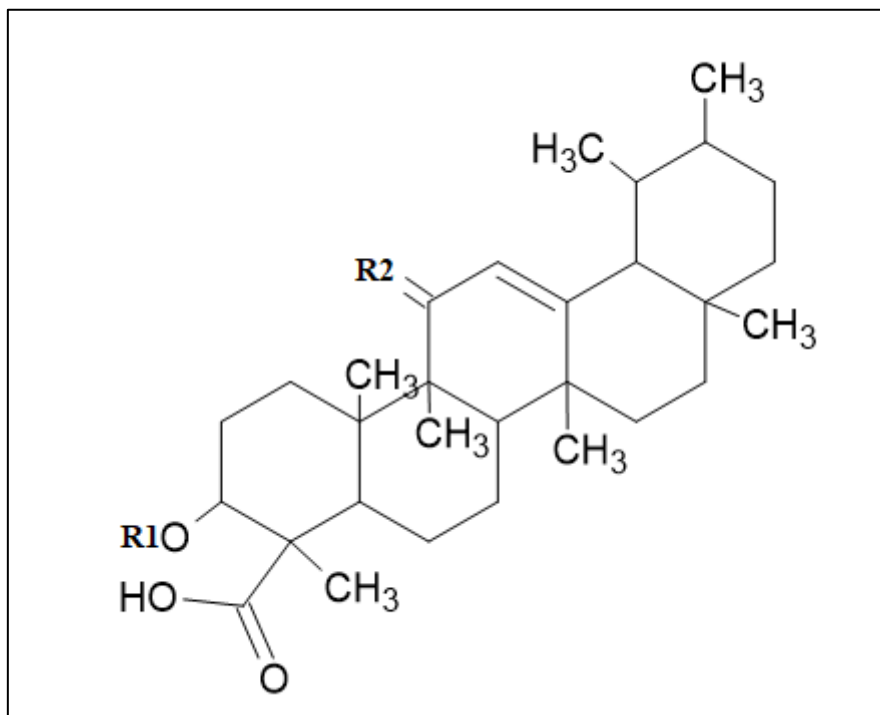
Slika 5. Struktura kurkumina

1.4.2. Indijski tamjanovac

Indijski tamjanovac (*Boswellia serrata*) umjereno je do veliko stablo iz porodice Burseraceae koje raste u sušnim planinskim područjima Indije, sjeverne Afrike i Bliskog istoka (Siddiqui, 2011). Narodna medicina prepoznala je njen protuupalni potencijal te je koristi u liječenju različitih kroničnih upalnih, ali i autoimunih bolesti. Aktivni sastojci indijskog tamjanovca izoliraju se iz smole prikupljene zarezivanjem njenog debla, a sastoje se od smjese bosveličnih kiselina (β -bosvelične kiseline, 11-keto- β -bosvelične kiseline i acetil-11-keto- β -bosvelične kiseline) (Slikate i Dhaneshwar, 2017).

Mehanizam njenog djelovanja uključuje inhibiciju porasta ekspresije P-selektina na endotelnim stanicama što u konačnici smanjuje brojnost leukocita na mjestu upale. Također, inhibira porast lipidne peroksidacije i ekspresije iNOS enzima. Smanjuje produkciju proupalnih citokina TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 i IL-12, a povećava produkciju onih protuupalnih, IL-4 i IL-10 (Holleran i sur., 2020).

Klinička istraživanja za cilj su imala dokazivanje učinkovitosti indijskog tamjanovca u liječenju Crohnove bolesti. Uspoređivala se njegova učinkovitost u ublažavanju simptoma bolesti u usporedbi s pacijentima na terapiji mesalazinom, kao i učinkovitost održavanja remisije u usporedbi s placebo grupom. Navedena istraživanja pokazale su povoljne učinke indijskog tamjanovca u smanjenju simptoma bolesti (Gerhardt i sur., 2001), ali ne i u održavanju njene remisije (Holtmeier i sur., 2011).



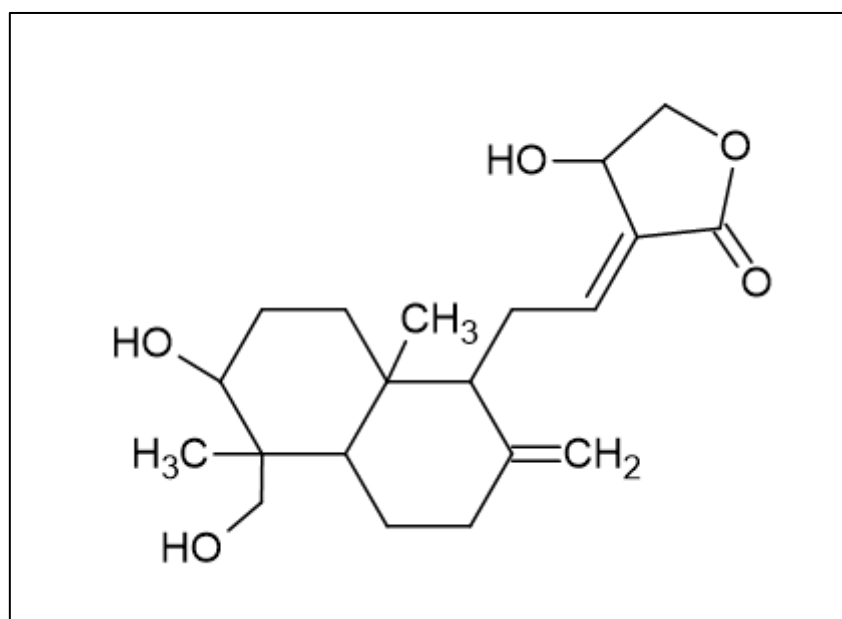
Slika 6. Strukture bosveličnih kiselina (β -bosvelične kiseline R₁=H; R₂=H, 11-keto- β -bosvelične kiseline R₁=H; R₂=O i acetil-11-keto- β -bosvelične kiseline R₁=Ac; R₂=O)

1.4.3. Kineski androfagis

Kineski androfagis (*Andrographis paniculata*) zeljasta je biljka iz porodice Acanthaceae koja je široko rasprostranjena na području istočne i južne Azije, prvenstveno na području Indije i Šri Lanke (Dai i sur., 2019). Zbog svojih antioksidacijskih, protuupalnih i antipiretskih učinaka koristi se u komplementarnoj i alternativnoj medicini u liječenju respiratornih i gastrointestinalnih infekcija. Glavnu aktivnu sastavnicu biljke predstavlja spoj andrografolid (Slika 7) koji se nalazi u listovima i stabljikama kineskog androfagisa (Zhu i sur., 2018).

Mehanizam farmakološkog učinka ove biljke temelji se na inhibiciji proliferacije i diferencijacije naivnih T-stanica u Th1 i Th17, inhibiciji NF- κ B posredovanog upalnog odgovora te redukciji ekspresije iNOS i COX-2 enzima. Zabilježeno je i smanjenje produkcije proupalnih citokina TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-22, IL-17A i IL-23, kao i povećanje protuupalnog IL-4 (Holleran i sur., 2020).

Klinička ispitivanja na andrografolidu ispitivala su njegovu učinkovitost u liječenju ulceroznog kolitisa u usporedbi s pacijentima na terapiji mesalazinom. Jedna studija došla je do podataka o njihovoj podjednakoj učinkovitosti u poboljšanju simptoma za pacijente (Tang i sur., 2011), dok je druga zaključila kako je veća doza andrografolida bila učinkovitija od terapije mesalazinom, ali je uzrokovala i jače nuspojave (Sandborn i sur., 2013).



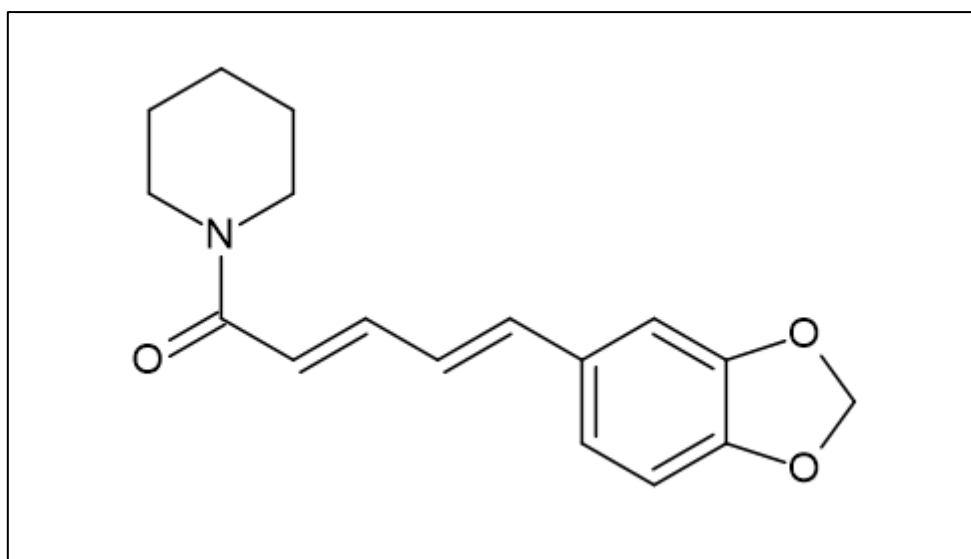
Slika 7. Struktura andrografolida

1.4.4. Crni papar

Crni papar (*Piper nigrum*) biljka je penjačica iz porodice Piperaceae koja svoje podrijetlo vuče iz jugoistočne Azije. Iako je najpoznatija kao začin, koristi se i u narodnoj medicini kao karminativ, ali i u liječenju upalnih autoimunih bolesti. Spoj najzaslužniji za navedene učinke je alkaloid piperin koji se izolira iz ploda biljke (Slika 8) (Derosa i sur., 2016).

Usprkos svom protuupalnom učinku, crni papar svoju je najčešću primjenu u modernim farmaceutskim pripravcima našao kao tvar koja povećava apsorpciju i djelatnu koncentraciju tvari koje su podložne intenzivnoj metabolizaciji u jetri. Mehanizam njegovog djelovanja temelji se na stimulaciji aminokiselinskih transportera u tankom crijevu, inhibiciji P-glikoproteina i inhibiciji glukuronidacije, kako u jetri, tako i u tankom crijevu koja je odgovorna za inaktivaciju pojedinih ksenobiotika (Shoba i sur., 1998).

Primjeri nekih terapeutika za koje je potvrđeno da im piperin povećava bioraspodivnost uključuju barbiturate, beta-karoten, resveratrol, propranolol, rifampicin, selen, ali i kurkumin zbog čega se često kombinira u pripravcima za liječenje upalnih bolesti crijeva (Derosa i sur., 2016).



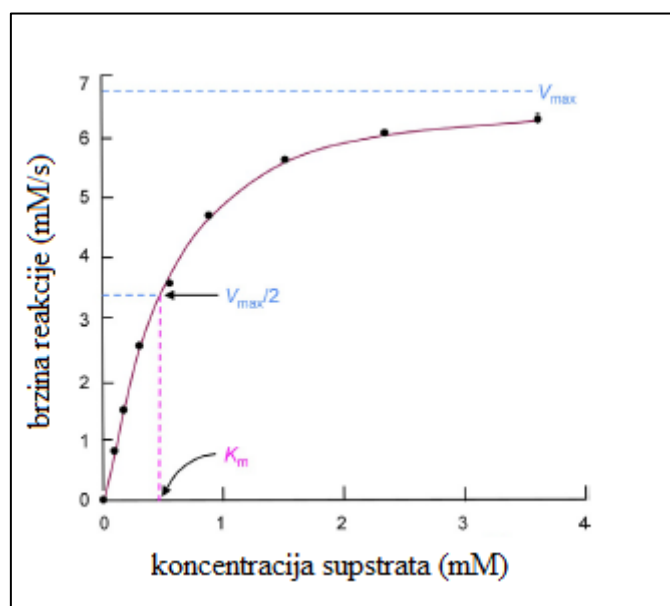
Slika 8. Struktura piperina

1.5. OSNOVE MICHAELIS-MENTENIČINE KINETIKE

Enzimska kinetika područje je biokemije koje proučava mehanizme i brzinu kemijskih reakcija posredovanih enzimima. Jednu od metoda koja pokušava matematički opisati kako se takve reakcije odvijaju razvili su Leonor Michaelis i Maud Menten 1913. godine (www.britannica.com). Njihov model podrazumijeva reakciju između supstrata (S) i enzima (E) u kojoj, kao međuprodukt, nastaje spoj enzim-supstrat (ES) koji u konačnici prelazi u produkt reakcije (P) i slobodni enzim (1).



Graf funkcije njihova modela izgleda kao hiperbola (Slika 9) koji prikazuje ovisnost brzine kemijske reakcije o koncentraciji supstrata pri konstantnoj koncentraciji enzima.



Slika 9. Graf Michaelis-Menteničinog modela enzimske kinetike; V_{\max} – maksimalna brzina enzimske reakcije; K_m – Michaelisova konstanta (koncentracija supstrata na polovici maksimalne brzine)

Iz grafa je moguće zaključiti kako pri nižim koncentracijama supstrata reakcija slijedi kinetiku prvog reda (brzina reakcije se linearno povećava povećanjem koncentracije supstrata), dok pri višim koncentracijama reakcija slijedi kinetiku nultog reda (brzina reakcija postaje neovisna o daljnjim povećanjima koncentracije supstrata) i doseže maksimalnu brzinu V_{\max} (Clarke, 2013). Osim V_{\max} , Michaelis i Menten opisali su još jedan pojam, Michaelisovu konstantu (K_m), koja

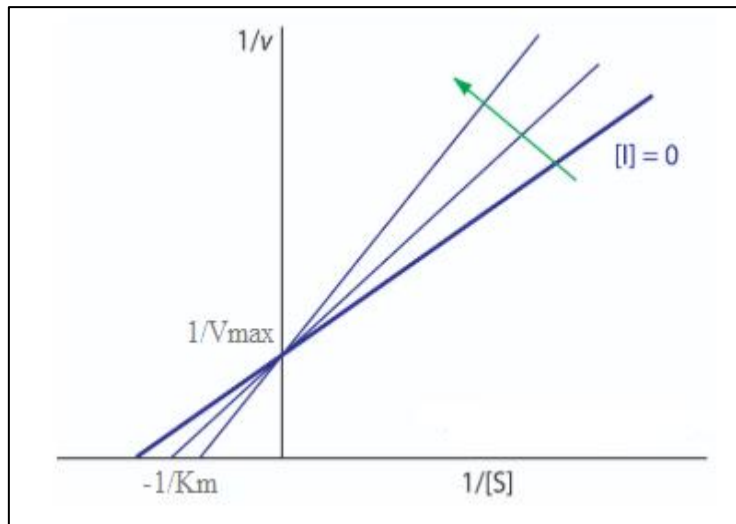
se definira kao koncentracija supstrata na polovici maksimalne brzine (V_{\max}) i daje uvid u potentnost samog enzima (Roskoski, 2015). Radi lakšeg praćenja razvijen je i Lineweaver-Burk model koji je praćene parametre prikazao linearnom jednadžbom koja je pratila ovisnost recipročne brzine reakcije ($1/v$) o recipročnoj koncentraciji supstrata ($1/[S]$). Odsječak na x-osi definira vrijednost $-1/K_m$, a odsječak na y-osi vrijednost $1/V_{\max}$.

1.5.1. Inhibicije enzima

Michaelis-Menteničin model, osim što uspješno opisuje kinetike enzimskih procesa, služi i za praćenje enzimskih inhibicija koje se očituju promjenama vrijednosti njihove maksimalne brzine ili Michaelisove konstante. Inhibicije enzima mogu se podijeliti na ireverzibilne i reverzibilne. Ireverzibilne inhibicije su one prilikom kojih se inhibitor kovalentno veže za enzim te dolazi do potpune inaktivacije enzima koji više nema sposobnost regeneracije. Reverzibilne inhibicije, s druge strane, uvelike ovise o koncentraciji inhibitora koji se na enzim ne vežu kovalentno te uzrokuju privremeno smanjenu funkciju enzima koji može ponovno uspostaviti svoju funkciju. Takve inhibicije dijele se na one kompetitivne, akompetitivne i nekompetitivne (Roskoski, 2015).

1.5.1.1. Kompetitivne inhibicije

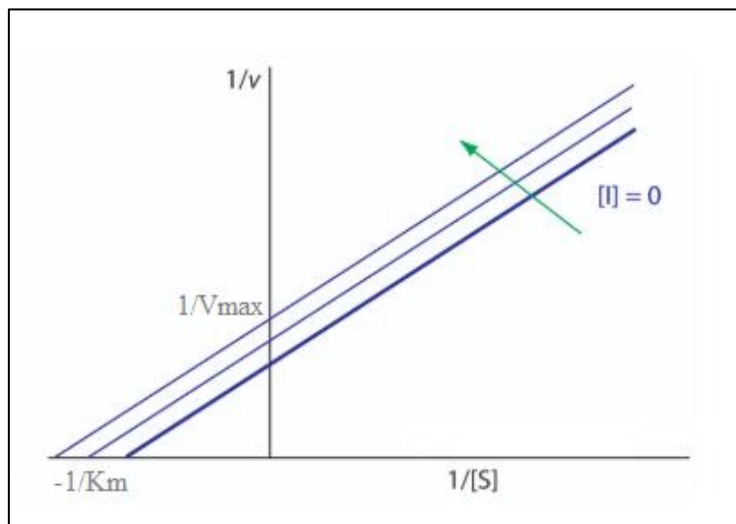
Kod kompetitivne inhibicije i supstrat i inhibitor vežu se u aktivno mjesto enzima te se ne mogu vezati istodobno. To dovodi do prividnog povećanja K_m vrijednosti dok V_{\max} vrijednost ostaje nepromijenjena (Slika 10). Učinak ovakvog tipa inhibicije može se nadvladati povećanjem koncentracije supstrata (Roskoski, 2015).



Slika 10. Prikaz kompetitivne inhibicije na Lineweaver-Burk modelu; preuzeto i prilagođeno iz (<https://chem.libretexts.org/>)

1.5.1.2. Akompetitivne inhibicije

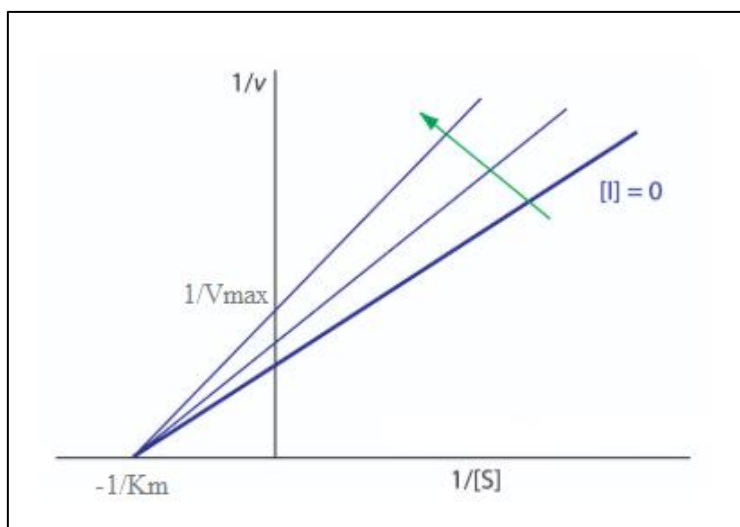
Kod akompetitivnog tipa inhibicije inhibitor se veže isključivo za kompleks ES i na taj način onemogućuje nastanak produkta. To dovodi do smanjenja maksimalne brzine reakcije (V_{max}), ali i do smanjenja K_m vrijednosti što se interpretira kao prividno povećanje potentnosti enzima za sam supstrat (Slika 11) (Roskoski, 2015).



Slika 11. Prikaz akompetitivne inhibicije na Lineweaver-Burk modelu; preuzeto i prilagođeno iz (<https://chem.libretexts.org/>)

1.5.1.3. Nekompetitivne inhibicije

Nekompetitivne inhibicije karakterizira vezanje inhibitora na sam enzim i na kompleks ES. Inhibitor se u ovom slučaju ne veže na isto mjesto kao i supstrat, već se veže na alosteričko mjesto koje se nalazi na različitom području molekule enzima. Ovaj tip inhibicije ne može se nadvladati povećanjem koncentracije supstrata, a dovodi do smanjenja V_{\max} vrijednosti dok K_m ostaje nepromijenjena (Slika 12) (Roskoski, 2015).



Slika 12. Prikaz nekompetitivne inhibicije na Lineweaver-Burk modelu; preuzeto i prilagođeno iz (<https://chem.libretexts.org/>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalne bolesti crijeva bolesti su čija je prevalencija unazad nekoliko desetljeća u porastu. Smatraju se javnozdravstvenim problemom, a kako ponajviše zahvaćaju mlađe, radno sposobne ljude, predstavljaju problem i cjelokupnom gospodarskom sustavu. Bolesnici oboljeli od ovih bolesti, uz klasičnu terapiju pod kojom se podrazumijeva primjena aminosalicilata, kortikosteroida, imunomodulatora i biološke terapije, često pokušavaju postići remisiju i njeno održavanje i određenim biljnim pripravcima koji spadaju u alternativnu i komplementarnu medicinu. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li potencijalna farmakokinetička interakcija između pripravaka odabranih biljnih vrsta (ekstrakti kurkume, indijskog tamjanovca, kineskog androfagisa i crnog papra) i konvencionalnih lijekova, točnije dovode li biljni pripravci do inhibicije tiopurin S-metiltransferaze, enzima ključnog u metabolizmu AZA i 6-MP, koja bi mogla narušiti sigurnost i/ili učinkovitost terapije ovim lijekovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Standardi i pomoćne tvari

- 6-metilmerkaptopurin, 98 % (Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- furosemid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- merkaptopurin monohidrat, >98 % (TCI, Tokio, Japan)
- S-(5'-adenozil)-L-metionin p-toluensulfonat, ≥ 80 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

3.1.2. Otapala, soli, kiseline i lužine

- acetonitril, MS čistoće (VWR International, Fontenay-sus-Bois, Francuska)
- dimetil sulfoksid (DMSO), p.a. čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- etanol, HPLC čistoće (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- Hanksova uravnotežena otopina soli, sterilna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- metanol, HPLC čistoće (VWR International, Fontenay-sus-Bois, Francuska)
- mravlja kiselina, HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev hidroksid, 97,0 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- natrijev karbonat, >99,0 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- perklorna kiselina, 70 % (Fluka, Buchs, Švicarska)

3.1.3. Ostalo

- crni papar, mljeveni (Šafram, Zagreb, Hrvatska)
- DL-ditiotreitol, >98,0 % (TCI, Tokio, Japan)
- Extreme Potency Boswellia Extract (HerbaDiet, Rohtak, Indija)
- kurkumin, prirodni (TCI, Tokio, Japan)

- Organic Andrographis Paniculata Leaves Powder (Maple life sciences, Delhi, Indija)

3.2. INSTRUMENTACIJA

- analitička vaga AG245 s mogućnošću očitavanja 0,01 mg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- centrifuga mini G (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)
- grijaći blok TDB-120 (Biosan, Riga, Latvija)
- mikrovaga MX5 s mogućnošću očitavanja 1 µg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- tekućinski kromatograf 1100 Series sastavljen od kvaterne pumpe G1311A, degazera G1379A, autoinjektora G1329A s termostatom G1330B, termostatiranog odjeljka za kolonu G1316A i detektora niza dioda G1315B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic XtraTT (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- uređaj za pročišćavanje vode Ultra Clear UV (SG Water, Barsbuttel, Njemačka)
- uređaj za vorteksiranje Vortex 2 (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)

3.3. METODE

3.3.1. Ispitivanje potencijala inhibicije tiopurin S-metiltransferaze uzrokovane ekstraktima podanka kurkume, listova kineskog androfagisa, smole indijskog tamjanovca i plodova crnog papra

3.3.1.1. Uzorkovanje i predobradba krvi

Provedeno istraživanje odobreno je od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa 643-02/21-03/01, ur. broj. 251-62-03-21-10, Zagreb, 22. veljače 2021.). 50 mL krvi dobrovoljca izvađeno je venepunkcijom u epruvete koje su sadržavale K₂EDTA kao antikoagulans. Ta krv je zatim

centrifugirana na 2000g kroz 10 min na 4 °C što je dovelo do odvajanja slojeva plazme, leukocita i trombocita od eritrocita. Zatim su eritrociti isprani istim volumenom Hanksove uravnotežene otopine soli te se, nakon ponovnog centrifugiranja na 2000g kroz 10 min, uklonio supernatant. Ovaj postupak ponovljen je još dva puta. Sljedeći cilj bio je postići hemolizu eritrocita zbog čega je njihovom koncentratu dodan četverostruki volumen ledene ultračiste vode. Nakon hemolize suspenzije su homogenizirane, alikvotirane i zamrznute na -20 °C kako bi se sačuvale do trenutka ispitivanja.

Prije početka samog ispitivanja, hemolizati su odležani pri sobnoj temperaturi, centrifugirani kroz 5 min na 2000g te su se dobiveni alikvoti koristili za daljnje postupke. Kako bi se dobile točne koncentracije hemoglobina u svakom od alikvota korištenih za ispitivanje, svi hemolizati standardizirani su na količinu hemoglobina (Hb) prema modifikaciji metode Harboea i sur. (Harboe, 1959). Postupak je uključivao razrjeđivanje (tisuću puta) supernatanta hemolizata otopinom natrijeva karbonata koncentracije 0,1 g/L te mjerenje apsorbancije dobivene otopine na 380, 415 i 450 nm uz korištenje istog otapala kao slijepe probe. Koncentracija hemoglobina (u g/dL) izračunata je korištenjem jednadžbe (2),

$$\text{Hb (g/dL)} = 8,36 (2 \times A_{415} - A_{380} - A_{450}) \quad (2)$$

u kojoj A_{415} , A_{380} i A_{450} predstavljaju izmjerene apsorbancije na navedenim valnim duljinama.

3.3.1.2. Priprema ekstrakata odabranih biljnih droga

Ekstrakti podanka kurkume (kurkumin, prirodni, TCI) i smole indijskog tamjanovca (Extreme Potency Boswellia Extract, Herbadiet) nabavljeni su od navedenih proizvođača. Za ekstrakte lista kineskog androfagisa nabavljeno je 2,5 g usitnjenog lista kineskog androfagisa (Organic Andrographis Paniculata Leaves Powder, Maple life sciences), a za plod crnog papra 2,5 g usitnjenog ploda crnog papra (crni papar, mljeveni, Šafram). Nabavljene supstance suspendirane su u 50 mL 81,5%-tnog (V/V) etanola u vodi, a zatim su sonicirane na 60 °C u trajanju od 30 min, nakon čega su supernatanti filtrirani te upareni do suha na rotavaporu R-200 (BÜCHI). HPLC metodom za istovremeno određivanje sadržaja aktivnih sastavnica (kurkuminoida, andrografolida, bosveličnih kiselina i piperina) određen je njihov sadržaj. Maseni udjeli aktivnih sastavnica u ekstraktima iznosili su 92,7 % kurkuminoida, 63,7 % bosveličnih kiselina, 17,3 % andrografolida i 37,3 % piperina.

3.3.1.3. Priprema i predobradba inkubata

Postupak pripreme inkubata za kromatografsko ispitivanje sastojao se od upotrebe Eppendorf epruvete od 1,5 mL u koju je dodano 200 μ L hemolizata, 201 μ L fosfatnog pufera pH 7,4 koncentracije 100 mM, 14 μ L otopine ekstrakta biljnih droga u dimetilsulfoksidu (DMSO) kao njihovom otapalu ili čistog DMSO-a te 20 μ L otopine S-(5'-adenozil)-L-metionina (SAM) u vodi (konačna koncentracija 20 μ M) koji je korišten kao kofaktor reakcije. Dobivena smjesa predinkubirana je tijekom 5 min na 37 °C, nakon čega je u nju dodano 40 μ L otopine 6-MP u 0,01 M NaOH (konačna koncentracija iznosila je 500 μ M). Smjesa je inkubirana kroz 90 min na 37 °C, nakon čega se reakcija u epruveti zaustavila dodavanjem 25 μ L hladne perklorne kiseline (ukupni volumen inkubata iznosio je 500 μ L). Nakon zaustavljanja reakcije, epruvete su centrifugirane kroz 10 min na 2000g te su supernatanti injektirani u HPLC sustav.

3.3.1.4. Kromatografska analiza

Kromatografske analize izvedene su na tekućinskom kromatografu 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) te na CORTECS Phenyl koloni dimenzija 4,6 \times 150 mm, veličine čestica 2,7 μ m (Waters Corporation). Postavljena je gradijentna elucija s dvije sastavnice mobilne faze, 0,1%-tnom (V/V) mravljom kiselinom u ultračistoj vodi (sastavnica A) i u metanolu (sastavnica B). Elucija se odvijala uz protok od 1,0 mL/min prema programu prikazanom u Tablici 1. Sama kolona termostatirana je na 35,0 °C. Parametri analize uključivali su i volumen injektiranja od 40,0 μ L te ispiranje igle vodom nakon svakog injektiranja. Detekcija 6-MMP, kao dobivenog produkta reakcije, provedena je na 291 nm bez referentne valne duljine. Trajanje analize iznosilo je 22 min.

Tablica 1. Program gradijentne elucije HPLC metode za određivanje 6-MMP u hemolizatu

| t (min) | ϕ A (%) | ϕ B (%) |
|---------|--------------|--------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 12 | 78 | 22 |
| 12,5 | 0 | 100 |
| 16 | 0 | 100 |
| 16,5 | 90 | 10 |
| 22 | 90 | 10 |

Validacija metode provedena je prema ICH smjernicama (International Conference on Harmonization, 2005.) na uzorku hemolizata koji je obogaćen standardnom otopinom 6-MMP te predobrađen prema postupku navedenom u odjeljku 3.3.1.2. Ispitani su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ).

3.3.1.5. Ispitivanje kinetike metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin S-metiltransferaze

Kinetika metilacije 6-MP ispitivana je na dva načina; u odnosu na 6-MP kao supstrat i u odnosu na SAM kao supstrat enzimske reakcije. U prvom slučaju, kinetika je ispitivana u rasponu koncentracija 6-MP od 0 do 2000 μ M uz konstantnu koncentraciju SAM od 50 μ M dok je u drugom slučaju kinetika metilacije ispitivana mijenjanjem koncentracije SAM od 0 do 50 μ M uz konstantnu koncentraciju 6-MP od 2000 μ M. Aktivnost TPMT izražena je kao nmol 6-MMP/h/g Hb. Određene su i maksimalna brzina enzima (V_{max}) kao i Michaelisova konstanta (K_m) dobivene nelinearnom regresijom.

3.3.1.6. Ispitivanje inhibicije tiopurin S-metiltransferaze ekstraktima biljnih droga

Inhibicija TPMT ispitivana je praćenjem pada koncentracije nastalog 6-MMP nakon inkubacije smjese s određenom koncentracijom ekstrakta ispitivane biljne droge. Ispitivanje je izvršeno po protokolu navedenom u odjeljku 3.3.1.2., a kao negativna kontrola (bez inhibicije) korištena je čista otopina DMSO-a. Za pozitivnu kontrolu korišten je furosemid kao poznati inhibitor tiopurin S-metiltransferaze. Sva ispitivanja provedena su u triplikatu.

3.3.1.7. Statistička analiza

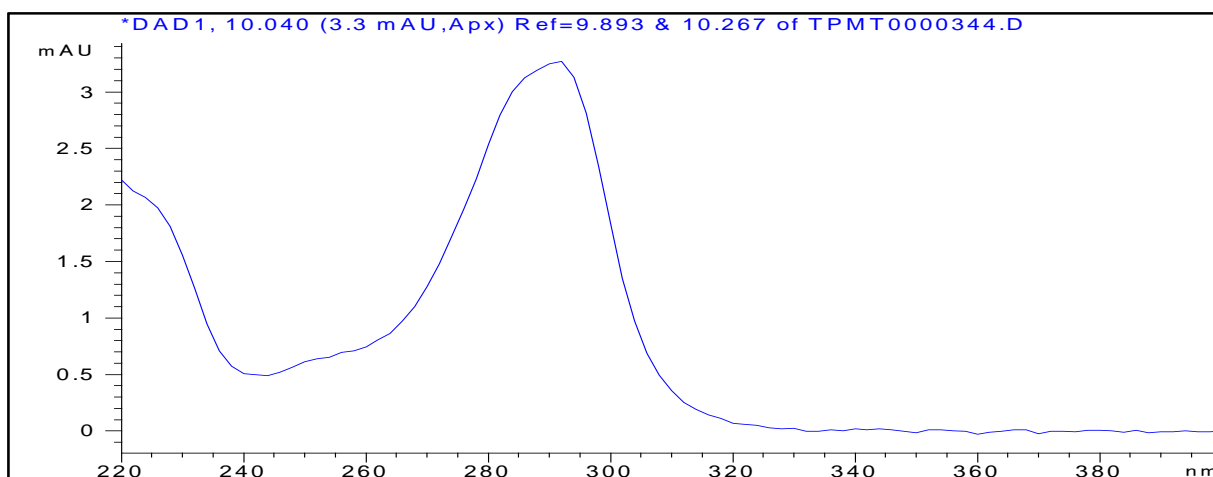
Svi podaci iz validacije i analize HPLC metode obrađeni su u programu Microsoft Office Excel v. 2112 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). Podaci ostalih aktivnosti TPMT-a nakon inhibicije obrađeni su u programskom paketu Prism 8.4.3. (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Pri statističkoj analizi podataka kao razina značajnosti uzeta je vrijednost od 5 % ($\alpha = 0,05$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Krajnji cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijal inhibicije enzima tiopurin S-metiltransferaze izabranim ekstraktima biljnih droga. Tom koraku prethodilo je nekoliko stepenica koje su, u konačnici, omogućile vjerodostojno interpretiranje dobivenih rezultata. Za početak, bilo je potrebno razviti selektivnu metodu za dokazivanje i određivanje 6-metilmerkaptopurina u biološkom uzorku te validirati parametre metode kako bi dobiveni rezultati bili valjani. Zatim, trebali su se odrediti parametri enzimske kinetike samog enzima te, na kraju, ispitati i već navedeni inhibicijski potencijali biljnih droga.

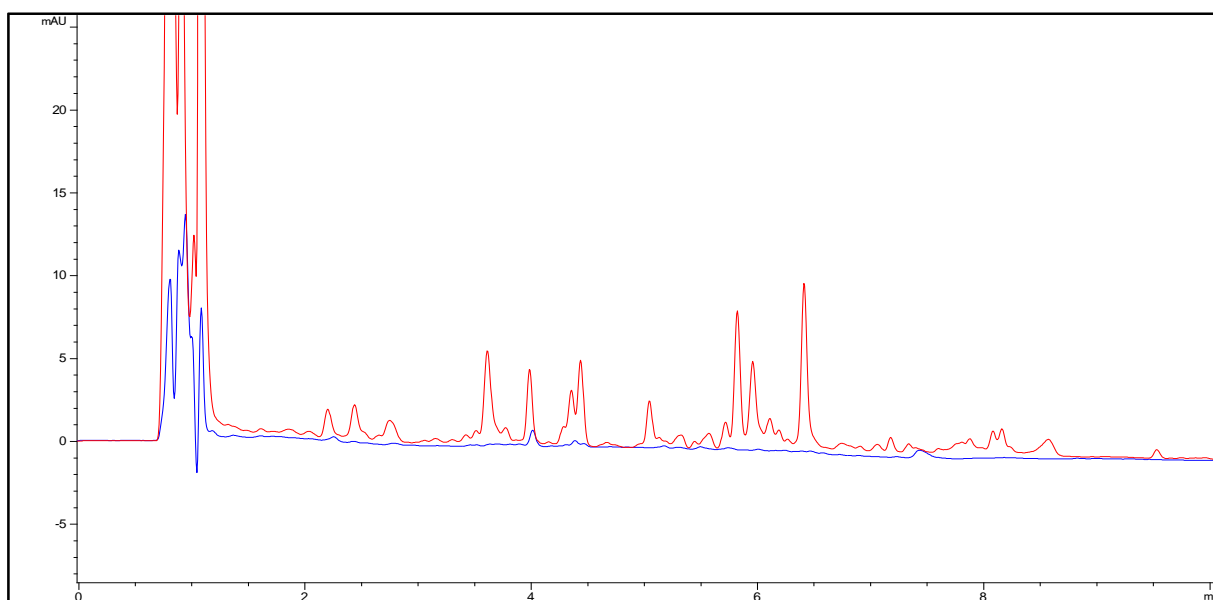
4.1. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje aktivnosti tiopurin S-metiltransferaze u hemolizatu

Analiza biološkog uzorka uvijek predstavlja izazov radi složenosti same smjese i brojnih sastavnica matrice te metabolita koji mogu interferirati s ispitivanim analitom. Kako se, u ovom istraživanju, pratio produkt reakcije metilacije 6-MP katalizirane enzimom TPMT bilo je potrebno razviti i validirati metodu koja će uspješno moći pratiti njegov nastanak. Za tu svrhu ispitane su kolone C18, cijano i fenilnih kemizama, a kao organske sastavnice mobilne faze ispitani su acetonitril i metanol. Kolona C18, kao i cijano kolona, nisu uspjele pružiti zadovoljavajuću selektivnost te su iz tog razloga eliminirane. Fenilna kolona (CORTECS Phenyl, $4,6 \times 150$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) u kombinaciji s metanolom pokazala je bolje karakteristike zbog dužeg zadržavanja 6-MMP što je omogućilo njegovu eluciju s kolone nakon hidrofilnijih sastavnica ispitivanih uzoraka i dovelo do povećanja selektivnosti. Dodatno povećanje selektivnosti postiglo se gradijentnom elucijom i optimiziranjem temperature kolone. Nastanak 6-MMP praćen je na njegovom apsorpcijskom maksimumu od 291 nm kako bi se postigla veća osjetljivost i niža granica određivanja same metode (Slika 13).



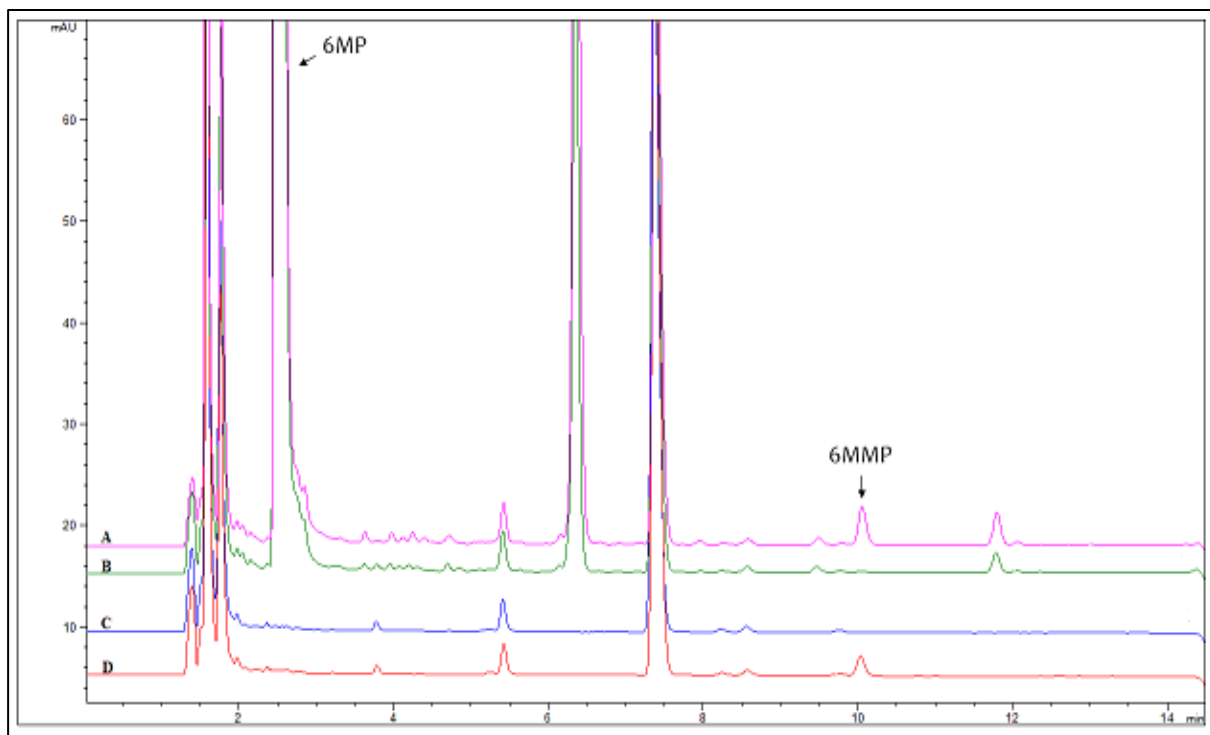
Slika 13. Spektar 6-MMP u otopini standarda

Za ispitivanje je u HPLC sustav injektirano 40 μL supernatanta nakon provedene inkubacije. Nadalje, ispitan je najučinkovitiji način zaustavljanja enzimske reakcije denaturiranjem enzima kako ne bi došlo do lažno povišenih vrijednosti nastalog 6-MMP. U tu svrhu reakcija se zaustavljala korištenjem povišene temperature (120 $^{\circ}\text{C}$ kroz 3 min), kao i uporabom perklorne kiseline (25 μL na 200 μL hemolizata). Uporaba perklorne kiseline pokazala se superiornom zbog manje količine nastalih pikova i interfencija prilikom elucije s kolone u odnosu na uzorke zaustavljane povišenom temperaturom (Slika 14).



Slika 14. Zaustavljanje enzimske reakcije uporabom povišene temperature (na slici označeno crvenom bojom) i uporabom perklorne kiseline (označeno plavom bojom)

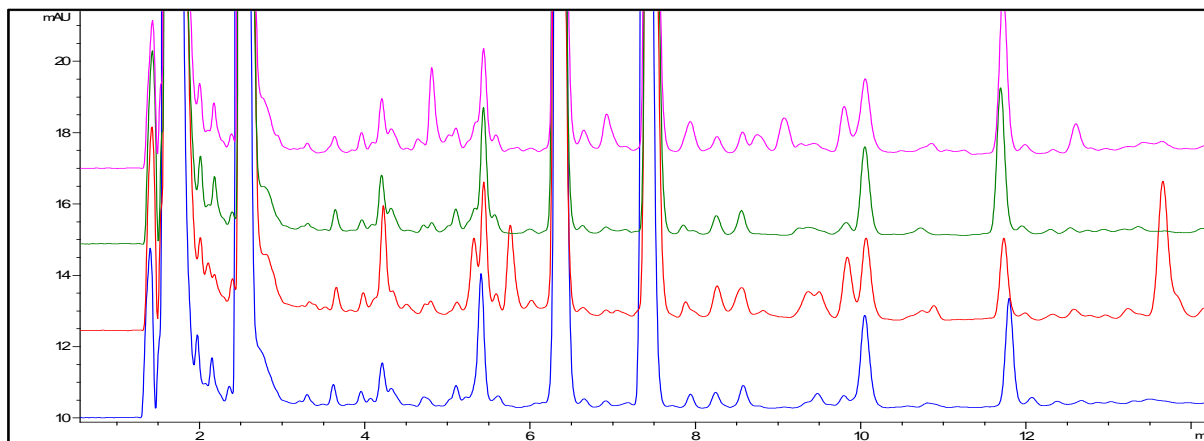
Na prikazanoj slici može se vidjeti kako je povišena temperatura uzrokovala nastanak puno većeg broja pikova u odnosu na korištenje perklorne kiseline te samim tim povećava mogućnost interferencija u daljnjim analizama koje bi mogle dovesti do krivo interpretiranih rezultata. Iz tog razloga za zaustavljanje enzimske reakcije, u daljnjim koracima, korištena je perklorna kiselina. Također, 6-MMP pokazao se stabilnim u kiselim uvjetima do 24 h što je dodatno išlo u korist odabiru perklorne kiseline. Nakon optimiranja parametara metode sljedeći korak uključivao je provjeru njene selektivnosti (Slika 15).



Slika 15. Kromatogrami: A) inkubata uz SAM, B) inkubata bez SAM, C) slijepog uzorka hemolizata, D) uzorka hemolizata obogaćenog otopinom 6-MMP

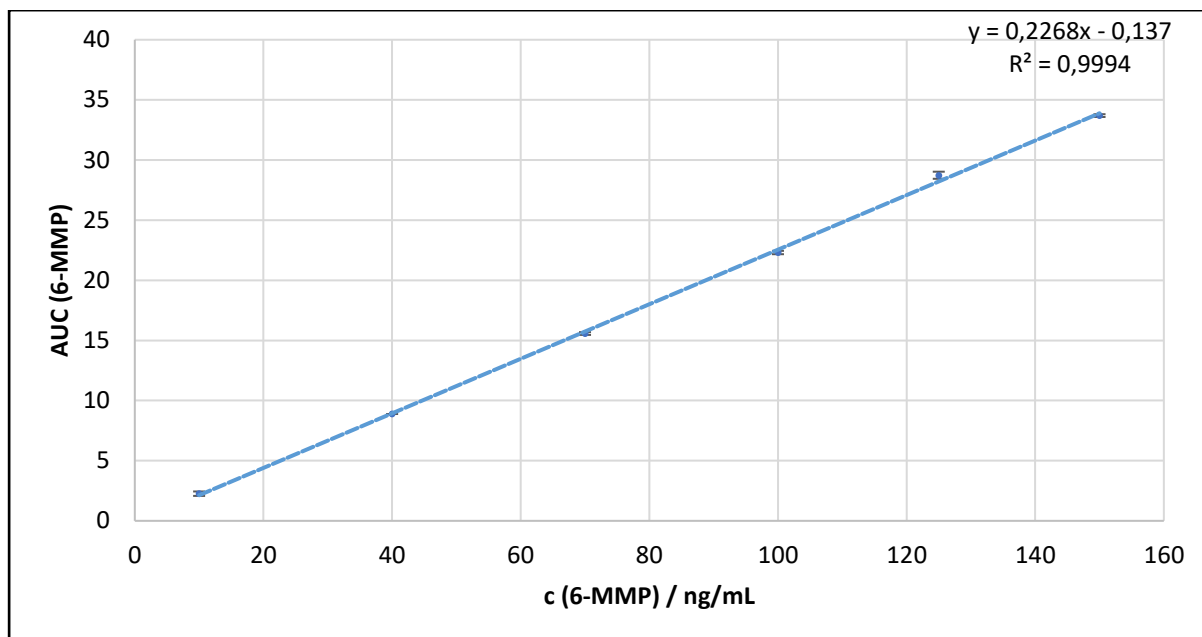
Kromatogram A) koji sadrži cijelu reakcijsku smjesu prikazuje nastanak 6-MMP koji izlazi na približno 10-oj minuti elucije. Reakcijske smjese B) i C) koje ne sadrže sve sastavnice reakcijske smjese pokazuju male pikove ili ih uopće ne pokazuju na vremenu izlaženja 6-MMP. Smatra se da je razlog tomu prisutnost DMSO kao otapala za ekstrakte biljnih droga za koja su neka istraživanja utvrdila da uzrokuje neenzimsku metilaciju 6-MP (Lennard i Singleton, 1994; Oselin i sur., 2006). Naš primjer pokazao je kako je količina tako nastalog produkta minimalna (3% u odnosu na inkubat koji sadrži SAM) što dovodi do zaključka kako prisutnost DMSO u reakcijskoj smjesi ne uzrokuje značajne interferencije te kako je DMSO prikladno otapalo.

Osim toga, selektivnost metode je ispitana i obogaćivanjem slijepog uzorka hemolizata otopinama 6-MMP i biljnih ekstrakata. Utvrđeno je da je metoda selektivna (Slika 16) s obzirom na činjenicu da je čistoća pika 6-MMP bila zadovoljavajuća.



Slika 16. Kromatogrami slijepih uzoraka inkubata obogaćenih standardnom otopinom 6-MMP i ekstraktima ploda crnog papra (ružičasto), lista kineskog androfagisa (zeleno), podanka kurkume (crveno) i smole indijskog tamjanovca (plavo). Konačna koncentracija piperina, andrografolida, kurkumina i bosveličnih kiselina iznosi 500 μ M.

Osim selektivnosti provedeni su i ostali kriteriji validacije analitičkog postupka koji su se izvodili na hemolizatu obogaćenim standardnom otopinom 6-MMP. Ispitivanje linearnosti (Slika 17) provedeno je na 6 različitih koncentracija (10-150 ng/mL) u duplikatu. Dobiveni koeficijent korelacije ($r = 0,9996$) i statistički neznačajan odsječak na y-osi ($p = 0,497$) ukazuju na zadovoljavajuću linearnost metode unutar radnog područja. Dobiven je i zadovoljavajući LOQ od 10 ng/mL.



Slika 17. Graf prikazuje dobivenu jednadžbu pravca prilikom ispitivanja linearnosti analitičke metode. Trake pogrešaka prikazuju standardno odstupanje ($n = 2$)

Linearnost je dodatno validirana usporedbom faktora odaziva (Tablica 2), čime je utvrđeno njihovo dobro poklapanje (omjer faktora odaziva od 99,55 do 101,98 %).

Tablica 2. Faktori odaziva i omjeri faktora odaziva

| c _{6-MMP} (ng/mL) | Faktor odaziva ¹ | Omjer faktora odaziva ² |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 10 | 0,226 | 101,23 |
| 40 | 0,222 | 99,55 |
| 70 | 0,223 | 99,73 |
| 100 | 0,223 | 100,00 |
| 125 | 0,228 | 101,98 |
| 150 | 0,225 | 100,69 |

¹omjer površine pika i koncentracije 6-MMP, ²omjer faktora odaziva na pojedinoj koncentraciji i faktora odaziva na 100 ng/mL

Ispitivanje točnosti metode provodilo se u triplikatu na 3 koncentracijske razine (40,3, 100,76, 151,14 ng/mL) 6-MMP te su dobiveni zadovoljavajući rezultati analitičkog prinosa (od 96,6 % do 98,7 %). Preciznost unutar jednog dana (ponovljivost) mjerena je u heksaplikatu na koncentraciji od 100,67 ng/mL te je dobivena vrijednost RSD od 1,3 % dok je ANOVA pokazala zadovoljavajuću srednju preciznost analiziranih heksaplikata unutar 3 dana mjerenja ($p = 0,071$). Svi dobiveni rezultati validacijskih parametara ukazuju da je odabrana metoda, kao i sam postupak predobradbe uzoraka, zadovoljavajuća te da se može koristiti za određivanje 6-

MMP (Tablica 3). Činjenica da se radi o analizi kompleksnog biološkog uzorka dobivenim rezultatima daje dodatnu težinu.

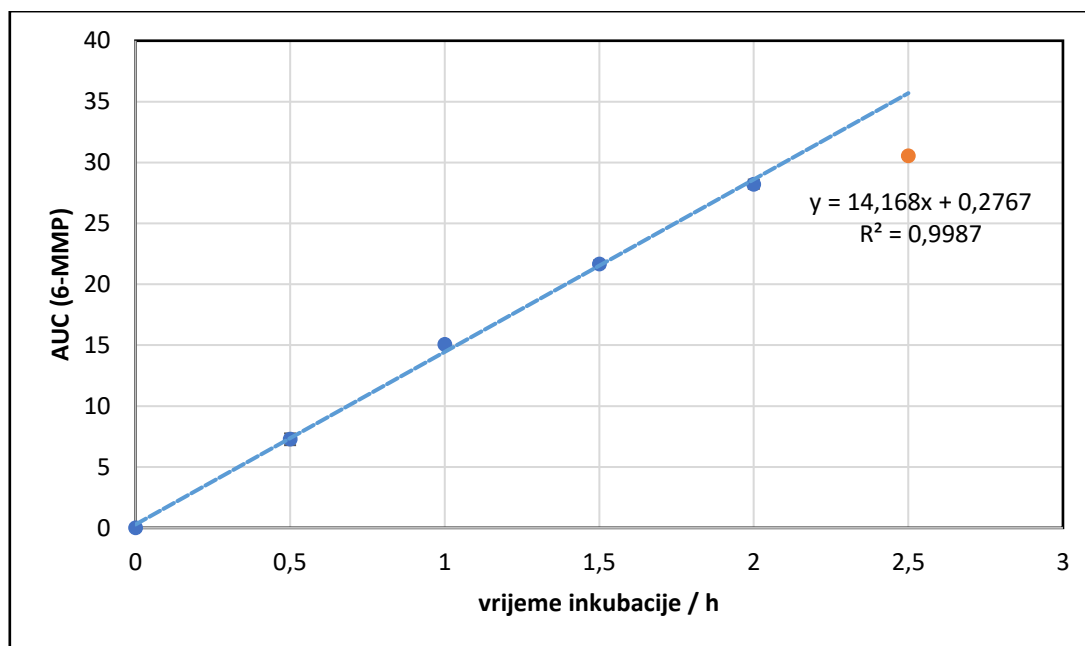
Tablica 3. Parametri validacije određivanja 6-MMP u hemolizatu

| parametar | | vrijednost |
|---|----------------------------|----------------------|
| radno područje | | 10-150 ng/mL |
| jednadžba pravca | | $y = 0,227x - 0,137$ |
| koeficijent korelacije | | 0,9996 |
| p-vrijednost odsječka na y-osi | | 0,497 |
| analitički prinos (srednja vrijednost \pm relativno standardno odstupanje $n = 3$) | niska razina (40 ng/mL) | $96,7 \pm 1,5$ |
| | srednja razina (100 ng/mL) | $96,6 \pm 0,8$ |
| | visoka razina (150 ng/mL) | $97,1 \pm 0,7$ |
| ponovljivost (RSD, $n = 6$) | | 1,3 % |
| srednja preciznost (p-vrijednost, ANOVA, $n = 18$) | | 0,071 |

4.2. Ispitivanje kinetike i optimizacija parametara enzimske metilacije 6-merkaptopurina putem tiopurin S-metiltransferaze

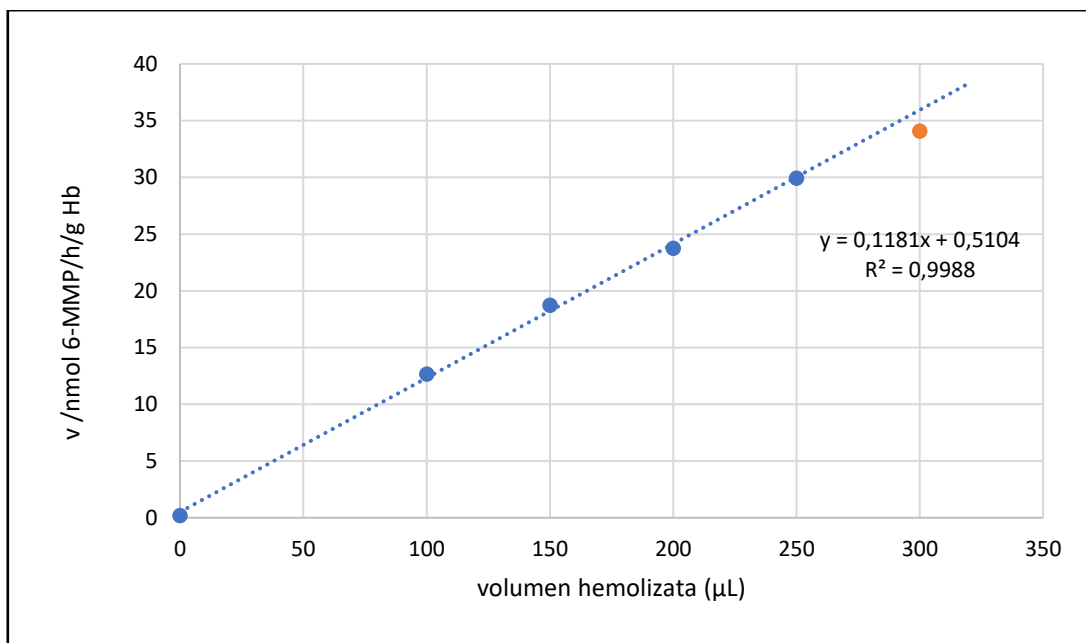
Nakon razvoja, optimizacije i validacije metode idući korak istraživanja uključivao je ispitivanje enzimske kinetike proučavanog enzima te optimizaciju ostalih parametara bitnih za završno ispitivanje inhibicije kao što su vrijeme trajanja inkubacije, količina alikvotiranog hemolizata i koncentracija DMSO u konačnoj smjesi. Ispitivanje enzimske kinetike TPMT, osim što je dalo uvid u to kakvom tipu metabolizatora pripada donor krvi, za svrhu je imalo odrediti optimalne koncentracije 6-MP i SAM u daljnjem dijelu istraživanja. Naime, prilikom ispitivanja utjecaja kompetitivne inhibicije na neki enzim nužno je odabrati koncentraciju supstrata i kofaktora u blizini njihove Michaelisove konstante (K_m , podatak koji govori o koncentraciji na kojoj se postiže polovica maksimalne brzine kemijske reakcije). Ukoliko se odaberu koncentracije izvan tog raspona može se dogoditi da se utjecaj kompetitivnih inhibitora previdi. Iz tog razloga, ovaj dio istraživanja za cilj je imao odrediti enzimsku kinetiku TPMT u ovisnosti o koncentraciji dodanog 6-MP i SAM. Brzinu enzimske reakcije potrebno je pratiti na njenom samom početku dok postoji linearan odnos između vremena proteklog od početka reakcije i količine nastalog produkta, stoga je provedeno ispitivanje ovisnosti metilacije o vremenu reakcije koje je pokazalo kako postoji linearan odnos između vremena od početka

enzimske reakcije i količine nastalog 6-MMP u periodu do 2 h ($r = 0,999$), nakon čega brzina reakcije počinje opadati (Slika 18). Zaključno, daljnja su istraživanja rađena u trajanju inkubacije do 2 h kako bi se postigli uvjeti početne brzine kemijske reakcije.



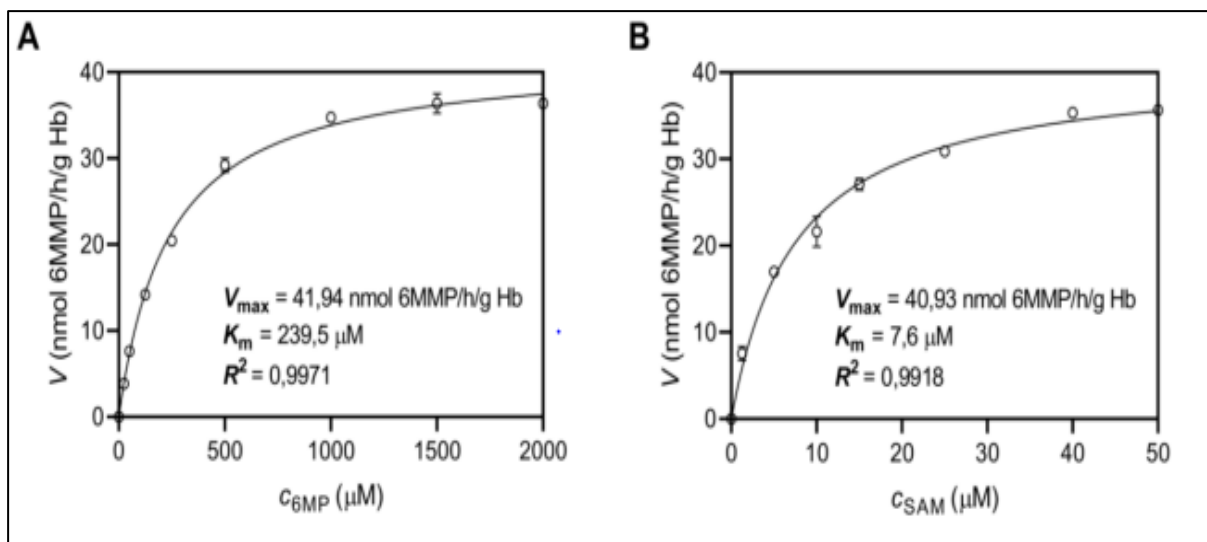
Slika 18. Graf ovisnosti koncentracije 6-MMP o vremenu proteklom od početka enzimske reakcije; crvena točka označava odstupanje od linearnosti.

Ispitano je i ponašanje brzine enzimske reakcije u ovisnosti o volumenu alikvotiranog hemolizata koji se uzima za inkubaciju. Rezultati su pokazali da se brzina reakcije linearno povećava s povećanjem volumena dodanog hemolizata sve do alikvotiranih 250 μL ($r = 0,999$), a njegovim daljnjim povećanjem dolazi do odstupanja u linearnosti (Slika 19). Na temelju dobivenih rezultata u idućim ispitivanjima korišten je volumen hemolizata od 200 μL .



Slika 19. Graf ovisnosti brzine nastanka 6-metilmerkaptopurina o volumenu dodanog hemolizata; crvena točka označava odstupanje od linearnosti.

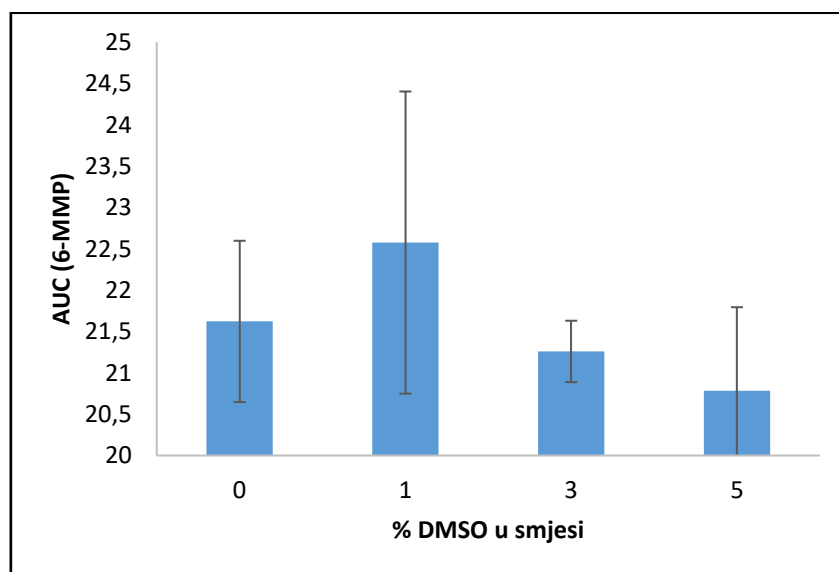
Kinetika enzimske metilacije ispitivana je mijenjanjem koncentracije 6-MP pri konstantnoj koncentraciji SAM i obrnuto. Dobiveni rezultati najviše su odgovarali Michaelis-Menteničinom modelu enzimske kinetike ($r \geq 0,996$) te su na tom modelu i konstruirani grafovi ovisnosti brzine nastanka 6-MMP o koncentraciji supstrata, odnosno kofaktora (Slika 20).



Slika 20. A) Graf ovisnosti brzine reakcije nastanka produkta o koncentraciji dodanog 6-MP
 B) Graf ovisnosti brzine reakcije nastanka produkta o koncentraciji dodanog SAM. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

Dobivene su vrijednosti K_m za 6-MP, kao i za SAM, te iznose 239,5 μM za prvu, odnosno 7,6 μM za drugu komponentu. Ti podatci, kao što je navedeno ranije, poslužili su kao orijentir za odabir adekvatne koncentracije potrebne da bi se uočila potencijalna kompetitivna inhibicija ekstrakata biljnih droga na TPMT. Na temelju svega navedenog, u daljnjem dijelu istraživanja koristile su se koncentracije supstrata/kofaktora u vrijednosti do 3 K_m , odnosno 500 μM za 6-MP i 20 μM za SAM. Nadalje, dobivene vrijednosti maksimalne brzine TPMT od približno 41 nmol 6-MMP/h/g Hb, i pri mijenjanju koncentracije 6-MP kao i SAM, sugeriraju da se radi o ekstenzivnom metabolizatoru, tj. o osobi s homozigotnim divljim tipom alela koji rezultira visokom enzimskom aktivnošću (Asadov i sur., 2017). Ovaj oblik metabolizatora je najčešći u populaciji te se rezultati dobiveni u nastavku istraživanja mogu preslikati na najveći broj ljudi koji boluju od upalnih bolesti crijeva.

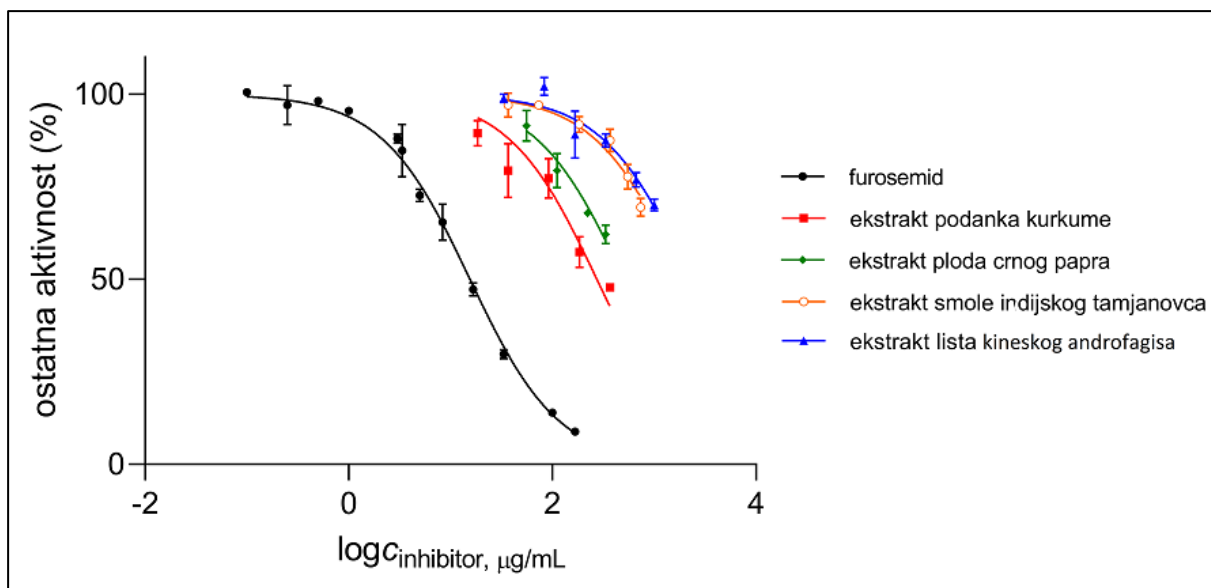
Neka istraživanja pokazala su kako DMSO može denaturirati neke enzime i tako utjecati na dobivene rezultate (Misuri i sur., 2017). Iz tog razloga ispitan je utjecaj različitih volumena dodanog DMSO (od 0 do 5 % (V/V)) kako bi se provjerilo dolazi li do promjena u količini nastalog produkta. Ispitivanje je pokazalo kako ne dolazi do bitne promjene količine nastalog 6-MMP prilikom primjene različitih volumena DMSO te je za nastavak istraživanja odabrana koncentracija DMSO od 3 % (V/V) u reakcijskoj smjesi (Slika 21).



Slika 21. Graf ovisnosti površine pika 6-MMP o koncentraciji DMSO; trake pogreške predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

4.3. Ispitivanje utjecaja ekstrakata odabranih biljnih droga na aktivnost tiopurin S-metiltransferaze

Nakon razvoja metode i optimiranja svih dodatnih parametara zadnji korak ispitivanja uključivao je ispitivanje samog potencijala inhibicije odabranih biljnih droga na aktivnost tiopurin S-metiltransferaze. U ispitivanju su korišteni komercijalno dostupni suhi ekstrakti podanka kurkume i smole indijskog tamjanovca, dok su ekstrakti lista kineskog androfagisa i ploda crnog papra samostalno pripremljeni iz nemogućnosti komercijalne nabave istih. Njihov inhibicijski potencijal uspoređen je s furosemidom koji je poznati inhibitor ovog enzima (Lysaa i sur., 1996). Dobiveni rezultati prikazani su preko IC_{50} vrijednosti koja daje informaciju o koncentraciji inhibitora potrebnog za smanjenje početne enzimske aktivnosti za 50 %. Smanjenje enzimske aktivnosti uzrokovano upotrijebljenim biljnim ekstraktima/furosemidom uspoređeno je u odnosu na slijepu probu sa čistim DMSO-om, a rezultati su prikazani na Slici 22.



Slika 22. Ostatna aktivnost TPMT u ovisnosti o logaritmu koncentracije inhibitora. Trake pogrešaka predstavljaju standardno odstupanje ($n = 3$)

Najveći inhibicijski potencijal u provedenom istraživanju pokazali su ekstrakt podanka kurkume ($IC_{50} = 275 \mu\text{g/mL}$) i ekstrakt ploda crnog papra ($IC_{50} = 490 \mu\text{g/mL}$). Ekstraktima lista kinsekog androfagisa ($IC_{50} = 2300 \mu\text{g/mL}$) i smole indijskog tamjanovca ($IC_{50} = 1900 \mu\text{g/mL}$) bila je potrebna veća koncentracija kako bi doveli do jednake inhibicije enzima. Inhibicijski učinak ekstrakta podanka kurkume može se pripisati kurkuminu kao njegovoj glavnoj sastavnici, kao i piperinu u sastavu ekstrakta crnog papra za kojeg je poznato da pokazuje inhibitorne učinke prema raznim enzimima i tako povećava sistemska bioraspodjeljivost drugih sastavnica. No, niti jedan od ovih biljnih ekstrakata nije inhibirao TPMT učinkovito kao furosemid ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$) koji je pokazao za red veličine veću inhibicijsku potentnost u odnosu na njih. Iz svega navedenog, kao i zbog činjenice kako ispitivani biljni ekstrakti nemaju veliku sistemska bioraspodjeljivost nakon oralne primjene, moguće je zaključiti kako u koncentracijama u kojima se ovi ekstrakti nalaze na tržištu i u kojima pokazuju određene farmakološke učinke neće doći do inhibicije TPMT koja bi dovela do njihovih interakcija s drugim lijekovima koji se metaboliziraju preko ovog enzima.

5. ZAKLJUČCI

Razvijena je, optimirana i validirana HPLC metoda za određivanje 6-MMP u hemolizatu, tj. za praćenje aktivnosti TPMT te su optimirani i sami parametri inkubacije, a zatim je ispitan i potencijal inhibicije biljnih ekstrakata prema TPMT. Nakon provedenog istraživanja dobiveni podatci pokazali su kako pripravci odabranih biljnih vrsta posjeduju određeni inhibicijski potencijal prema tiopurin S-metiltransferazi, ali da je taj potencijal minimalno deseterostruko slabiji od furosemida koji je poznati inhibitor ovog enzima. Dobiveni podatci, u kombinaciji s činjenicom da odabrani ekstrakti posjeduju ograničenu bioraspoloživost nakon oralne primjene, dovode do zaključka da se koncentracije koje su u ovom istraživanju dobivene kao inhibicijske ne mogu ostvariti pri koncentracijama u kojima se odabrani pripravci nalaze na tržištu i pokazuju svoje farmakološke učinke. Sve navedeno ukazuje da istodobna primjena ovih pripravaka i liječenja AZA i 6-MP ne dovodi do značajnijih farmakokinetičkih interakcija zbog kojih bi istodobna primjena ovih tvari bila kontraindicirana te da, barem prema ispitivanim parametrima, ne postoji ograničenje u njihovom zajedničkom korištenju. Za dodatnu potvrdu ovih zaključaka potrebno je provesti *in vivo* ispitivanja koja prelaze okvire ovog diplomskog rada.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-ASA – 5-aminosalicilati

6-MMP – 6-metil merkaptopurin

6-MP – 6-merkaptopurin

6-TGN – 6-tiogvanin

AZA – azatioprin

DMSO – dimetilsulfoksid

DTT – ditioneitol

E – enzim

ES – kompleks enzim-supstrat

Hb – hemoglobin

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

ICH – engl. *International Council for Harmonisation*

K_m – Michaelisova konstanta

LOD – granica detekcije (engl. *Limit of Detection*)

LOQ – granica određivanja(engl. *Limit of Quantitation*)

P – produkt

RSD – relativno standardno odstupanje

S – supstrat

SAM – S-adenozil-metionin

TPMT – tiopurin S-metiltransferaza

V_{max} – maksimalna brzina enzima

XO – ksantin oksidaza

7. LITERATURA

- Asadov, C., Aliyeva, G., & Mustafayeva, K. (2017). *Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods*. 23–30.
- Bessa, E., Medard, Y., Mircheva, Y., & Vilmer, E. (1994). *Thiopurine methyltransferase activity in a French population: HPLC assay conditions and effects of drugs and inhibitors*. 1–8.
- Clarke, K. G. (2013). Enzymes as biocatalysts. *Bioprocess Engineering*, 75–96.
- Da Silva, B. C., Lyra, A. C., Rocha, R., & Santana, G. O. (2014). Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9458–9467.
- Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of andrographis paniculata and its major compound andrographolide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(0), S17–S29.
- Derosa, G., Maffioli, P., & Sahebkar, A. (2016). Piperine and its role in chronic diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 928, 173–184.
- Dubinsky, M. C. (2004). Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: Pharmacology, efficacy, and safety. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(9), 731–743.
- Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2017). Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(7), 1088–1103.
- Gerhardt, H., Seifert, F., Buvvari, P., Vogelsang, H., & Repges, R. (2001). Therapie des aktiven morbus Crohn mit dem Boswellia-serrata-extrakt H 15. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 39(1), 11–17.
- Hanai, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Maruyama, Y., Andoh, A., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Sata, M., Yamada, M., Iwaoka, Y., Kanke, K., Hiraishi, H., Hirayama, K., Arai, H., Yoshii, S., Uchijima, M., Nagata, T., & Koide, Y. (2006). Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Randomized, Multicenter, Double-

- Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(12), 1502–1506.
- Harboe, M. (1959). A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 13(4), 1806–1812.
- Holleran, G., Scaldaferrì, F., Gasbarrini, A., & Currò, D. (2020). Herbal medicinal products for inflammatory bowel disease: A focus on those assessed in double-blind randomised controlled trials. *Phytotherapy Research*, 34(1), 77–93.
- Holtmeier, W., Zeuzem, S., Prei, J., Kruis, W., Böhm, S., Maaser, C., Raedler, A., Schmidt, C., Schnitker, J., Schwarz, J., Zeitz, M., & Caspary, W. (2011). Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of *Boswellia serrata* in maintaining remission of Crohn's disease: Good safety profile but lack of efficacy. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(2), 573–582.
- International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Q2 (R1). Geneva: ICH Secretariat; 2005.
- Kedia, S., Bhatia, V., Thareja, S., Garg, S., Mouli, V. P., Bopanna, S., Tiwari, V., Makharia, G., & Ahuja, V. (2017). Low dose oral curcumin is not effective in induction of remission in mild to moderate ulcerative colitis: Results from a randomized double blind placebo controlled trial. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(2), 147.
- Kucharzik, T., Koletzko, S., Kannengießer, K., & Dignaß, A. (2020). Colitis ulcerosa - Diagnostische und therapeutische Algorithmen. *Deutsches Arzteblatt International*, 117(33–34), 564–573.
- Lamb, C. A., Kennedy, N. A., Raine, T., Hendy, P. A., Smith, P. J., Limdi, J. K., Hayee, B., Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., Selinger, C., Barrett, K. J., Davies, R. J., Bennett, C., Gittens, S., Dunlop, M. G., Faiz, O., Fraser, A., Garrick, V., Johnston, P. D., ... Hawthorne, A. B. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 68, s1–s106.
- Lang, A., Salomon, N., Wu, J. C. Y., Kopylov, U., Lahat, A., Har-Noy, O., Ching, J. Y. L., Cheong, P. K., Avidan, B., Gamus, D., Kaimakliotis, I., Eliakim, R., Ng, S. C., & Ben-Horin, S. (2015). Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in

- Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(8), 1444-1449.e1.
- Lennard, L., & Singleton, H. J. (1994). High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 661(1), 25–33.
- Lysaa, R. A., Giverhaug, T., Libæk Wold, H., & Aarbakke, J. (1996). Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 49(5), 393–396.
- Misuri, L., Cappiello, M., Balestri, F., Moschini, R., Barracco, V., Mura, U., & Del-Corso, A. (2017). The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1152–1158.
- Oselin, K., & Anier, K. (2007). Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: A mechanism for possible drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(9), 1452–1454.
- Oselin, K., Anier, K., Tamm, R., Kallassalu, K., & Uno, M. (2006). Determination of thiopurine S -methyltransferase (TPMT) activity by comparing various normalization factors : Reference values for Estonian population using HPLC-UV assay. 834, 77–83.
- Pagano, E., Romano, B., Izzo, A. A., & Borrelli, F. (2018). The clinical efficacy of curcumin-containing nutraceuticals: An overview of systematic reviews. *Pharmacological Research*, 134, 79–91.
- Roskoski, R. (2015). Michaelis-Menten Kinetics☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences* (Issue August 2014). Elsevier Inc.
- Sandborn, W. J., Targan, S. R., Byers, V. S., Rutty, D. A., Mu, H., Zhang, X., & Tang, T. (2013). Andrographis paniculata extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*, 108(1), 90–98.
- Sarkate, A., & Dhaneshwar, S. S. (2017). Investigation of mitigating effect of colon-specific prodrugs of boswellic acid on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acidinduced colitis in Wistar rats: Design, kinetics and biological evaluation. *World Journal of Gastroenterology*, 23(7), 1147–1162.

- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. S. R. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, 64(4), 353–356.
- Siddiqui, M. Z. (2011). Boswellia serrata, a potential antiinflammatory agent: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(3), 255–261.
- Singla, V., Pratap Mouli, V., Garg, S. K., Rai, T., Choudhury, B. N., Verma, P., Deb, R., Tiwari, V., Rohatgi, S., Dhingra, R., Kedia, S., Sharma, P. K., Makharia, G., & Ahuja, V. (2014). Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis - A randomized, placebo-controlled, pilot study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(3), 208–214.
- Tang, T., Targan, S. R., Li, Z. S., Xu, C., Byers, V. S., & Sandborn, W. J. (2011). Randomised clinical trial: Herbal extract HMPL-004 in active ulcerative colitis - A double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(2), 194–202.
- Torres, J., Bonovas, S., Doherty, G., Kucharzik, T., Gisbert, J. P., Raine, T., Adamina, M., Armuzzi, A., Bachmann, O., Bager, P., Biancone, L., Bokemeyer, B., Bossuyt, P., Burisch, J., Collins, P., El-Hussuna, A., Ellul, P., Frei-Lanter, C., Furfaro, F., ... Fiorino, G. (2020). ECCO guidelines on therapeutics in Crohn's disease: Medical treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*, 14(1), 4–22.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741–1755.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 389(10080), 1756–1770.
- Veauthier, B., & Hornecker, J. R. (2018). Crohn's disease: Diagnosis and management. *American Family Physician*, 98(11), 661–669.
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 91–99.
- Zhu, Q., Zheng, P., Chen, X., Zhou, F., He, Q., & Yang, Y. (2018). Andrographolide presents therapeutic effect on ulcerative colitis through the inhibition of IL-23/IL-17 axis. *American Journal of Translational Research*, 10(2), 465–473.

8. SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva bolesti su koje predstavljaju globalni zdravstveni problem, a u zadnjih nekoliko desetljeća bilježi se porast njihove incidencije. Kao dva najznačajnija predstavnika ističu se Crohnova bolest i ulcerozni kolitis koje karakterizira kronična recidivirajuća upala. Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT, E.C. 2.1.1.67) citosolni je enzim koji metabolizira reakcije S-metilacije aromatskih i heterocikličnih sulfhidrilnih skupina kao što su tiopurinski i tiopirimidinski lijekovi. Među ksenobiotike koje TPMT metabolizira spadaju i azatioprin i 6-merkaptopurin koji se u reakciji posredovanom ovim enzimom inaktiviraju. Pored konvencionalne farmakoterapije, sve više pacijenata rješenje svojih zdravstvenih problema pokušava pronaći u komplementarnoj i alternativnoj medicini. Neki od biljnih pripravaka za koje postoje znanstvene informacije o protuupalnom i imunomodulatornom učinku koji bi pozitivno utjecao na ishode liječenja ovog tipa bolesti uključuju kurkumu (*Curcuma longa*), crni papar (*Piper nigrum*), indijski tamjanovac (*Boswellia serrata*) i kineski androfagis (*Andrographis paniculata*). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dovode li navedeni biljni pripravci do inhibicije tiopurin S-metiltransferaze, enzima koji je ključan u metabolizmu azatioprina i merkaptopurina, ili istodobna primjena biljnih pripravaka i navedenih lijekova ne uzrokuje takvu vrstu interakcije.

Istraživanje je uključivalo razvoj i validaciju analitičke metode koja bi učinkovito pratila enzimsku reakciju metilacije 6-MP i nastanak 6-MMP, ispitivanje enzimске kinetike TPMT i, u konačnici, ispitivanje njegove potencijalne inhibicije ekstraktima odabranih biljnih droga. Razvijena je HPLC metoda u trajanju od 22 min. Kao nepokretna faza korištena je Cortecs Phenyl kolona (150 × 4,6 mm, veličina čestica 2,7 um). Provedena je gradijentna elucija s dvije sastavnice mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline u vodi, odnosno metanolu). Metoda je zadovoljila sve ispitane parametre validacije. Ispitivanje enzimске kinetike dovelo je do zaključka da TPMT dobrovoljca pokazuje visoku enzimsku aktivnost te da se dobiveni rezultati mogu translirati na najveći udio populacije. Na kraju, određeni su i inhibicijski potencijali ekstrakata biljnih droga te su dobivene vrijednosti za ekstrakt podanka kurkume ($IC_{50} = 275 \mu\text{g/mL}$), ekstrakt ploda crnog papra ($IC_{50} = 490 \mu\text{g/mL}$), ekstrakt lista kinsekog androfagisa ($IC_{50} = 2300 \mu\text{g/mL}$) i smole indijskog tamjanovca ($IC_{50} = 1900 \mu\text{g/mL}$). No, niti jedan od ovih biljnih ekstrakata nije inhibirao TPMT učinkovito kao furosemid ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$) koji je poznati inhibitor ovog enzima.

Dobiveni podaci doveli do zaključka da se koncentracije koje su u ovom istraživanju dobivene kao inhibicijske ne mogu ostvariti pri koncentracijama u kojima se odabrani pripravci nalaze na tržištu i pokazuju svoje farmakološke učinke. Sve navedeno ukazuje da istodobna primjena ovih pripravaka i liječenja azatioprinom i 6-merkaptopurinom ne dovodi do značajnijih farmakokinetičkih interakcija zbog kojih bi istodobna primjena ovih tvari bila kontraindicirana te da, barem prema ispitivanim parametrima, ne postoji ograničenje u njihovom zajedničkom korištenju.

SUMMARY

Inflammatory bowel disease is a disease that represents a global health problem, and an increase in its incidence has been recorded in the last few decades. The two most significant representatives are Crohn's disease and ulcerative colitis, which are characterized by relapsing chronic inflammation. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT, E.C. 2.1.1.67) is a cytosolic enzyme that metabolizes S-methylation reactions of aromatic and heterocyclic sulfhydryl groups such as thiopurine and thiopyrimidine drugs. The xenobiotics metabolized by TPMT include azathioprine and 6-mercaptopurine, which are inactivated in a reaction mediated by this enzyme. In addition to conventional pharmacotherapy, more and more patients are trying to find a solution to their health problems in complementary and alternative medicine. Some of the herbal preparations for which there is scientific information on the anti-inflammatory and immunomodulatory effect that would positively influence the treatment outcomes of this type of disease include turmeric (*Curcuma longa*), black pepper (*Piper nigrum*), Indian frankincense (*Boswellia serrata*) and Chinese Andrographis (*Andrographis paniculata*). The aim of this research was to determine whether the mentioned herbal preparations lead to the inhibition of thiopurine S-methyltransferase, an enzyme that is key in the azathioprine and mercaptopurine metabolism, or whether the simultaneous use of herbal preparations and the mentioned drugs does not cause this type of interaction.

The research included the development and validation of an analytical method that would effectively monitor the enzymatic reaction of methylation of 6MP and the formation of 6MMP, the investigation of the enzymatic kinetics of TPMT and, finally, the investigation of its potential inhibition by extracts of selected herbal drugs. An HPLC method lasting 22 min was developed. A Cortecs Phenyl column (150 × 4.6 mm, particle size 2.7 μm) was used as the stationary phase. A gradient elution with two components of the mobile phase (0.1% formic acid in water or methanol) was performed. The method met all the tested validation parameters. Examination of enzyme kinetics led to the conclusion that the volunteer's TPMT shows high enzyme activity and that the obtained results can be translated to the largest part of the population. Finally, the inhibitory potentials of herbal drug extracts were determined, and values were obtained for turmeric root extract (IC₅₀ = 275 μg/mL), black pepper fruit extract (IC₅₀ = 490 μg/mL), Chinese Andrographis leaf extract (IC₅₀ = 2300 μg /mL) and Indian

frankincense resin ($IC_{50} = 1900 \mu\text{g/mL}$). However, none of these plant extracts inhibited TMPT as efficiently as furosemide ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$), which is a known inhibitor of this enzyme.

The obtained data led to the conclusion that the concentrations obtained in this research as inhibitory cannot be achieved at the concentrations in which the selected preparations are on the market and show their pharmacological effects. All of the above indicates that the simultaneous use of these preparations and treatment with azathioprine and 6-mercaptopurine does not lead to significant pharmacokinetic interactions due to which the simultaneous use of these substances would be contraindicated and that, at least according to the tested parameters, there is no limitation in their joint use.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje mogućnosti inhibicije tiopurin S-metiltransferaze pripravcima odabranih biljnih vrsta

Marko Mataija

SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva bolesti su koje predstavljaju globalni zdravstveni problem, a u zadnjih nekoliko desetljeća bilježi se porast njihove incidencije. Kao dva najznačajnija predstavnika ističu se Crohnova bolest i ulcerozni kolitis koje karakterizira kronična recidivirajuća upala. Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT, E.C. 2.1.1.67) citosolni je enzim koji metabolizira reakcije S-metilacije aromatskih i heterocikličnih sulfhidrilnih skupina kao što su tiopurinski i tiopirimidinski lijekovi. Među ksenobiotike koje TPMT metabolizira spadaju i azatioprin i 6-merkaptopurin koji se u reakciji posredovanom ovim enzimom inaktiviraju. Pored konvencionalne farmakoterapije, sve više pacijenata rješenje svojih zdravstvenih problema pokušava pronaći u komplementarnoj i alternativnoj medicini. Neki od biljnih pripravaka za koje postoje znanstvene informacije o protuupalnom i imunomodulatornom učinku koji bi pozitivno utjecao na ishode liječenja ovog tipa bolesti uključuju kurkumu (*Curcuma longa*), crni papar (*Piper nigrum*), indijski tamjanovac (*Boswellia serrata*) i kineski androfagis (*Andrographis paniculata*). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dovode li navedeni biljni pripravci do inhibicije tiopurin S-metiltransferaze, enzima koji je ključan u metabolizmu azatioprina i merkaptopurina, ili istodobna primjena biljnih pripravaka i navedenih lijekova ne uzrokuje takvu vrstu interakcije.

Istraživanje je uključivalo razvoj i validaciju analitičke metode koja bi učinkovito pratila enzimsku reakciju metilacije 6-MP i nastanak 6-MMP, ispitivanje enzimске kinetike TPMT i, u konačnici, ispitivanje njegove potencijalne inhibicije ekstraktima odabranih biljnih droga. Razvijena je HPLC metoda u trajanju od 22 min. Kao nepokretna faza korištena je Cortec Pheny kolona ($150 \times 4,6$ mm, veličina čestica 2,7 μ m). Provedena je gradijentna elucija s dvije sastavnice mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline u vodi, odnosno metanolu). Metoda je zadovoljila sve ispitane parametre validacije. Ispitivanje enzimске kinetike dovelo je do zaključka da TPMT dobrovoljca pokazuje visoku enzimsku aktivnost te da se dobiveni rezultati mogu translirati na najveći udio populacije. Na kraju, određeni su i inhibicijski potencijali ekstrakata biljnih droga te su dobivene vrijednosti za ekstrakt podanka kurkume ($IC_{50} = 275 \mu\text{g/mL}$), ekstrakt ploda crnog papra ($IC_{50} = 490 \mu\text{g/mL}$), ekstrakt lista kinsekog androfagisa ($IC_{50} = 2300 \mu\text{g/mL}$) i smole indijskog tamjanovca ($IC_{50} = 1900 \mu\text{g/mL}$). No, niti jedan od ovih biljnih ekstrakata nije inhibirao TPMT učinkovito kao furosemid ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$) koji je poznati inhibitor ovog enzima.

Dobiveni podaci doveli do zaključka da se koncentracije koje su u ovom istraživanju dobivene kao inhibicijske ne mogu ostvariti pri koncentracijama u kojima se odabrani pripravci nalaze na tržištu i pokazuju svoje farmakološke učinke. Sve navedeno ukazuje da istodobna primjena ovih pripravaka i liječenja azatioprinom i 6-merkaptopurinom ne dovodi do značajnijih farmakokinetičkih interakcija zbog kojih bi istodobna primjena ovih tvari bila kontraindicirana te da, barem prema ispitivanim parametrima, ne postoji ograničenje u njihovom zajedničkom korištenju.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 22 grafičkih prikaza, 3 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Upalne bolesti crijeva, tiopurin S-metiltransferaza, 6-merkaptopurin, kurkuma, crni papar, indijski tamjanovac, kineski androfagis

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivana Perković, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of analytics and drug control
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Examination of the Possibility of Thiopurine S-Methyltransferase Inhibition by Preparations of Selected Plant Species

Marko Mataija

SUMMARY

Inflammatory bowel disease is disease that represents a global health problem, and an increase in their incidence has been recorded in the last few decades. The two most significant representatives are Crohn's disease and ulcerative colitis, which are characterized by relapsing chronic inflammation. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT, E.C. 2.1.1.67) is a cytosolic enzyme that metabolizes S-methylation reactions of aromatic and heterocyclic sulfhydryl groups such as thiopurine and thiopyrimidine drugs. The xenobiotics metabolized by TPMT include azathioprine and 6-mercaptopurine, which are inactivated in a reaction mediated by this enzyme. In addition to conventional pharmacotherapy, more and more patients are trying to find a solution to their health problems in complementary and alternative medicine. Some of the herbal preparations for which there is scientific information on the anti-inflammatory and immunomodulatory effect that would positively influence the treatment outcomes of this type of disease include turmeric (*Curcuma longa*), black pepper (*Piper nigrum*), Indian frankincense (*Boswellia serrata*) and Chinese *Andrographis* (*Andrographis paniculata*). The aim of this research was to determine whether the mentioned herbal preparations lead to the inhibition of thiopurine S-methyltransferase, an enzyme that is key in the azathioprine and mercaptopurine metabolism, or whether the simultaneous use of herbal preparations and the mentioned drugs does not cause this type of interaction.

The research included the development and validation of an analytical method that would effectively monitor the enzymatic reaction of methylation of 6MP and the formation of 6MMP, the investigation of the enzymatic kinetics of TPMT and, finally, the investigation of its potential inhibition by extracts of selected herbal drugs. An HPLC method lasting 22 min was developed. A Cortecs Phenyl column (150 × 4.6 mm, particle size 2.7 μm) was used as the stationary phase. A gradient elution with two components of the mobile phase (0.1% formic acid in water or methanol) was performed. The method met all the tested validation parameters. Examination of enzyme kinetics led to the conclusion that the volunteer's TPMT shows high enzyme activity and that the obtained results can be translated to the largest part of the population. Finally, the inhibitory potentials of herbal drug extracts were determined, and values were obtained for turmeric root extract (IC₅₀ = 275 μg/mL), black pepper fruit extract (IC₅₀ = 490 μg/mL), Chinese *Andrographis* leaf extract (IC₅₀ = 2300 μg/mL) and Indian frankincense resin (IC₅₀ = 1900 μg/mL). However, none of these plant extracts inhibited TPMT as efficiently as furosemide (IC₅₀ = 15 μg/mL), which is a known inhibitor of this enzyme.

The obtained data led to the conclusion that the concentrations obtained in this research as inhibitory cannot be achieved at the concentrations in which the selected preparations are on the market and show their pharmacological effects. All of the above indicates that the simultaneous use of these preparations and treatment with azathioprine and 6-mercaptopurine does not lead to significant pharmacokinetic interactions due to which the simultaneous use of these substances would be contraindicated and that, at least according to the tested parameters, there is no limitation in their joint use.

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

Thesis includes: 44 pages, 22 figures, 3 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Inflammatory bowel diseases, Thiopurine S-methyltransferase, 6-mercaptopurine, turmeric, black pepper, Indian frankincense, Chinese *Andrographis*

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Perković, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022.