

Analitičke metode za praćenje metaboličke aktivnosti humanih citokrom P450 enzima

Dautović, Dominik

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:008276>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Dominik Dautović

**Analitičke metode za praćenje metaboličke
aktivnosti humanih citokrom P450 enzima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Biokemija lijekova* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirze Bojića.

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svojem mentoru na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na potpori tijekom cijelog mog obrazovnog puta, a posebno tijekom proteklih pet godina studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Citokrom P450 enzimi	1
1.2. Citokrom P450 enzimi u metabolizmu lijekova	4
1.2.1. Enzim CYP1A2	5
1.2.2. Enzim CYP2C9	6
1.2.3. Enzim CYP2C19	7
1.2.4. Enzim CYP2D6	8
1.2.5. Enzim CYP3A4	10
1.3. Praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima	12
1.3.1. <i>In vitro</i> modeli za praćenje aktivnosti citokroma P450	12
1.3.2. <i>In vivo</i> modeli za praćenje aktivnosti citokroma P450	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Najkorištenije metode za praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima	19
4.1.1. HPLC metode	19
4.1.2. Metode temeljene na fluorescenciji	22
4.1.3. Metode temeljene na luminescenciji	24
4.1.4. Metode temeljene na radioaktivnim izotopima	26
4.2. Usporedba najčešćih metoda za praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima	28
4.3. Praćenje aktivnosti najvažnijih citokrom P450 enzima u metabolizmu lijekova	29
4.3.1. Praćenje aktivnosti enzima CYP1A2	29
4.3.2. Praćenje aktivnosti enzima CYP2C9 i enzima CYP2C19	34
4.3.3. Praćenje aktivnosti enzima CYP2D6	43
4.3.4. Praćenje aktivnosti enzima CYP3A4	48
4.3.5. Pojedinačno praćenje aktivnosti više citokrom P450 enzima	54
4.3.6. Koktel ispitivanja za praćenje aktivnosti više citokrom P450 enzima	57
5. ZAKLJUČAK	64
6. LITERATURA	65
7. SAŽETAK/SUMMARY	78
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

Popis kratica

AAMU, 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil;

AFMU, 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil;

AhR, aril-ugljikovodični receptor;

AMMC, 3-[2-(*N,N*-dietil-*N*-metilamonij)etil]-7-metoksi-4-metilkumarin;

AUC, površina ispod krivulje ovisnosti plazmatske koncentracije o vremenu;

BOMCC, 7-benziloksimetiloksi-3-cijanokumarin;

¹³C-DMBT, ¹³C-dekstrometorfan izdisajni test;

CBD, kanabidiol;

CL_{int}, intrinzični klirens;

CMR, kofeinski metabolički omjer;

CYP, citokrom P450;

DM/DX, metabolički omjer dekstrometorfan/dekstorfan;

DMSO, dimetil-sulfoksid;

DOB, razlika u odnosu na početnu vrijednost;

DURR, omjer osmosatnog sadržaja metabolita debrizokina i ukupnog sadržaja debrizokina i metabolita u urinu;

EET kiseline, epoksieikozatrienoične kiseline;

EM, ekstenzivni/brzi metabolizator;

EOMCC, etoksimetiloksi-3-cijanokumarin;

GA, gomizin A;

HLM, humani jetreni mikrosomi;

HPLC, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti;

IC₅₀, koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju;

IM, srednje brzi metabolizator;

IR, infracrvena;

K_m, Michaelis-Mentenova konstanta;

LC-MS, tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom;

LC-MS/MS, tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom;

MR, metabolički omjer;

MS, spektrometrija masa;

mSP300 i mSP1000, silika mikročestice promjera 300 i 1000 nm;

NSCLC, karcinom pluća nemalih stanica;

nSP30 i nSP70, silika nanočestice promjera 30 i 70 nm;

nSP30-C i nSP70-C, nSP30 i nSP70 modificirane karboksilnim skupinama;

nSP30-N i nSP70-N, nSP30 i nSP70 modificirane amino skupinama;

PM, spori metabolizator;

POR, P450 oksidoreduktaza;

qRT-PCR, kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu;

QQQ, maseni spektrometar s trostrukim kvadrupolom;

SD, standardna devijacija;

SEM, standardna mjerna pogreška;

TioTEPA, *N,N,N'*-trietilentiofosforamid;

UM, vrlo brzi metabolizator;

UV, ultraljubičasta;

V_{max} , maksimalna brzina enzimske reakcije u Michaelis-Mentenovoj jednadžbi.

1. UVOD

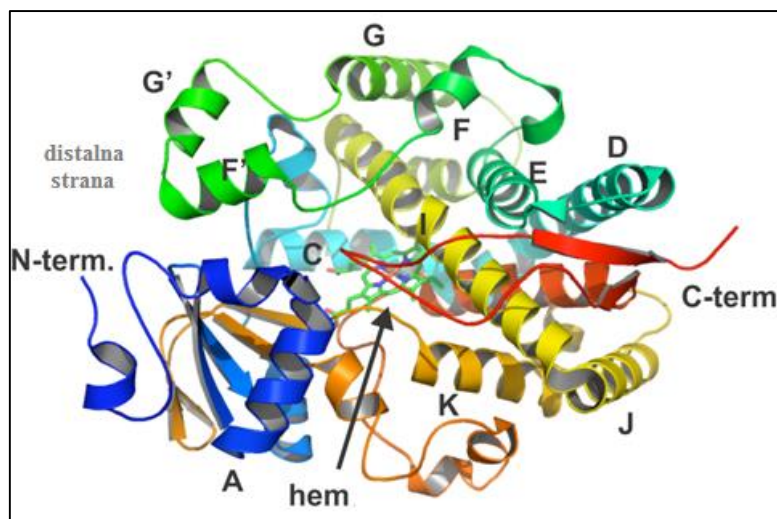
1.1. Citokrom P450 enzimi

Pod pojmom citokroma P450 podrazumijevaju se članovi superporodice hemproteina, označeni s CYP (engl. *cytochrome P450*), koji kataliziraju primarno oksidativne biotransformacije lipofilnih supstrata u polarnije metabolite (Rendić i Medić-Šarić, 2013). Njihovi supstrati uključuju brojne lijekove, pesticide, prokarcinogene i druge ksenobiotike, a imaju i vrlo kritičnu ulogu u biosintezi i metabolizmu nekih endobiotika, primjerice steroida, vitamina i određenih eikozanoida (Guengerich i Rendić, 2018).

Naziv im potječe od činjenice da su smješteni unutar stanice te da sadrže pigment hem koji apsorbira svjetlost s maksimumom na valnoj duljini od 450 nm kada je izložen ugljičnom monoksidu u reducirajućim uvjetima (Weinshilboum, 2003; Wilkinson, 2005).

CYP enzimi smješteni su u stanicama jetre, ali mogu se naći i u gastrointestinalnom traktu, plućima i mukozni nosne sluznice, te u bubrezima, mozgu, krvi i organima reproduktivnog sustava (Rendić i Medić-Šarić, 2013). U stanicama su citokrom P450 enzimi smješteni u endoplazmatski retikulum, koji je uključen u obradu i transport proteina, te u mitohondrije, koji su središta za proizvodnju energije. Mitohondrijski enzimi uglavnom sudjeluju u sintezi i metabolizmu fizioloških tvari, dok enzimi u endoplazmatskom retikulumu obično metaboliziraju organizmu strane tvari, prvenstveno lijekove i zagađivače okoliša (Guengerich, 2008).

Po građi su citokromi P450 polipeptidi molekulske mase u rasponu od 40 do 55 kDa. Važna razlika između membranski vezanih enzima prisutnih kod ljudi i topljivih P450 enzima je nepolarno proširenje na *N*-kraju koje usidruje enzim na membranu, ali čini se da to ima malo utjecaja na središnju strukturu. Svi CYP enzimi sadrže istu hemsku prostetsku skupinu (Fe-protoporfirin IX), koja je s apoproteinom povezana koordinativnom vezom cisteinskog ostatka s atomom željeza (slika 1.) (Poulos, 2014).



Slika 1. Struktura citokroma P450 (CYP3A4) s označenim elementima sekundarne strukture (Otyepka i sur., 2011).

Citokromi P450 su po enzimskom djelovanju tipične monooksigenaze (iz molekuskog kisika jedan se atom ugrađuje u molekulu organskog supstrata, dok se drugi atom reducira u oksidacijski stupanj vode). Mogu također djelovati kao oksidaze i peroksidaze, a kataliziraju i neke reduktivne reakcije (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Opća jednađžba monooksigenacije posredovane enzimima citokroma P450:



Citokromi P450 široko su rasprostranjeni po živom svijetu te se pretpostavlja da su geni za kodiranje tih enzima nastali iz jednog pretka, prije diferencijacija i evolucijskog razvoja od citoplazmatskih enzima prokariota do membranski vezanih enzima diferenciranih eukariotskih stanica sisavaca. U humanom genomu dosad je identificirano i strukturno definirano 57 gena koji kodiraju 57 funkcionalnih enzima superporodice CYP (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Identificirani enzimi razvrstani su u porodice i potporodice na temelju sličnosti sekvenci, što kod ljudi rezultira klasifikacijom u 18 porodica i 43 potporodice. Nomenklatura enzima temelji se na oznaci CYP za superporodicu, kojoj se dodaje broj koji označava porodicu, zatim slovo koje označava potporodicu te konačno broj za pojedini enzim (tablica 1.).

Tablica 1. Primjer klasifikacije citokrom P450 enzima (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Superporodica	CYP	Sličnost primarne strukture
porodica	CYP1	≥ 40 %
potporodica	CYP1A	≥ 55 %
enzim	CYP1A2	≥ 98 %

Pored toga što je citokrom P450 superporodica brojna (tablica 2.), mnogi pojedini enzimi su i polimorfni. Gen koji kodira za pojedini enzim smatra se polimorfnim kada je frekvencija varijantnog alela u normalnoj populaciji najmanje 1 %. Genski polimorfizmi imaju važnu ulogu kod CYP enzima uključenih u metabolizam lijekova zbog posljedičnih interindividualnih razlika, stoga se danas intenzivno proučava genetski utjecaj na učinke lijekova, a za očekivati je da će ta farmakogenetska saznanja u budućnosti imati značajnu kliničku primjenu (Božina i sur., 2009).

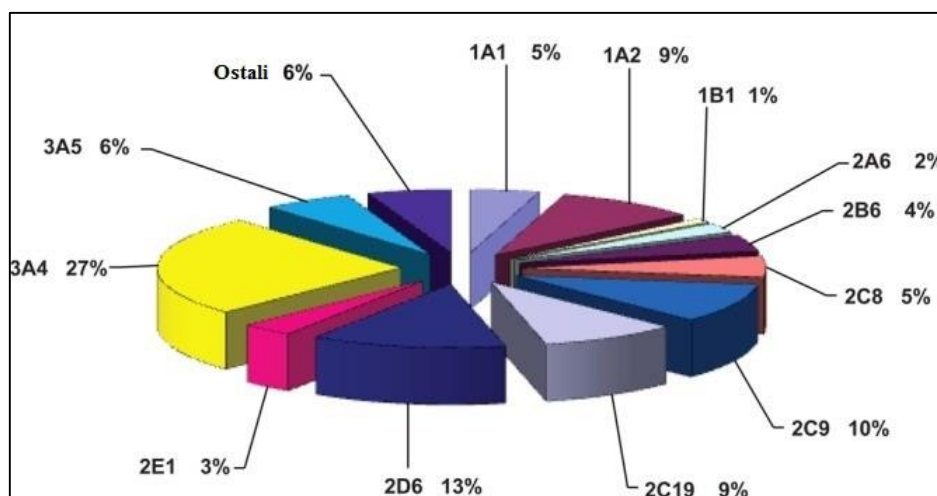
Tablica 2. Raznolikost humanih citokrom P450 enzima (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Porodica	Enzimi	Porodica	Enzimi	Porodica	Enzimi
CYP1	CYP1A1, CYP1A2	CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43	CYP17	CYP17A1
	CYP1B1		CYP4A11, CYP4A22	CYP19	CYP19A1
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13	CYP4	CYP4B1	CYP20	CYP20A1
	CYP2B6		CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22	CYP21	CYP21A2
	CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19		CYP4V2	CYP24	CYP24A1
	CYP2D6		CYP4X1	CYP26	CYP26A1
	CYP2E1		CYP4Z1		CYP26B1
	CYP2F1	CYP5	CYP5A1	CYP26C1	
	CYP2J2	CYP7	CYP7A1	CYP27	CYP27A1
	CYP2R1		CYP7B1		CYP27B1
	CYP2S1	CYP8	CYP8A1		CYP27C1
	CYP2U1		CYP8B1	CYP39	CYP39A1
	CYP2W1	CYP11	CYP11A1	CYP46	CYP46A1
			CYP11B1, CYP11B2	CYP51	CYP51A1

1.2. Citokrom P450 enzimi u metabolizmu lijekova

Prema nekoliko nepristranih procjena, gotovo 75 % svih reakcija transformacije lijekova čine katalize CYP enzimima, a ostatak najčešće uključuje reakcije glukuronidacije i hidrolize estera. 90 – 95 % reakcija u kojima sudjeluju CYP enzimi katalizirane su s 5 od 57 ljudskih citokrom P450 enzima: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 i 3A4, pri čemu je CYP3A4 najzastupljeniji enzim (slika 2.).

Iako zasigurno postoje brojna izvješća o značajnijoj uključenosti i nekih drugih P450 enzima u metabolizam lijekova (npr. 2A6, 2B6, 2C8), ne čini se da se postojeći obrazac previše mijenja. Za budućnost se ipak mogu predvidjeti dva trenda: (I) doprinosi izrazito polimorfnih CYP enzima kao što su 2C19 i 2D6 mogli bi se smanjiti jer većina farmaceutskih tvrtki pokušava izbjeći razvoj lijekova za koje će ti CYP enzimi imati veliki doprinos, (II) postoji tendencija da lijekovi postaju što veći kako bi se postigla veća selektivnost, stoga bi se moglo očekivati da će CYP3A4, sa svojim velikim aktivnim mjestom (te eventualno CYP2C8) imati rastući udio doprinosa metabolizmu lijekova (Guengerich i Rendić, 2010).



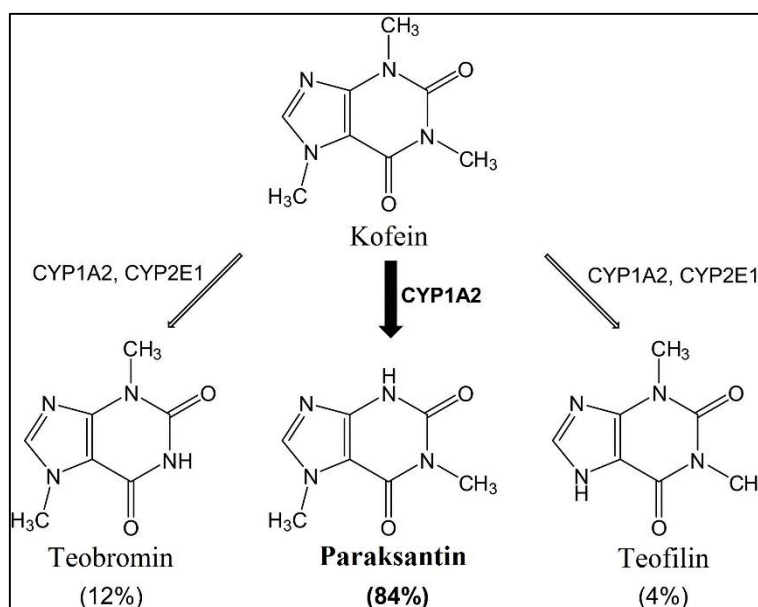
Slika 2. Ljudski citokrom P450 enzimi u metabolizmu lijekova (Guengerich i Rendić, 2015).

1.2.1. Enzim CYP1A2

Enzim CYP1A2 najviše je eksprimiran u jetri, gdje čini do 12 % ukupnog humanog hepatičkog P450 sadržaja. Supstrati CYP1A2 uključuju lijekove, industrijske kemikalije i zagađivače okoliša (Kapelyukh i sur., 2019). Od lijekova supstrata značajni su klozapin, duloksetin, fluvoksamin, haloperidol, imipramin, nabumeton, naproksen, olanzapin, teofilin, triamteren, zileuton, zolmitriptan. Enzim je također odgovoran za više od 95 % primarnog metabolizma kofeina, od čega CYP1A2 posredovana demetilacija kofeina u paraksantin predstavlja > 80 % ukupnog kofeinskog klirensa, a ostali primarni metabolički putovi uključuju demetilaciju u teobromin i teofilin (slika 3.) (Tian i sur., 2019). Estron i 17α -estradiol su endobiotski supstrati ovog enzima, podložni hidroksilaciji na položaju 2 (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Aktivnost enzima kod ljudi je promjenjiva zbog kombinacije genskog polimorfizma i okolišnih čimbenika koji utječu na razinu ekspresije i aktivnost enzima. Ekspresija CYP1A2 je visoko regulirana aril-ugljikovodičnim receptorom (AhR) te je u slučaju jetrenog enzima moguća indukcija ekspresije do 10 puta AhR ligandima kao što je 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) (Abraham i sur., 2002). Pušenje također inducira ekspresiju CYP1A2, stoga je potreban oprez pri korištenju lijekova supstrata uske terapijske širine, kao što je teofilin, jer učinak može biti smanjen (Dobrinis i sur., 2011).

Inhibitori CYP1A2 obuhvaćaju fluorokinolone, cimetidin, fluvoksamin i tiklopidin, dok se u *in vitro* modelima koriste i furafilin te α -naftoflavon (Stiborova i sur., 2012).

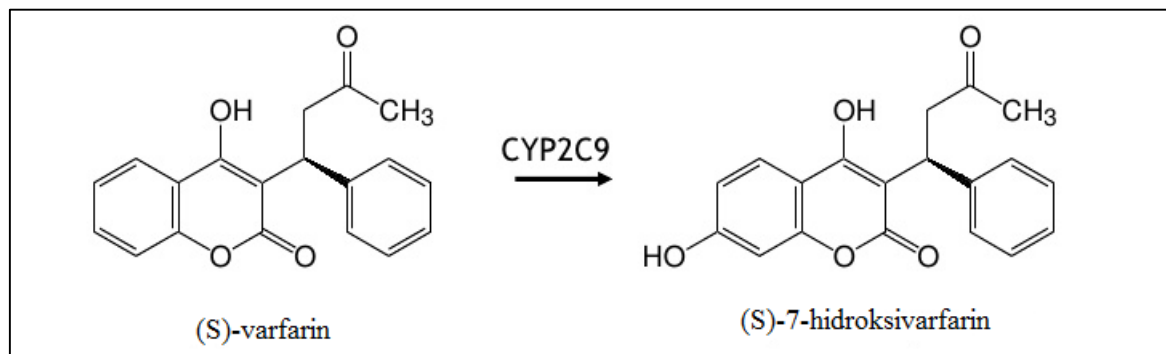


Slika 3. Primarni metabolizam kofeina (Tian i sur., 2019).

1.2.2. Enzim CYP2C9

Enzim CYP2C9 smješten je u jetri te manjim dijelom u tankom crijevu, aorti i srčanim arterijama. Značajno sudjeluje u metabolizmu lijekova, a supstrati su mu lijekovi iz skupine angiotenzin II blokatora (irbesartan, losartan), sulfonilureje (glibenklamid, glimepirid, glipizid, tolbutamid) te nesteroidni protuupalni lijekovi (celekoksib, diklofenak, ibuprofen, meloksikam, naproksen) (www.medicine.iupui.edu). CYP2C9 katalizira metabolizam *S*-varfarina (slika 4.), izomera koji je najvećim dijelom odgovoran za antikoagulacijski učinak lijeka. Ovaj je enzim također odgovoran za oko 90 % metabolizma antiepileptika fenitoina (Van Booven i sur., 2010).

Gen koji kodira za enzim CYP2C9 je polimorfan te postoje funkcionalne varijante farmakogenetskog značaja. Promjene metaboličke aktivnosti uzrokovane genskim varijantama *CYP2C9* imaju važnu ulogu u patogenezi uzrokovanoj štetnim reakcijama lijekova. Rizični su pacijenti s niskom enzimskom aktivnošću, posebno ako koriste supstrate CYP2C9 s uskom terapijskom širinom. Tako pacijenti sa sporo metabolizirajućim *2 (identificiran s R144C) i *3 (identificiran s I359L) haplotipovima trebaju niže doze varfarina da bi se postigli slični učinci kao u bolesnika s najmanje jednim *1 haplotipom (divlji tip) (Aithal i sur., 1999; Lindh i sur., 2009).



Slika 4. Reakcija 7-hidroksilacije *S*-varfarina katalizirana enzimom CYP2C9 najznačajnija je metabolička reakcija *S*-varfarina (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Zanimljiva je poveznica polimorfizma *CYP2C9* s razvojem karcinoma pluća nemalih stanica (engl. *non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC). Naime, ljudske endotelne stanice eksprimiraju CYP2C9, koji ima epoksigenaznu aktivnost, kao i ostali članovi CYP2C potporodice, te katalizira oksidaciju arahidonske kiseline u epoksieikozatrienoične (EET) kiseline. EET kiseline su mitogeni i proangiogeni lipidi koji potiču proliferaciju, tubulogenezu i invaziju

stanica. Prisutnost CYP2C9*2 i CYP2C9*3 ima povoljan učinak u ograničavanju rasta NSCLC-a i poboljšanju preživljavanja smanjenom proizvodnjom EET kiselina iz endogenih rezervi arahidonske kiseline (Sausville i sur., 2018).

Rifampicin, karbamazepin i fenobarbital induciraju CYP2C9. Tako se klirens losartana, fenitoina, tolbutamida i *S*-varfarina, kao supstrata, približno udvostručuje kod zdravih dobrovoljaca ili bolesnika koji su uzimali rifampicin (Kanebratt i sur., 2008).

CYP2C9 inhibiraju, između ostalih, amiodaron, flukonazol i sulfafenazol. Opasne lijek-lijek interakcije mogu nastati kada se inhibitor poput jednog od njih doda terapijskom režimu koji uključuje lijekove niskog terapijskog indeksa, poput već spomenutog *S*-varfarina ili primjerice fenitoina (Wells i sur., 1994; Levy 1995).

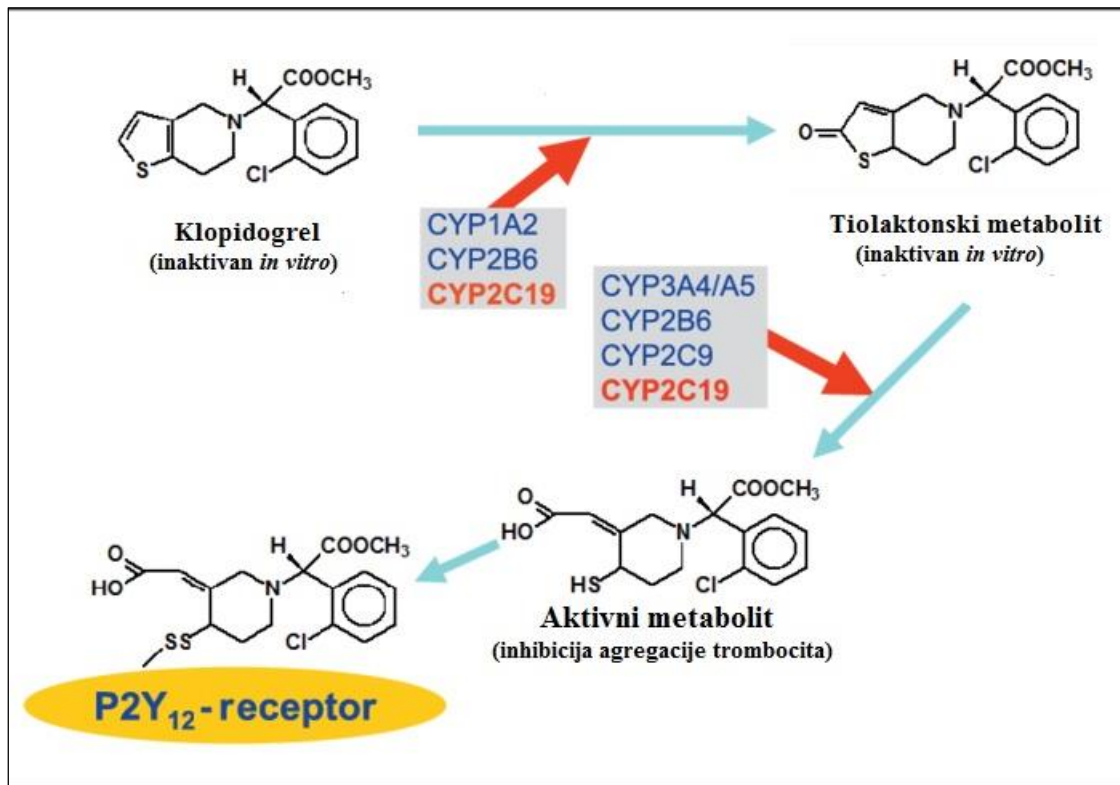
1.2.3. Enzim CYP2C19

Enzim CYP2C19 eksprimiran je u jetri s relativno malim udjelom do 5 %. Taj je enzim uključen u metabolizam inhibitora protonске crpke (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol), nekih antidepresiva (citalopram, escitalopram), zatim diazepama, klopidogrela, vorikonazola, talidomida, ciklofosfamida.

Klirens lijekova metaboliziranih djelovanjem CYP2C19 varira od 5 do 20 puta među pojedincima i etničkim skupinama, prvenstveno zbog učinaka genskih polimorfizama (Goldstein, 2001; Desta i sur., 2002), ali i negenetskih čimbenika poput interakcija lijekova (Desta i sur., 2002), dobi (Ishizawa i sur., 2005), trudnoće (McGready i sur., 2003) i stadija bolesti (Desta i sur., 2002; Frye i sur., 2006).

Klinički značaj farmakogenetike CYP2C19 dobro je utvrđen na primjeru klopidogrela, prolijeka koji se aktivira se u dva uzastopna oksidativna koraka u kojima sudjeluje nekoliko CYP enzima, uključujući CYP2C19 (slika 5.) (Kazui i sur., 2010). Ispitivanja su pokazala da je bioaktivacija klopidogrela oslabljena u sporih CYP2C19 metabolizatora, te da ti pacijenti imaju

nižu razinu aktivnog metabolita klopidozola u usporedbi s normalnim metabolizatorima (Scott i sur., 2013).



Slika 5. Aktivacija antagonista P2Y₁₂ receptora klopidozola u dva oksidativna koraka u kojima sudjeluje CYP2C19 (preuzeto i prilagođeno iz Trenk i sur., 2012).

Enzim značajno inhibira esomeprazol, a kao inhibitori od kliničkog značaja mogu se još izdvojiti vorikonazol, antidepresivi fluoksetin i fluvoksamin, te oralni kontraceptivi. Rifampicin, karbamazepam, efavirenz i ritonavir smatraju se induktorima aktivnosti CYP2C19.

1.2.4. Enzim CYP2D6

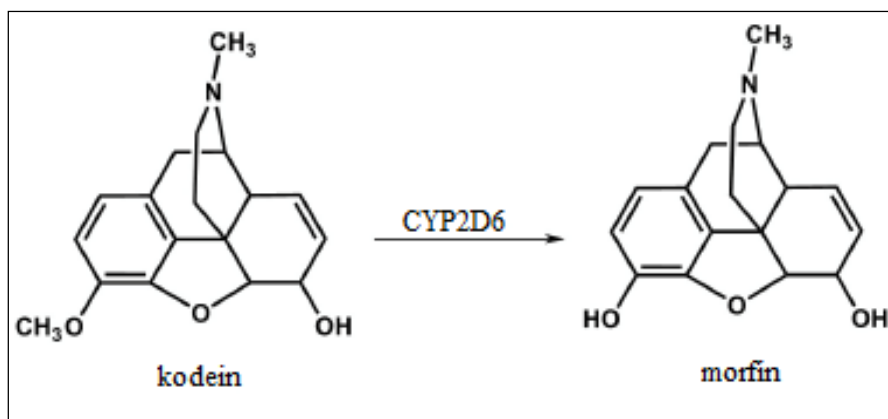
Enzim CYP2D6 čini samo mali postotak ukupnih jetrenih CYP enzima (< 2 %), ali metabolizira oko 25 % klinički korištenih lijekova, i to s velikom interindividualnom varijabilnošću. Značajnija ekstrahepatička prisutnost enzima zabilježena je u plućima i mozgu.

Brojni lijekovi koji djeluju na živčani sustav (aripirazol, desipramin, duloksetin, risperidon, tramadol) te kardiovaskularni sustav (alprenolol, karvedilol, timolol) u osnovi se metaboliziraju pomoću CYP2D6. Jedan od značajnijih supstrata je i kodein, čiji aktivni metabolit morfin, jaki

opioidni agonist, nastaje reakcijom *O*-demetilacije (slika 6.). Prema tome, djelotvornost i sigurnost kodeina ovise o aktivnosti CYP2D6. Postotak kodeina pretvorenog u morfin je inače malen (5 – 10 %), ali može biti puno veći kod ultrabrzih metabolizatora (Gasche i sur., 2004), stoga se već nekoliko godina predlažu terapijske smjernice temeljene na genotipu CYP2D6 (www.cpicpgx.org).

Enzim također koristi hidroksitriptamine i neurosteroide kao endogene supstrate. Pored toga, CYP2D6 metabolizira prokarcinogene i neurotoksine poput 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, 1,2,3,4-tetrahidrokinolina i indolalkilamina. Može se zaključiti da su tipični CYP2D6 supstrati obično lipofilne baze s planarnim hidrofobnim aromatskim prstenom i dušikovim atomom koji se može protonirati pri fiziološkom pH.

CYP2D6 nije značajno induciran tipičnim CYP induktorima poput fenobarbitala, rifampicina i deksametazona, ali je reguliran nuklearnim receptorom hepatocitnim nuklearnim faktorom 4 α . Enzim je podložan inhibiciji uzrokovanoj lijekovima (bupropion, fluoksetin, paroksetin, kinidin), što može pružiti objašnjenje za brojne kliničke interakcije lijekova. CYP2D6 važan je kod razvoja lijekova, te je danas uobičajena praksa u farmaceutskoj industriji specifično probiranje kandidata u što ranijoj fazi razvoja, tako da se moguće supstrate i/ili inhibitore CYP2D6 napusti ukoliko se pronade alternativno rješenje.



Slika 6. Reakcija *O*-demetilacije kodeina katalizirana CYP2D6 enzimom (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

1.2.5. Enzim CYP3A4

CYP3A4 najzastupljeniji je enzim jetrene i crijevne faze I kod ljudi (Paine i sur., 2006; Michaels i Wang, 2014), koji metabolizira približno 50 % lijekova na tržištu. U crijevima ovaj enzim djeluje nekoliko puta učinkovitije nego u jetri, a to mu omogućuje njegova dominantna intestinalna zastupljenost, visoki kapacitet te razlike u cirkulaciji. Naime, znatno niži protok krvi u crijevnoj sluznici u usporedbi s jetrom općenito omogućuje produljeno izlaganje crijevnim metaboličkim enzimima te dovodi do relativno visoke enterocitne koncentracije lijekova. Pored toga, oralno primijenjeni supstrati moraju prolaziti kroz enterocite, dok hepatocite mogu i zaobići ostajući u sinusoidalnoj krvi prije dolaska u sustavnu cirkulaciju (Gertz i sur., 2010).

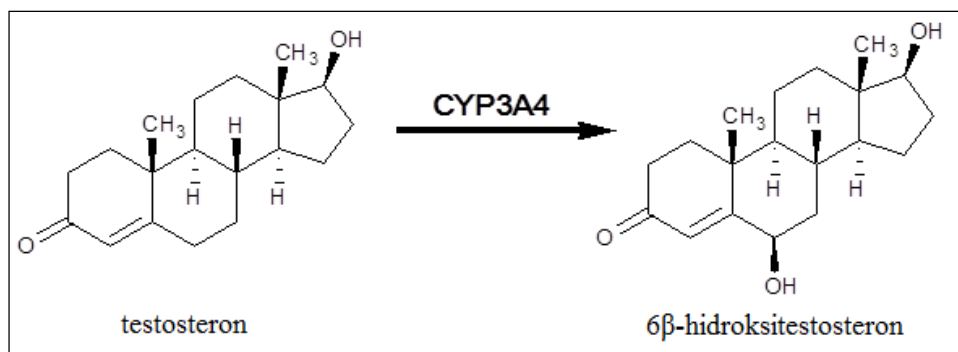
Fetalne razine ekspresije i aktivnosti CYP3A4 vrlo su niske, ali se razine odraslih osoba dosežu oko navršene prve godine (Ince i sur., 2013). Klinička ispitivanja pokazuju da žene brže metaboliziraju lijekove koji su supstrati CYP3A4 od muškaraca (za 20 do 30 %), a analize su također pokazale veću razinu CYP3A4 u uzorcima ženskog u odnosu na uzorke muškog tkiva (Soldin i sur., 2011).

Istraživanjima je pokazano da CYP3A4 prolazi dramatične konformacijske promjene nakon vezanja ketokonazola ili eritromicina s diferencijalnim, ali znatnim (> 80 %) povećanjem volumena aktivnog mjesta, što pruža strukturnu osnovu za ligandni promiskuitet CYP3A4. Identificirani su brojni važni lijekovi kao supstrati, induktori i/ili inhibitori CYP3A4. Supstrati CYP3A4 značajno se podudaraju s onima P-glikoproteina (Zhou, 2008). Neki od poznatih supstrata prikazani su u tablici (tablica 3.).

Tablica 3. Lijekovi supstrati enzima CYP3A4 (preuzeto i prilagođeno s www.medicine.iupui.edu).

Lijekovi supstrati enzima CYP3A4					
alprazolam	cisaprid	esomeprazol	karbamazepin	mifepriston	ritonavir
amitriptilin	citalopram	fentanil	ketokonazol	nifedipin	sildenafil
amlodipin	deksametazon	finasterid	klaritromicin	oksikodon	simvastatin
aprepitant	diltiazem	haloperidol	klopidogrel	paklitaksel	tamoksifen
atorvastatin	docetaksel	imatinib	kvetiapin	pioglitazon	testosteron
breksipiprazol	dutasterid	indinavir	loratadin	prednizon	verapamil
buspiron	efavirenz	irinotekan	lovastatin	propranolol	vinkristin
ciklosporin	eplerenon	ivabradin	midazolam	repaglinid	zolpidem

CYP3A4 značajno je uključen u metabolizam endogenih steroida poput testosterona, estradiola i dehidroepiandrosterona, pa tako reakcija hidroksilacije testosterona u 6 β -hidroksitestosteron ima analitičku korist (slika 7.).



Slika 7. Prikaz regioselektivne i stereoselektivne reakcije hidroksilacije testosterona na položaju 6 β (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Identificirani klinički značajni inhibitori CYP3A4 uključuju makrolidne antibiotike (klaritromicin, eritromicin), antimikotike (itrazonazol, ketokonazol), antiretroviralne lijekove (ritonavir, delavirdin), antidepresive (fluoksetin, fluvoksamin), blokatore kalcijevih kanala (verapamil, diltiazem), steroide i steroidne modulatore (gestoden i mifepriston), te nekoliko biljnih i dijetalnih sastojaka poput soka grejpa. Mnogi od spomenutih lijekova uzrokuju inhibiciju CYP3A4 koji se temelji na mehanizmu reakcije, što uključuje stvaranje reaktivnih metabolita, vezanje na CYP3A4 i ireverzibilnu inaktivaciju enzima.

Nekoliko lijekova poput rifampicina, fenitoina, ritonavira te hiperforina iz gospine trave identificirani su kao induktori CYP3A4. Nuklearni pregnanski X receptor (PXR), zatim konstitutivni androstanski receptor (CAR), peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor α (PPAR α) te vjerojatno glukokortikoidni receptor (GR) u tom procesu imaju ključnu ulogu (Hukkanen, 2012).

Inhibicija ili indukcija CYP3A4 lijekovima često uzrokuje nepovoljne i dugotrajne interakcije lijekova te vjerojatno i fatalnu toksičnost, ovisno o mnogim čimbenicima povezanim s enzimom, lijekovima i pacijentom. Proučavanje interakcija nosintetiziranih spojeva s CYP3A4 uključeno je u razvoj lijekova jer je otkrivanje mogućih inhibitora i induktora CYP3A4 tijekom ranih faza razvoja lijeka kritično u sprječavanju mogućih interakcija i nuspojava lijekova (Zhou, 2008).

1.3. Praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima

Razvijeni su standardizirani pristupi koji omogućuju fenotipizaciju aktivnosti CYP enzima, utvrđivanje doprinosa specifičnih P450 enzima metabolizmu ispitivanog lijeka, te procjenu potencijala i opsega inhibicije ili indukcije enzima. Moguće ih je primijeniti u *in vitro* i u *in vivo* modelima, uz oprez pri tumačenju i ekstrapolaciji rezultata (Glue i Clement, 1999).

1.3.1. *In vitro* modeli za praćenje aktivnosti citokroma P450

Za upotrebu u *in vitro* ispitivanjima, koja su često korištena u ranim fazama otkrivanja lijeka, razvijeni su brojni reagensi selektivni za pojedini CYP (supstrati, inhibitori, protutijela) (Parkinson, 1996), a komercijalno dostupni enzimski preparati uključuju hepatocite, rekombinantne CYP enzime, mikrosome i jetrene homogenate (Delaporte i Rodrigues, 2001). Za dobivanje rekombinantnih CYP enzima razvijeni su ekspresijski sustavi u kloniranim stanicama kvasca, bakterija i insekata (Glue i Clement, 1999).

Važna je pažljiva evaluacija modela, kao i primjena odgovarajućeg modela za određeni problem (tablica 4.). Tako kod ljudskog jetrenog tkiva moraju biti poznati čimbenici koji mogu promijeniti ekspresiju enzima (npr. prethodna uporaba inducirajućih lijekova ili povijest pušenja, zatim starost i spol). Ekspresija ili koncentracija enzima u normalnim stanicama ljudske jetre, ili raspoloživost koenzima, mogu se značajno razlikovati od opaženih vrijednosti u kultiviranim ili kloniranim stanicama te mikrosomskim preparatima, što je važno uzeti u obzir pri tumačenju mogućeg kliničkog značaja *in vitro* metaboličkih podataka (Glue i Clement, 1999). Koncentracije upotrijebljenih lijekova (bilo kao supstrata ili inhibitora) trebaju biti klinički relevantne. Ako su preniske, interakcije mogu ostati nezamijećene, a ako su previsoke, mogu se uočiti lažne interakcije (Rodrigues, 1994). Fizikalno-kemijska svojstva lijeka (npr. topljivost u vodi) i osjetljivost metode također će utjecati na korištene koncentracije lijeka (Harvey i Preskorn, 1995).

Tablica 4. Modeli za *in vitro* proučavanje metabolizma lijekova i njihova upotreba (Delaporte i Rodrigues, 2001).

Izvor enzima	Eksperiment
hepatociti, svježe izolirani	kvantitativni metabolizam lijekova predviđanje klirensa
hepatociti, kultivirani	indukcija enzima
hepatociti, kriokonzervirani	kvalitativni metabolizam lijekova indukcija enzima
jetreni homogenati	kvalitativna procjena metabolizma
mikrosomi	proučavanje inhibicije i probiranje probir metaboličke stabilnosti predviđanje klirensa reakcijska fenotipizacija
rekombinantni CYP enzimi	proučavanje inhibicije i probiranje reakcijska fenotipizacija informacije o odnosu strukture i djelovanja

Metabolizam ispitivanog lijeka *in vitro* može se odrediti mjerenjem brzine nestajanja spoja ili brzine stvaranja njegovih metabolita kada se inkubira u tkivni sustav. Ulogu specifičnih enzima u metabolizmu ispitivanog lijeka moguće je odrediti na nekoliko načina: inkubiranjem lijeka s dobro karakteriziranim tkivom većeg broja donora, te koreliranjem brzine metabolizma ispitivane sastavnice s brzinama metabolizma enzim-specifičnih supstrata u različitim uzorcima tkiva; inkubiranjem lijeka s pojedinačno kloniranim i eksprimiranim enzimima te procjenom metabolizma; ili dodavanjem selektivnih inhibitora CYP enzima uzorcima tkiva i traženjem promjena u brzini metabolizma. Alternativa upotrebi kemijskih inhibitora je upotreba enzim-specifičnih protutijela, premda se ona mogu koristiti samo u substancijskim modelima ispitivanja, a ne u ispitivanjima na cijelim stanicama (Glue i Clement, 1999).

Potencijal ispitivanog lijeka za inhibiciju određenih P450 enzima može se procijeniti ispitivanjem njegovih učinaka na brzinu metabolizma specifičnih marker supstrata. Koncentracije ispitivanog lijeka se u određenom rasponu inkubiraju sa supstratom, a određena brzina metabolizma uspoređuje s kontrolnim testom bez lijeka. Smanjena koncentracija metabolita i/ili povećana koncentracija specifičnog supstrata ukazivala bi na inhibiciju. Za

takva ispitivanja važno je uzeti u obzir selektivnost prema supstratu, kinetičke parametre (npr. K_m supstrata) i učinke otapala (Chauret i sur., 1998; Tang i sur., 2000).

Dokaz o sposobnosti ispitivanog lijeka da inducira CYP enzime može inicijalno doći iz toksikoloških ispitivanja u kojima se životinjama (glodavcima, psima, primatima) primjenjuju višestruke doze tijekom određenog vremenskog razdoblja. Parametri koji mogu ukazivati na indukciju enzima uključuju porast apsolutne ili relativne težine jetre, sadržaja mikrosomskih proteina i CYP-a, akumulaciju enzim-specifične mRNA i, u konačnici, porast aktivnosti odabranih CYP enzima. Zbog otežane ekstrapolacije toksikoloških rezultata sa životinjskih vrsta na čovjeka, za indukcijski probir preferiraju se kultivirani humani hepatociti, a u posljednjih nekoliko godina poboljšane su i tehnike kriokonzervacije, koje sada rezultiraju visokim postotkom održivih hepatocita nakon odmrzavanja (Gómez-Lechón i sur., 2006).

Zbog ograničene dostupnosti ljudske jetre i opsežnog vremena potrebnog za obavljanje pojedinačnih testova aktivnosti, potreba je smanjiti količinu vremena i humanih jetrenih mikrosoma ili hepatocita potrebnih za provođenje *in vitro* ispitivanja. Stoga su mnogi istraživači usvojili pristup CYP koktela kako bi istovremeno procijenili aktivnosti različitih CYP enzima. U takvom se ispitivanju preferirani i prihvatljivi marker supstrati za pojedini CYP enzim pomiješaju zajedno kao koktel, a zatim se inkubiraju s prikladnim *in vitro* sustavom za istodobno mjerenje aktivnosti više CYP enzima (Pillai i sur., 2013).

1.3.2. *In vivo* modeli za praćenje aktivnosti citokroma P450

Klinička ispitivanja provode se u tri glavne svrhe: da se procijeni uloga specifičnih CYP enzima u metabolizmu lijekova, da se ispituju mogući inducirajući ili inhibirajući učinci ispitivanog spoja na enzim, te da se utvrdi prisutnost genetski određenih razlika u enzimskoj aktivnosti (genski polimorfizmi).

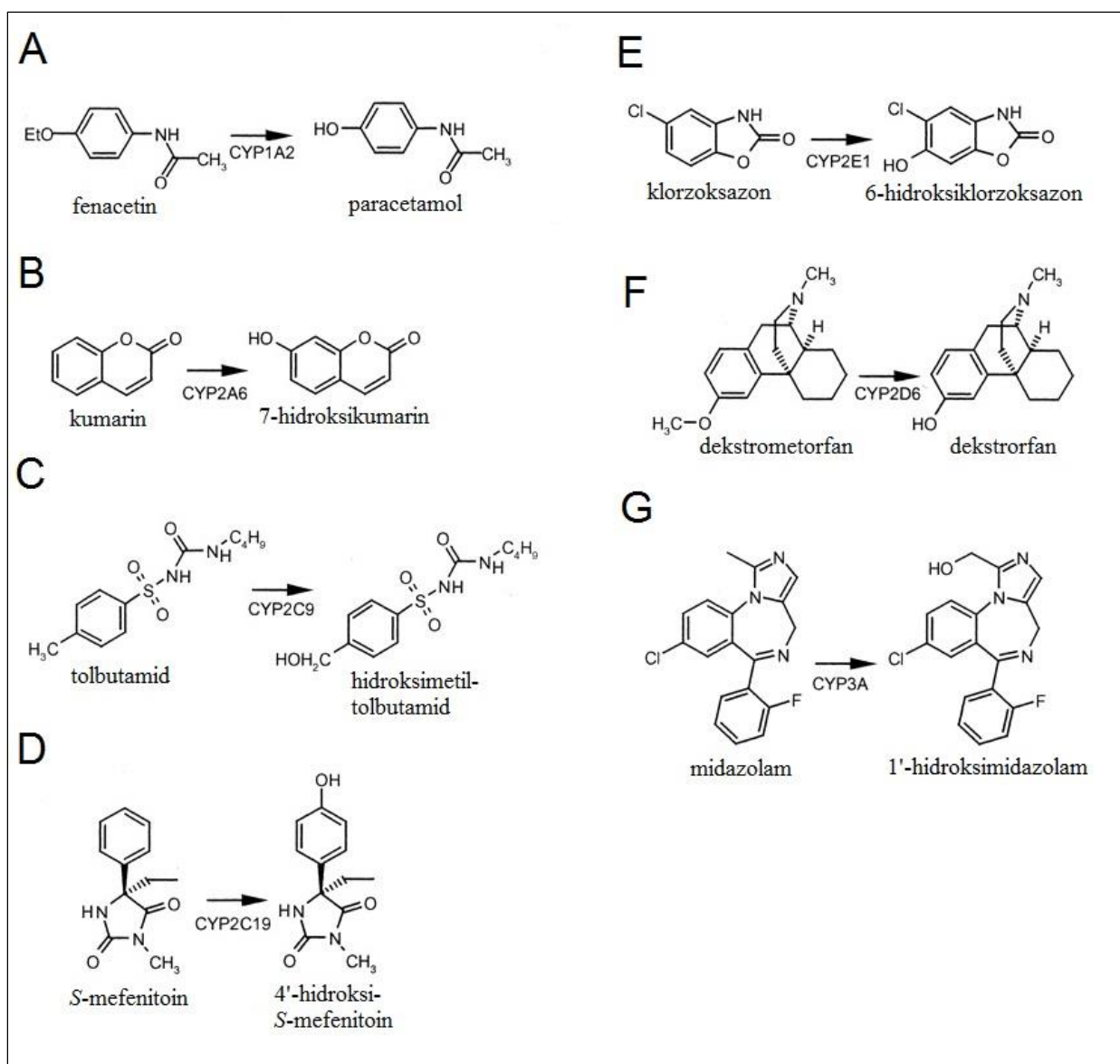
Da bi se provjerilo sudjeluje li enzim u metabolizmu ispitivanog spoja, može se primijeniti istodobno s poznatim specifičnim inhibitorom enzima. Koncentracije ispitivanog lijeka i metabolita u plazmi ili urinu zatim se uspoređuju s koncentracijama opaženim tijekom monoterapije. Za sudionike u takvim ispitivanjima potrebno je provjeriti status metabolizatora

kako bi se isključili spori metabolizatori. Procjena inhibicije također nije moguća kod ispitanika koji uzimaju enzimske inhibitore ili su nedavno završili liječenje inhibitorom s dugim vremenom polueliminacije, stoga su bitni podatci o trenutnoj ili nedavnoj povijesti uzimanja lijekova. Za razliku od uporabe inhibitora, nije moguće procijeniti specifično sudjelovanje enzima u metabolizmu ispitivanih spojeva primjenom induktora zbog nedostatka njihove specifičnosti (Glue i Clement, 1999).

Najčešće korišteni pristup za procjenu metaboličke aktivnosti *in vivo* je određivanje metaboličkog omjera (MR) specifičnog supstrata i metabolita u slini, serumu, plazmi ili urinu. Osim određivanja koncentracije u biološkim tekućinama, koriste se i specifični supstrati u različitim izdisajnim testovima. Rijetko se koriste neki drugi pristupi, npr. pupilometrija nakon primjene opioida (Jurica i Sulcova, 2012). Obzirom na MR, odnosno fenotip, moguća je klasifikacija u 4 različite kategorije: spori metabolizatori (PM), srednje brzi metabolizatori (IM), ekstenzivni/brzi metabolizatori (EM) i vrlo brzi metabolizatori (UM) (Zanger i sur., 2004).

Selektivni supstrati određenog CYP enzima, odnosno markeri metaboličke aktivnosti (slika 8.), supstancije su koje se idealno metaboliziraju jednim CYP enzimom (Pelkonen i sur., 1998; 2008). Pored toga, idealni marker trebao bi biti netoksična tvar tako da je omogućena uporaba *in vivo*, te lako dostupna tvar koja se može odrediti u biološkim tekućinama zajedno s glavnim metabolitima. Njegova farmakokinetika treba biti određena metabolizmom, a ne intenzitetom perfuzije jetre, vezanja na proteine ili eliminacije nepromijenjenog lijeka (Frank i sur., 2007; Pelkonen i sur., 1998).

Metode koje se temelje na DNA, tj. procjeni genotipa, u odnosu na ovaj pristup imaju prednost jer nije potrebno ponavljanje, zato što se rezultati ne mijenjaju vremenom ili pod istodobnim utjecajem lijekova i drugih čimbenika. S druge strane, nedostatak farmakogenetskog ispitivanja je taj što genotip ne korelira uvijek s metaboličkom aktivnošću zabilježenom korištenjem marker supstrata. To odstupanje može biti uzrokovano različitim epigenetskim čimbenicima, kao i inhibicijom ili indukcijom metaboličke aktivnosti enzima, kao posljedicom istodobne primjene drugih ksenobiotika (Jurica i Sulcova, 2012).



Slika 8. Reakcije marker supstrata za određene P450 enzime (**A.** *O*-deetilacija fenacetina za CYP1A2, **B.** 7-hidroksilacija kumarina za CYP2A6, **C.** hidroksilacija metilne skupine tolbutamida za CYP2C9, **D.** 4'-hidroksilacija *S*-mefenitoina za CYP2C19, **E.** 6-hidroksilacija klorzoksazona za CYP2E1, **F.** *O*-demetilacija dekstrometorfana za CYP2D6, **G.** 1'-hidroksilacija midazolama za CYP3A4) (preuzeto i prilagođeno iz Walsky i Obach, 2004).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Citokrom P450 (CYP) presudna je superporodica enzima koji metaboliziraju lijekove. Metabolizam lijekova predstavlja ključni put detoksikacije dodavanjem hidrofilnih skupina u strukturu molekula. Glavni CYP enzimi uključeni u taj proces su: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 i CYP2C19.

Genetski određene razlike ili modulacija enzimske aktivnosti citokroma P450 mogu dovesti do različitih učinaka. Interakcije lijekova mogu se javiti ako jedan od lijekova inhibira aktivnost CYP enzima koji je uključen u metabolizam istodobno primijenjenog lijeka. To će rezultirati povišenjem koncentracije istodobno primijenjenog lijeka u plazmi i potencijalnim neželjenim ili štetnim učincima lijekova. S druge strane, mnogim prolijekovima je potrebna bioaktivacija putem CYP enzima kako bi se postigle farmakološke aktivnosti. U takvim okolnostima, inhibicija aktivnosti CYP enzima jednim lijekom dovest će do sprječavanja aktivacije istodobno primijenjenog lijeka (prolijeka). Smanjenje djelotvornosti lijeka može nastati i kao posljedica opsežnog metabolizma zbog indukcije citokrom P450 enzima.

Iz svih ovih razloga, važno je pratiti metaboličku aktivnost CYP enzima i istraživati modulacijski učinak lijekova i aditiva, novih kemijskih entiteta, te biljnih i prehrambenih proizvoda na njihovu aktivnost.

U ovom radu dan je pregled najčešće korištenih metoda za praćenje metaboličke aktivnosti CYP enzima, zatim usporedba prednosti i nedostataka postojećih pristupa, te primjena navedenih metoda u ispitivanju najvažnijih CYP enzima u metabolizmu lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog rada korišteni su preglednici znanstvene literature bibliografskih i citatnih baza: PubMed, ScienceDirect, Hrčak, Scopus. Upotrijebljene su dostupne znanstvene knjige i časopisi te su pregledavane mrežne stranice relevantne tematike.

Ključne riječi korištene pri pretraživanju:

Cytochrome P450, CYP;

CYP metabolic activity evaluation;

CYP phenotyping;

CYP inhibition and induction studies;

CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 probes; marker substrates; assays; activity assessment; methods of analysis.

Razdoblje pretraživanja: lipanj - rujan 2020.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Najkorištenije metode za praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima

Prema podacima iz literature, najčešće metode koje se koriste za određivanje produkata enzimske reakcije, u svrhu praćenja metaboličke aktivnosti, uključuju HPLC s UV ili MS detekcijom, određivanje fluorescencije, luminescencije i radioaktivnosti (Zlokarnik i sur., 2005).

4.1.1. HPLC metode

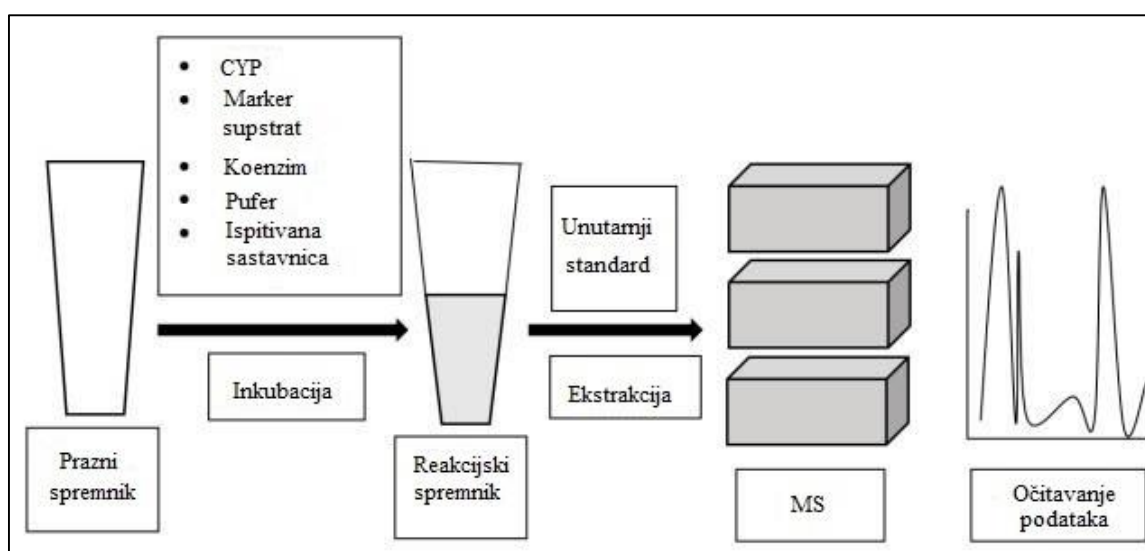
Tradicionalni pristupi proučavanja aktivnosti CYP enzima uglavnom su ispitivanja zasnovana na kromatografiji, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Ukratko, iz prethodno inkubirane smjese za analizu, koja sadrži CYP enzim, pufer, marker supstrat i koenzim, pripremi se uzorak za analizu, koji se zatim pumpa kroz stacionarnu fazu (HPLC kolonu) pokretnom fazom pod visokim tlakom. Interakcija komponenata uzorka sa stacionarnom i mobilnom fazom utječe na različite brzine migracije kroz kolonu, utječući tako na razdvajanje metabolita koji se kvantitativno određuju pomoću HPLC sustava. Što više metabolita nastane, očekivana aktivnost enzima je veća.

Metode temeljene na određivanju reakcijskih produkata pomoću HPLC-a smatraju se selektivnim i točnim metodama u ispitivanju CYP enzima u različitim biološkim sustavima, poput mikrosoma ili tkivnih presjeka (Moskaleva i Zgoda, 2013). Iako su korisna, ispitivanja temeljena na HPLC-u obično zahtijevaju detaljne ekstrakcijske postupke za uklanjanje proteina i drugih velikih molekula koje mogu blokirati HPLC sustav. Također zahtijevaju relativno velike volumene i visoke enzimske koncentracije kako bi se dosegla granica detekcije. Nadalje, testovi temeljeni na HPLC-u imaju relativno dugo vrijeme trajanja analize pojedinog uzorka (Ung i sur., 2018).

Ranije se detekcija provodila uglavnom pomoću UV detektora. Korištenje HPLC-UV za analizu spojeva često je rezultiralo složenim kromatogramima u kojima je pik koji predstavlja supstrat ili metabolite bilo teško razlikovati od pozadinskih pikova (Ansede i Thakker, 2004).

Stoga se danas najviše upotrebljavaju metode koje koriste maseni spektrometar za detekciju (Moskaleva i Zgoda, 2013).

Nakon što se analiti eluiraju s HPLC kolone, usmjeravaju se u maseni spektrometar, u kojem se pojedine komponente u smjesi ioniziraju, a zatim razdvajaju primjenom električnog ili magnetskog polja te analiziraju preko odnosa njihove mase i naboja (m/z) (slika 9.) (Kostiainen i sur., 2003). Stoga se u LC-MS-u detekcija provodi na temelju identificiranja molekulskog iona koji odgovara molekulskoj masi početnog spoja ili predviđenih metabolita (Ansede i Thakker, 2004).



Slika 9. Opći tijek rada ispitivanja temeljenog na masenoj spektrometriji (MS) (preuzeto i prilagođeno iz Ung i sur., 2018).

Još veća selektivnost može se postići upotrebom LC-MS/MS-a (tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom), u kojoj se koristi maseni spektrometar s trostrukim kvadrupolom (QQQ) (Tolonen i sur., 2007). QQQ se sastoji od dva kvadrupola i kolizijske ćelije koja je smještena između njih. Prvi kvadrupol omogućava prolazak jedino ionima ciljane tvari, od kojih zatim u kolizijskoj ćeliji nastaju novi karakteristični ioni koji ulaze u drugi kvadrupol. Stoga prisutnost dva filtera omogućava dobivanje selektivnog signala ispitivane tvari i povećanje osjetljivosti određivanja (Moskaleva i Zgoda, 2013).

LC-MS/MS se smatra brzim i osjetljivim analitičkim pristupom za kvantifikaciju metabolita koji se vrlo često koristi u ispitivanju CYP enzima (tablica 5.). U mogućnosti je dati velike

količine eksperimentalnih podataka, a također ima mogućnost izrade podataka s velikom točnošću. Nadalje, LC-MS/MS se može udružiti s koktel metodom, koja omogućava određivanje aktivnosti više CYP enzima istovremeno.

Međutim, LC-MS/MS zahtijeva ionizaciju (uglavnom elektrosprej), a oprema je relativno skupa. Uz to, za neke metabolite nije dovoljno osjetljiva, niti je prikladna za korištenje u ranim fazama otkrivanja lijekova, gdje u usporedbi s fluorescencijskim i luminescencijskim ispitivanjima ostvaruje slabiju protočnost (Kozakai i sur., 2014).

Tablica 5. Supstrati za ispitivanje aktivnosti farmakološki važnih citokrom P450 enzima te MS parametri korišteni za detekciju (preuzeto i prilagođeno iz Moskaleva i Zgoda, 2013).

CYP enzim	Marker supstrat	Mjerljivi metabolit	Ioni prekursori i produkti korišteni tijekom detekcije (m/z)
1A2	fenacetin	paracetamol	152 → 110
	kofein	paraksantin	195 → 110
	melatonin	6-hidroksimelatonin	249 → 190
2A6	kumarin	7-hidroksikumarin	161 → 133 (-), 163 → 107
2D6	dekstrometorfan	dekstorfan	258 → 201, 258 → 157, 258 → 199
	bufuralol	1-hidroksibufuralol	278 → 187
2E1	klorzoksazon	6-hidroksiklorzoksazon	184 → 120 (-)
2C9	diklofenak	4'-hidroksidiklofenak	312 → 231, 312 → 266, 310 → 266 (-)
	tolbutamid	4'-hidroksitolbutamid	287 → 188, 287 → 89, 287 → 171, 285 → 186 (-)
2C19	mefenitoin	4'-hidroksimefenitoin	235 → 186, 235 → 150, 235 → 133, 233 → 190 (-)
	omeprazol	5-hidroksiomeprazol	362 → 214
		desmetilomeprazol	332 → 198
3A4/5	midazolam	1'-hidroksimidazolam	342 → 324, 342 → 203, 342 → 297
	testosteron	6-hidroksitestosteron	305 → 287, 305 → 269

Osim s tekućinskom, masena spektrometrija može se spregnuti i s plinskom kromatografijom (GC-MS), što se također primjenjuje za kvantificiranje i identificiranje metabolita nastalih u reakcijama kataliziranim CYP enzimima. Ipak, postupak derivatizacije analita koji prethodi GC-MS-u je opsežan, pa to ograničava njegovu korisnost u identifikaciji metabolita. Uz to, pokazalo se da su LC-MS ili LC-MS/MS snažniji analitički pristupi za karakterizaciju struktura i kvantificiranje metabolita lijekova u reakcijama citokroma P450 (Ung i sur., 2018).

4.1.2. Metode temeljene na fluorescenciji

Fluorescencija je često korištena u ispitivanju citokroma P450, pa tako fluorimetrijski testovi predstavljaju najčešće korišten pristup u ispitivanju spojeva kao inhibitora aktivnosti citokroma P450 (Ansede i Thakker, 2004). Temelji se na upotrebi supstrata koji se metaboliziraju putem CYP enzima uz tvorbu fluorescentnih produkata. Promjena intenziteta fluorescencije tijekom inkubacije CYP enzima s odgovarajućim supstratom kvantitativna je mjera nastalog fluorescentnog produkta, a samim tim i mjera enzimske aktivnosti.

Fluorogeni supstrati trebali bi imati dobru topljivost u vodi, nisku pozadinsku fluorescenciju, visok omjer signala i šuma ili prikladnu valnu duljinu pobude u UV rasponu za mjerenje aktivnosti CYP enzima, a uz to, trebali bi osigurati i dostatno stvaranje metabolita. Za tu svrhu mogu biti prikladni različiti *O*-alkilni derivati rezorufina, fluoresceina, 7-hidroksikumarina, 6-hidroksikinolina, kao i 4-metilsulfonilfenilfuranoni (tablica 6.) (Ung i sur., 2018).

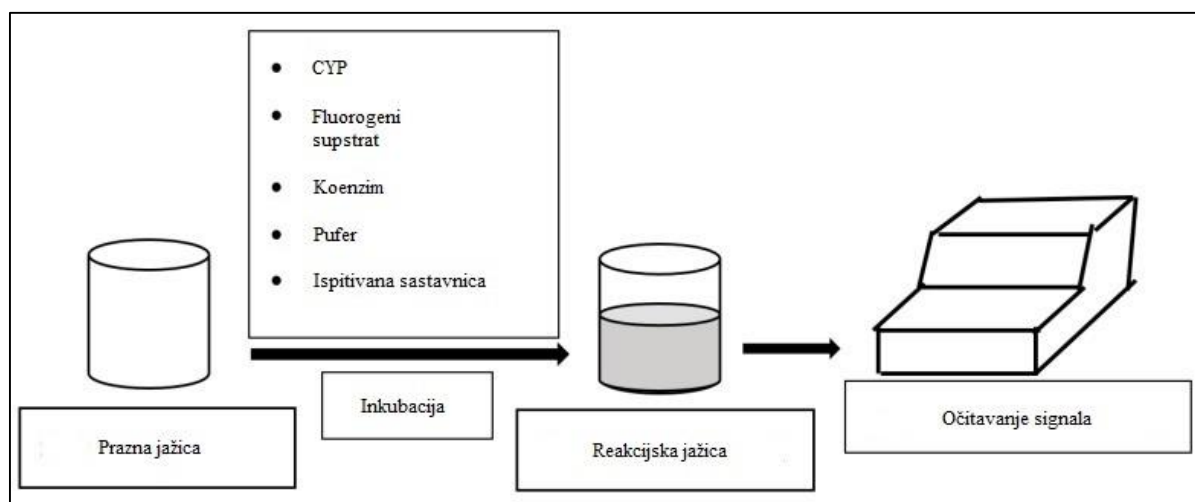
Tablica 6. Neki uobičajeni fluorogeni supstrati citokroma P450 (Prough i sur., 1978; Ung i sur., 2018).

Marker supstrat	CYP enzim	Metabolit	Ekscitacija/ Emisija (nm)
kumarin	CYP2A6	7-hidroksikumarin	355/460
BFC	CYP3A4	HFC	410/510
AMMC	CYP2D6	AHMC	390/460
DFB	CYP3A4	DFH	360/440
EOMCC	CYP1A2/2C19/2D6	CHC	408/455
BOMCC	CYP2C9/3A4	CHC	408/455
BOMF	CYP2C9	fluorescein	485/538
7-benziloksikinolin	CYP3A4	7-hidroksikinolin	358/505
benzilrezorufin	CYP3A4	rezorufin	550/585
DBOMF	CYP3A4	fluorescein	485/538

Kratice: BFC, 7-benziloksi-4-(trifluorometil)-kumarin; HFC, 7-hidroksi-4-(trifluorometil)-kumarin; AMMC, 3-[2-(*N,N*-dietil-*N*-metilamonij)etil]-7-metoksi-4-metilkumarin; AHMC, 3-[2-(*N,N*-dietil-*N*-metilamonij)etil]-7-metoksi-4-metilkumarin; DFB, (3,4-difluorobenziloksi)-5,5-dimetil-4-(4-metilsulfonilfenil)-(5H)-furan-2-on; DFH, (hidroksi)-4-(4-metilsulfonilfenil)-5,5-dimetil-(5H)-furan-2-on; EOMCC, etoksimetiloksi-3-cijanokumarin; CHC, 3-cijano-hidroksikumarin; BOMCC, 7-benziloksimetiloksi-3-cijanokumarin; BOMF, benziloksimetilfluorescein; DBOMF, dibenziloksimetilfluorescein.

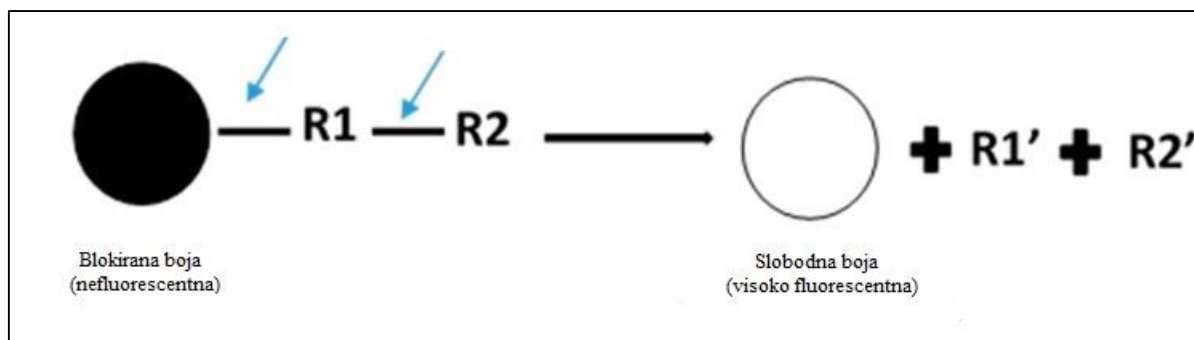
Budući da većina fluorogenih supstrata nije selektivna, preporučljivo je koristiti heterologno eksprimirane rekombinantne CYP enzime umjesto jetrenih mikrosoma ili hepatocita, koji sadrže veći broj CYP enzima.

Za razliku od konvencionalnih inhibicijskih probira koji su se oslanjali na dugotrajnu HPLC za razdvajanje i kvantifikaciju metabolita, ispitivanja koja se temelje na fluorescenciji mogu se izvoditi na pločici s 96 jažica kako bi se provjerile inhibitorne sposobnosti širokog spektra lijekova i biljnih sastojaka na visokoprotlačnoj razini (slika 10.).



Slika 10. Opći tijek rada ispitivanja temeljenog na fluorescenciji izvedenog u jednoj jažici (preuzeto i prilagođeno iz Ung i sur., 2018).

Danas su razvijeni i komercijalni setovi koji sadrže rekombinantne CYP, CYP reduktazu, koenzime, puffer i fluorogene supstrate (poput BOMCC i EOMCC). Ako ispitivani spoj ne služi kao inhibitor, tada se fluorogeni supstrat metabolizira u svoj fluorescentni produkt. Međutim, ako ispitivani spoj inhibira CYP, fluorogeni supstrat se ne metabolizira ili se sporije metabolizira u fluorescentni produkt. Vivid® CYP450 Screening setovi koje isporučuje ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, SAD) široko se primjenjuju (slika 11.).



Slika 11. Shema metabolizma Vivid® supstrata u fluorescentni metabolit. Supstrat nije fluorescentan jer su njegovi fluorofori blokirani s R1 i R2. Signal fluorescencije aktivira se nakon što su R1 i/ili R2 uklonjeni CYP enzimima (preuzeto i prilagođeno iz Ung i sur., 2018).

Upotreba fluorescencije za procjenu inhibicije CYP enzima pokazuje nekoliko prednosti u usporedbi s tradicionalnim enzimskim ispitivanjima temeljenim na HPLC-u, uključujući ponovljivost i jednostavnost korištenja (Moskaleva i Zgoda, 2013). Brži je pristup jer je za prikupljanje podataka potrebno kraće vremensko razdoblje, također košta manje jer se troškovi reagensa svode na minimum uz mali gubitak u kvaliteti podataka. Pored toga, posebno je korisna za enzime s niskom ekspresijom, poput polimorfnih varijanti (Ung i sur., 2018).

Međutim, primjenjivost ove metode ograničena je niskom specifičnošću supstrata za pojedini enzim, prigušivanjem fluorescencije i interferencijom ispitivanih spojeva koji, ukoliko pokazuju svojstva fluorescencije, ometaju fluorimetrijsko mjerenje metabolita. Višak NADPH može ometati fluorimetrijsku detekciju nekih metabolita, što zahtijeva daljnje eksperimentalne korake za uklanjanje viška NADPH na kraju inkubacije (Donato i sur., 2004). Neki od ovih nedostataka riješeni su strukturnom izmjenom uobičajenih fluorogenih supstrata ili korištenjem pojedinih enzima (Ansede i Thakker, 2004).

4.1.3. Metode temeljene na luminescenciji

Ovaj se pristup temelji na korištenju supstrata koji oslobađaju luciferin tijekom njihove citokrom P450 ovisne oksidacije. Luminogeni CYP supstrati derivati su *D*-luciferina, ali nisu aktivni s luciferazom. Selektivnost CYP enzima za luminogene supstrate ovisi o supstituentima R1 i R2 (tablica 7.) (Cali i sur., 2006). Nakon inkubacije monooksigenaznog sustava koji sadrži

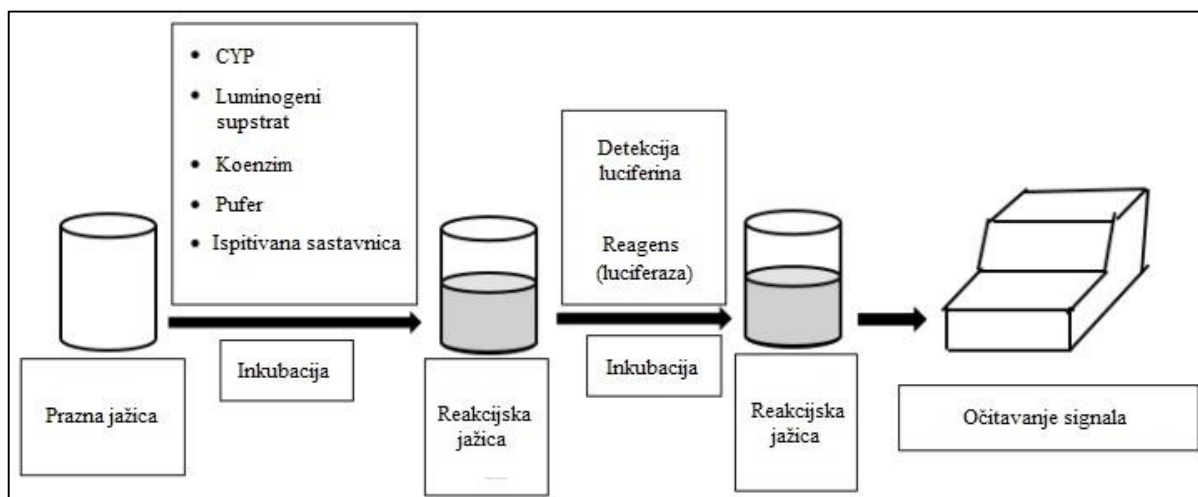
CYP u prisutnosti luminogenih supstrata, oslobođeni luciferin reagira s luciferazom stvarajući luminescentnu svjetlost koja je proporcionalna aktivnosti CYP enzima (Auld i sur., 2013).

Tablica 7. Luminogeni supstrati i njihove reakcije s farmakološki značajnim humanim CYP enzimima (prezeto i prilagođeno iz Cali i sur., 2006).

Supstrat	R1	R1	CYP	Reakcija
Luciferin-ME	CH ₃ O-	-H	CYP1A2/ 2C8/ 2C9	demetilacija
Luciferin-H	H-	-H	CYP2C9	hidroksilacija
Luciferin-BE	C ₆ H ₆ CH ₂ O-	-H	CYP3A4	debenzilacija
Luciferin-ME-EGE	CH ₃ O-	-CH ₂ CH ₂ OH	CYP1A2/ 2D6	demetilacija
Luciferin-H-EGE	H-	-CH ₂ CH ₂ OH	CYP1A2/ C19	hidroksilacija

Kratice: luciferin-ME, luciferin-6'-metil-eter; luciferin-H, deoksiluciferin; luciferin-BE, luciferin-6'-benzil-eter; luciferin-ME-EGE, etilen-glikolni ester luciferin-6'-metil-etera; luciferin-H-EGE, etilen-glikolni ester deoksiluciferina.

Mjerenje luminescencije za kvantificiranje aktivnosti CYP enzima se, kao i fluorimetrija, može izvoditi na pločicama s više jažica (slika 12.).



Slika 12. Opći tijek rada ispitivanja temeljenog na luminescenciji (prezeto i prilagođeno iz Ung i sur., 2018).

Većina CYP testova temeljenih na luminescenciji koji su dostupni u literaturi koriste P450-Glo™ setove za ispitivanje, koje je isporučila Promega Corporation (Madison, WI, SAD). Pomoću P450-Glo™ testnih setova mogu se istražiti učinci različitih spojeva od interesa na

enzimsku aktivnost citokroma P450. Nadalje, budući da su supstrati i metaboliti P450-Glo™ permeabilni za stanice, brojni stanični testovi koriste ove setove za ispitivanje CYP aktivnosti.

Visokoprotočno ispitivanje temeljeno na luminescenciji je učinkovita, jeftina i vrlo osjetljiva metoda za ispitivanje enzima, te je prikladna za CYP probire tijekom ranog otkrivanja lijekova, posebno za ispitivanja farmakokinetike i toksičnosti. Vrlo je fleksibilna u vrsti korištenog tkiva, količini uzorka, specifičnosti enzima, kao i u načinu pripreme. Ova je metoda također smanjila interferencije optičkih svojstava ispitivanih spojeva u odnosu CYP supstrate (Kim i sur., 2015).

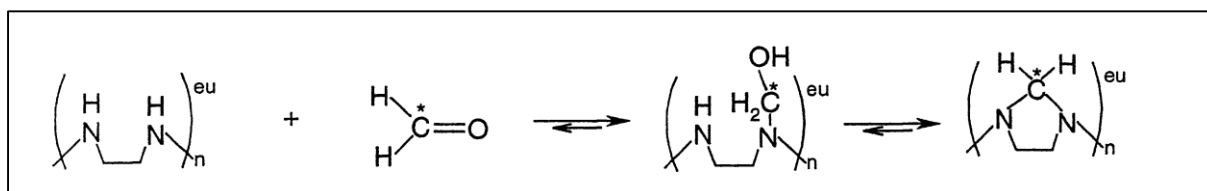
Međutim, luminescentni test pokazuje očitavanja s manjom aktivnošću u usporedbi s fluorescentnim testom zbog nižih koncentracija luminogenog supstrata upotrijebljenih u svrhu postizanja boljeg omjera luminescentnog signala i šuma, pa se samo na ovu metodu ne treba pouzdati (Ung i sur., 2018).

4.1.4. Metode temeljene na radioaktivnim izotopima

Radiometrijske metode temelje se na ³H- ili ¹⁴C-obilježenim supstratima koji se selektivno metaboliziraju ispitivanim CYP enzimima. Nakon separacije uzorka pomoću HPLC-a, koncentracije metabolita određuju se pomoću radiokemijskog detektora. Te se metode također mogu osloniti se na oslobađanje tricirane vode nakon hidroksilacije C-³H dijela obilježene molekule i izmjene protona s puferskom vodom (Di Marco i sur., 2007), ili ¹⁴C-formaldehida nakon oksidativne *O*- ili *N*-demetilacije -¹⁴CH₃ skupinom obilježene molekule lijeka (Moody i sur., 1999).

Ove se metode često koriste za evaluaciju inhibicije CYP enzima novim ljekovitim supstancijama, pa su tako razvijeni potpuno automatizirani radiometrijski testovi inhibicije za CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 i CYP3A4 korištenjem [*O*-etil-¹⁴C]fenacetina (Rodrigues i sur., 1997), [*O*-metil-¹⁴C]dekstrometorfana (Rodrigues i sur., 1994), [*O*-metil-¹⁴C]naproksena (Rodrigues i sur., 1996), [*N*-metil-¹⁴C]diazepam (Kenworthy i sur., 1999) i [*N*-metil-¹⁴C]jeritromicina (Riley i Howbrook, 1997).

Novije inačice ove metode ne zahtijevaju postupak ekstrakcije, te se mogu izvoditi na pločicama s 96 jažica, što pogoduje primjeni ovih metoda u visokoprotočnim probirima. Te metode koriste scintilacijske brojače za kvantifikaciju. Tako su Delaporte i sur. (2001) razvili scintilacijski test u kojem se koristi ^{14}C -dekstrometorfan kao supstrat CYP2D6 enzima za mjerenje enzimske inhibicije. Ovaj pristup temelji se na ireverzibilnim kovalentnim interakcijama radioizotopom označenog formaldehida s polietileniminom kojim su obložena scintilacijska zrnca (slika 13.). Neposredna blizina obilježenog formaldehida i scintilanta rezultira emisijom svjetlosti te stvaranjem signala. Radioaktivni supstrat koji je prisutan u ispitivanoj otopini predaleko je od scintilanta da bi nastao bilo kakav signal (Delaporte i sur., 2001).



Slika 13. Vezanje ^{14}C -formaldehida na scintilacijska zrnca putem interakcije s polietileniminom. Zvezdica označava položaj ^{14}C biljega (Delaporte i sur., 2001).

Velika prednost radiometrije je mogućnost korištenja bilo kojeg supstrata (uključujući endogene spojeve) za procjenu enzimske aktivnosti (Moskaleva i Zgoda, 2013), a pored toga, radiometrijski testovi nude i nekoliko prednosti u odnosu na fluorimetrijske, uključujući selektivnost, bolju topljivost supstrata i veći broj obrtaja supstrata (Moody i sur., 1999).

Glavni nedostaci ovih metoda uključuju ekstenzivnu upotrebu radioaktivno obilježenih materijala, što je nepoželjno kako sa stajališta troškova, tako i s aspekta zbrinjavanja radioaktivnih tvari. Većina ih također zahtijeva ekstrakciju čvrstom fazom za odvajanje obilježenih metabolita od obilježenih početnih spojeva prije analize, što ih stoga čini neadekvatnim za probire visoke protočnosti.

Osim radioaktivnim ^{14}C , kao dijagnostički markeri za procjenu metabolizma lijekova sve više se koriste i ^{13}C stabilnim izotopom obilježeni spojevi (Leeder i sur., 2008). Sadržaj rezultirajućeg $^{13}\text{CO}_2$ u uzorcima daha moguće je odrediti plinskom kromatografijom pomoću masene spektralne analize (Kotake i sur., 1982) ili infracrvenom (IR) spektroskopijom uz selektivne interferencijske filtere (Desta i sur., 2009).

4.2. Usporedba najčešćih metoda za praćenje aktivnosti citokrom P450 enzima

U nastavku je dan sažeti prikaz najkorištenijih analitičkih metoda za ispitivanje enzimske aktivnosti humanih citokroma P450 (tablica 8.).

Tablica 8. Usporedba najkorištenijih analitičkih metoda za ispitivanje aktivnosti citokrom P450 enzima (Cali i sur., 2006; Fowler i Zhang, 2008; Ung i sur., 2018).

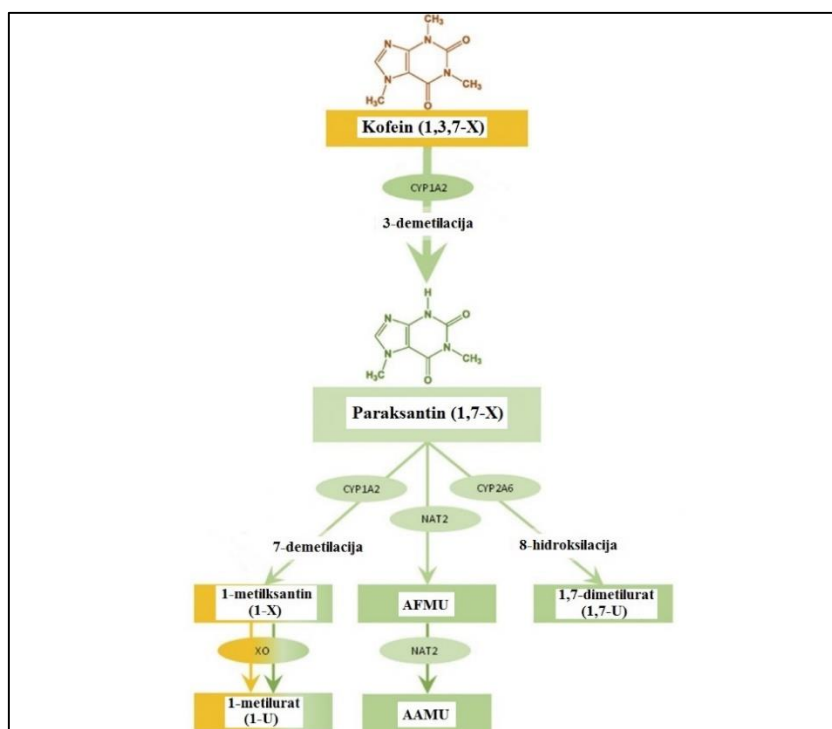
Metoda	HPLC-metode	Fluorimetrija	Luminometrija	Radiometrija
CYP supstrati	Neoptički	Fluorogeni	Derivati luciferina	Radioobilježeni
CYP produkti	Neoptički	Fluorescentni	<i>D</i> -luciferin	Radioobilježeni
Najčešća detekcija	MS, UV apsorpcija	Fluorometar	Luminometar	Scintilacijski brojač
Rekombinantni CYP enzimi	Da	Da	Da	Da
Jetreni mikrosomi	Da	Neke	Neke	Da
Intaktne stanice	Da	Nekoliko	Neke	Da
Identifikacija metabolita	Da	Ne	Ne	Neke
Osjetljivost	Visoka	Umjerena	Visoka	Visoka
Fluorescentna interferencija	Ne	Da	Ne	Ne
Protočnost	Niska do srednja	Visoka	Visoka	Niska do visoka
Komentar	Specifične i točne, moguć slobodan izbor supstrata. Međutim, potrebni su unutarnji standardi i značajna ulaganja u analitičku opremu.	Brza i jeftina. Laka minijaturizacija omogućuje visoku protočnost, ali problem su interferencije fluorescirajućih molekula ili molekula koje gase fluorescenciju.	Fleksibilna u izvoru enzima. Međutim, potrebni su reagensi za obradu i za gašenje (visok sadržaj SDS-a, što nije prikladno za sve uređaje za automatizirano pipetiranje).	Brza i točna, ali je često potrebna separacija na krutoj fazi ili scintilacijski brojač. Problem je velika količina korištenih radioobilježenih tvari, te njihovo odlaganje.

Kratice: HPLC, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; MS, masena spektrometrija; UV, ultraljubičasta; SDS, natrijev dodecil-sulfat.

4.3. Praćenje aktivnosti najvažnijih citokrom P450 enzima u metabolizmu lijekova

4.3.1. Praćenje aktivnosti enzima CYP1A2

Kofein (1,3,7-trimetilksantin), koji se metabolizira putem CYP1A2 (slika 14.), često je korišten za procjenu aktivnosti CYP1A2 *in vivo* (Tang i sur., 1991).



Slika 14. Glavni putovi i enzimi koji sudjeluju u razgradnji kofeina. Kratice: AAMU, 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil; AFMU, 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil; NAT2, *N*-acetiltransferaza 2; XO, ksantin oksidaza (preuzeto i prilagođeno iz Nehlig, 2018).

Mnogi metabolički omjeri korišteni su u fenotipizacijskim ispitivanjima, a smatra se da je najbolji urinarni metabolički omjer [5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU) + 1-metiluracil (1-U) + 1-metilksantin (1-X)]/[1,7-dimetilurat (1,7-U)], koji se naziva i kofeinskim metaboličkim omjerom (CMR) (Streetman i sur., 2000). CMR ne ovisi o bubrežnom protoku, a temelji se samo na krajnjim produktima metabolizma kofeina, što čini količinu i vrijeme sakupljanja mokraćnih uzoraka relativno nevažnim (Tang i sur., 1994). Mjerenje CMR-a u 24-

satnim uzorcima urina pokazalo se održivom metodom za procjenu CYP1A2 u populacijama sa širokom upotrebom kofeina, pa je tako CMR korišten za *in vivo* procjenu aktivnosti CYP1A2 u istraživanju odnosa između enzimske aktivnosti, razina malondialdehida i mamografske gustoće.

Mamografski gusto tkivo dojke snažan je prediktor rizika od raka dojke, a na njega utječu i mitogeni i mutageni. Enzim CYP1A2, koji je uglavnom odgovoran za metabolizam 17 β -estradiola, može utjecati kako na mitogene, tako i na mutagene karakteristike estrogena.

Metaboliti kofeina u mokraći izmjereni su HPLC metodom (Tang i sur., 1991) uz detekciju ultraljubičastom apsorbcijom na 280 nm. Urinarni AFMU prvo je deformiliran do stabilnog AAMU-a, a zatim detektiran ultraljubičastom apsorbcijom na 263 nm. Rezultati istraživanja sugeriraju da je aktivnost CYP1A2 povezana s razinom mamografske gustoće i oksidativnim stresom, ali da priroda odnosa ovisi o statusu menopauze. Tako je aktivnost CYP1A2 pozitivno korelirana s mamografskom gustoćom kod žena u postmenopauzi, što upućuje na to da je povećana aktivnost CYP1A2 nakon menopauze faktor rizika za razvoj raka dojke (Hong i sur., 2004).

Fontana i sur. (2008) istražili su potencijalnu korisnost kofeinskih testova aktivnosti enzima CYP1A2 u predviđanju farmakokinetike takrina, reverzibilnog inhibitora kolinesteraze, kod bolesnika s Alzheimerovom bolešću. Svakom je pacijentu oralno primijenjeno 2 mg/kg [¹³C-3-metil]kofeina te su mu uzeti uzorci daha i mokraće.

Za kofeinski izdisajni test (CBT), uzorci izdahnutog zraka prikupljeni su u vremenu 0 - 120 minuta nakon primjene kofeina. Sadržaj ¹³CO₂ u uzorcima daha određen je plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Upotrijebljena je usporedba sa standardnim uzorcima referentnog plina (Kotake i sur., 1982), te je izmjereni ¹³C/¹²C omjer u svakom uzorku iskorišten za izračunavanje opsega demetilacije. Rezultati su zabilježeni kao % primijenjene ¹³C doze izdahnut tijekom 2 sata.

Za određivanje paraksantin/kofein omjera (PCUR) korišteni su uzorci urina prikupljeni od 4 do 6 sati nakon ingestije kofeina (Butler i sur., 1992). Ti su uzorci analizirani na koncentracije 1,7-dimetilksantina (1,7-X), 1,7-dimetilurata (1,7-U) i 1,3,7-trimetilksantina, tj. kofeina (1,3,7-X) pomoću HPLC-a, a zatim se temeljem dobivenih podataka izračunao (1,7-X + 1,7-U)/(1,3,7-X) kao mjera aktivnosti CYP1A2.

Za kofeinski metabolički omjer (CMR) analizirani su uzorci urina prikupljeni od 12 do 24 sata nakon ingestije kofeina, kako bi se utvrdile koncentracije potrebnih metabolita (Tang i sur.,

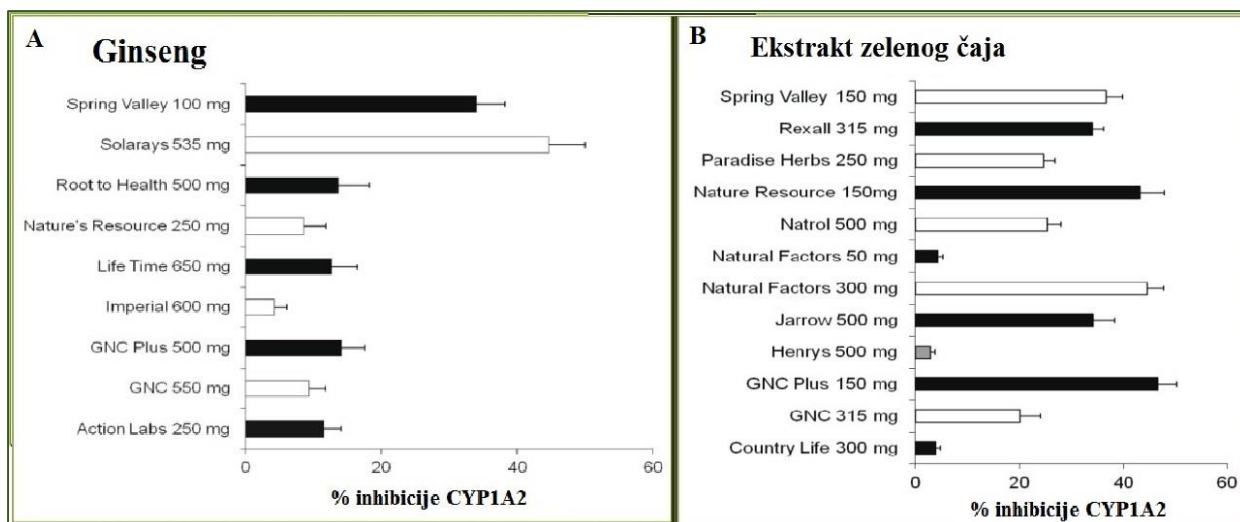
1994). Ksantin i urati su ekstrahirani organskim otapalom iz zakiseljene mokraće, a zatim su određeni HPLC-om, dok je AFMU pretvoren u AAMU 10-minutnim izlaganjem natrijevom hidroksidu pri pH 10. Ukupni acetilirani metabolit u mokraći u obliku AAMU određen je kromatografijom temeljenom na veličini.

Oralni klirens takrina, koji je među pacijentima varirao do 15 puta, značajno je korelirao s dvosatnom ukupnom proizvodnjom $^{13}\text{CO}_2$ u dahu ($r = 0,56$) i s dva često korištena omjera urinarnih metabolita kofeina, tj. s omjerom paraksantin/kofein ($r = 0,76$) i s kofeinskim metaboličkim omjerom ($r = 0,76$). Ova opažanja podržavaju ograničavajuću ulogu CYP1A2 u *in vivo* eliminaciji lijeka i potencijal za interakcije lijekova kada se pacijentima istodobno s takrinom daju poznati induktori ili inhibitori ovog enzima (Fontana i sur., 2008).

Biljni dodatci prehrani nisu regulirani istim propisima kao receptni lijekovi, pa se pretpostavlja da se sadržaj njihovih aktivnih sastojaka može uvelike razlikovati među različitim proizvođačima, što može dovesti do promjenjivih terapijskih ishoda ukoliko biljni preparati stupaju u interakcije s lijekovima supstratima CYP enzima. CYP1A2 sudjeluje u aktivaciji mnogih karcinogena, pa promjena njegove aktivnosti može biti mehanizam povezan sa zaštitnim učinkom biljnih proizvoda. Tako je aktivnost humanog CYP1A2 korištena za utvrđivanje učinka biljnih dodataka ginsenga i ekstrakta zelenog čaja različitih proizvođača.

Sadržaj dodataka ekstrahiran je metanolom, te je ispitana inhibicija metabolizma marker supstrata CYP1A2 uporabom *in vitro* metode s jetrenim mikrosomima. 7-etoksirezorufin korišten je kao specifični marker supstrat, a stvaranje njegovog metabolita (rezorufina) u reakciji posredovanoj CYP1A2 analizirano je reverzno-faznom HPLC metodom (Hanioka i sur., 2000) s fluorescencijskom detekcijom.

Rezultati su prikazani na slici (slika 15.), a može se uočiti da inhibicijski učinak devet testiranih proizvoda od ginsenga varira od 4,2 % do 44,6 %, dok je variranje učinka za dvanaest proizvoda s ekstraktom zelenog čaja još veće (2,9 % - 46,6 %). Nije bilo značajne korelacije između postotka inhibicije CYP1A2 i sadržaja ginsenga ($r = -0,234$) ili ekstrakta zelenog čaja ($r = -0,191$).



Slika 15. Učinci različitih dodataka prehrani koji sadrže (A) ginseng i (B) ekstrakt zelenog čaja na aktivnost humanog CYP1A2. Svaki stupac predstavlja prosječni (i SD) % inhibicije iz 4 različita mjerenja (Wanwimolruk i Prachayasittikul, 2012).

Dobiveni rezultati pokazuju da postoje velike varijacije inhibicijskog učinka pojedinih biljnih dodataka prehrani na humani CYP1A2, a razlog tome mogu biti razlike u sadržaju aktivnih sastojaka biljnih proizvoda, što dovodi u pitanje kvalitetu dodataka prehrani koje mnogi pacijenti uzimaju pretpostavljajući da su oni sigurni. Nedostatak inhibitornog učinka ginsenga na aktivnost CYP1A2 ukazuje da ne postoje klinički značajne interakcije s lijekovima. Međutim, ne može se isključiti mogućnost da istodobna primjena dodataka ekstrakta zelenog čaja s lijekovima koje metabolizira CYP1A2 prouzroči povećanje njihove koncentracije. Suprotno tome, moguća *in vivo* inhibicija CYP1A2 ekstraktom zelenog čaja mogla bi pružiti zaštitu protiv raka uzrokovanog metaboličkom aktivacijom CYP1A2 (Wanwimolruk i Prachayasittikul, 2012).

Gao i sur. (2014) istražili su može li baicalin (5,6,7-trihidroksiflavon-7- β -D-glukuronid), koji je glavni aktivni sastojak *Scutellariae radix*, korijena vrste *Scutellaria baicalensis* Georgi, inhibirati CYP1A2 u mikrosomima ljudske jetre (HLM) te mogu li polimorfizmi gena utjecati na interindividualne varijacije IC₅₀. Izmjeren je IC₅₀ baikalina za svaki uzorak, te su genotipizirani uobičajeni polimorfizmi CYP1A2 (-3860G>A i -163C>A). Aktivnost CYP1A2 procijenjena je stvaranjem paracetamola iz marker supstrata fenacetina pomoću HPLC metode s UV detekcijom na 257 nm.

Rezultati pokazuju da je baikalin inhibitor CYP1A2 u HLM-u, i da može dovesti do velikih interindividualnih varijacija aktivnosti (od 3 do 10 puta), koje nemaju veze s ispitivanim polimorfizmom gena. Stoga je potrebno obratiti više pozornosti na farmakokinetičke interakcije izazvane baikalinom, posebno zbog činjenice da se kao bioaktivni sastojak koristi u oko 100 vrsta tradicionalnih kineskih lijekova (Gao i sur., 2014).

Konzumacija kave poznati je induktor aktivnosti enzima CYP1A2. Primijećeno je da skupina bolesnika s dijabetesom tipa 2 svakodnevno konzumira više kofeina (kave) od kontrole, pa je provedeno istraživanje čiji je cilj bio utvrditi mogu li ispitanici koji boluju od dijabetesa tipa 2 metabolizirati kofein brže od kontrolnih ispitanika koji ne boluju od dijabetesa tipa 2.

Sistemska klirens kofeina smatra se zlatnim standardom u procjeni aktivnosti CYP1A2 zato što odražava kombinirane učinke genetskih, okolišnih i endogenih čimbenika. Međutim, prikupljanje podataka zahtijeva opsežno uzimanje krvi, što je skupo, invazivno i dugotrajno. Stoga je potvrđena alternativa određivanje koncentracijskog omjera paraksantina i kofeina u uzorku sline prikupljenom 6 sati nakon doziranja kofeina.

U svom su istraživanju Urry i sur. (2016) procijenili aktivnost CYP1A2 kvantifikacijom omjera paraksantina i kofeina u slini ispitanika koji su prethodno genotipizirani za funkcionalni -163C>A polimorfizam *CYP1A2* gena. Uz primjenu unutarnjeg standarda (hidroksietilteofilina) provedena je HPLC analiza s UV detekcijom na 273 nm (Fuhr i Rost, 1994).

U skupini s dijabetesom pronađen je veći udio sudionika s visoko inducibilnim CYP1A2 genotipom. Nadalje, omjer paraksantina i kofeina, vremenski korigiran radi smanjenja utjecaja različitih vremena uzorkovanja sline u odnosu na zadnji unos kofeina, bio je veći nego u kontrolnoj skupini. Sudionici koji su prijavili da uobičajeno konzumiraju više kofeina od prosjeka populacije pokazali su veću aktivnost CYP1A2 od sudionika s ispodprosječnom konzumacijom kofeina (Urry i sur., 2016).

4.3.2. Praćenje aktivnosti enzima CYP2C9 i enzima CYP2C19

Standardnim fenotipskim markerom CYP2C9 smatra se tolbutamid. Istraživanja su pokazala da omjer metabolita tolbutamida u urinu u odnosu na lijek, posebno u intervalu sakupljanja od 6 do 12 sati (MR₆₋₁₂), značajno predviđa oralni klirens u zdravih dobrovoljaca (Veronese i sur., 1990). Međutim, niske koncentracije tolbutamida u mokraći u odnosu na metabolite ograničavaju prediktivnu sposobnost MR₆₋₁₂ kao fenotipske mjere CYP2C9. Stoga su često korišteni i flurbiprofen te losartan, koji su prošli preliminarnu procjenu kao potencijalni fenotipski markeri CYP2C9, a mjerenja metabolizma za oba spoja također su učinkovito predvidjela aktivnost CYP2C9 *in vivo*.

U svrhu njihove usporedbe, procijenjena je metabolička aktivnost CYP2C9 u 16 ispitanika koji su eksprimirali četiri različita genotipa (CYP2C9*1/*1, *1/*2, *1/*3 i *2/*2). Primijenjene su pojedinačne oralne doze tolbutamida, flurbiprofena i losartana, te su tijekom 24 sata sakupljani plazma i urin. Koncentracije losartana i metabolita (karboksilne kiseline) u plazmi i mokraći određene su HPLC-om uz detekciju fluorescencijom (Williamson i sur., 1998). Koncentracije flurbiprofena i 4'-hidroksiflurbiprofena u plazmi i urinu također su utvrđene HPLC metodom s fluorescencijskom detekcijom (Hutzler i sur., 2000), dok su koncentracije tolbutamida u plazmi te tolbutamida, 4'-hidroksitolbutamida i karboksitolbutamida u urinu određene HPLC metodom s ultraljubičastom detekcijom (Hansen i sur., 1999).

Klirens tolbutamida, posredovan enzimom CYP2C9, pokazao je jaču povezanost s genotipom u usporedbi s flurbiprofenom i losartanom ($r^2 = 0,64, 0,53, \text{ odnosno } 0,42$). Primijećena je statistički značajna korelacija između formacijskog klirensa tolbutamida i 12-satne količine 4'-hidroksitolbutamida i karboksitolbutamida ($r = 0,84$). U usporedbi s tolbutamidom, uočene korelacije između odgovarajućih metaboličkih mjera flurbiprofena i losartana nisu bile tako snažne, pa se zaključilo da je tolbutamid bolji CYP2C9 marker od flurbiprofena i losartana, a 12-satna količina 4'-hidroksitolbutamida i karboksitolbutamida najbolja je mjera njegovog metabolizma (Lee i sur., 2003).

Vogl i sur. (2015) proučili su veliku skupinu zdravih mladih odraslih ispitanika ($n = 283$), na kojoj je utvrđivali korelaciju CYP2C9 genotipa s jednostavnim fenotipizacijskim mjerenjem uz korištenje nesteroidnog protuupalnog lijeka flurbiprofena kao specifičnog marker supstrata. Interindividualne razlike u metabolizmu lijeka unutar jednog genotipa trebale bi biti manje od

razlika između različitih genotipova kako bi pacijenti imali koristi od genotipizacije za polimorfne enzime.

Kao fenotipizacijska mjera poslužio je urinarni metabolički omjer (koncentracija CYP2C9 ovisnog metabolita podijeljena s koncentracijom flurbiprofena). Zahvaljujući razvoju nove, osjetljive LC-MS/MS analitičke metode omogućeno je smanjenje doze flurbiprofena s 50 mg na 8,75 mg. Budući da bi relativni ishod fenotipizacije trebao biti neovisan o doziranju (sve dok doza ne prelazi linearni raspon krivulje doza-odgovor za CYP2C9), smanjenje doze flurbiprofena trebalo bi imati prvenstveno blagotvorne učinke na sigurnost metode fenotipizacije. Kako bi se omogućilo potpuno cijepanje glukuronida uz minimalno razrjeđivanje uzorka, razvijena je i nova metoda hidrolize. Umjesto ekstrakcije analita nakon cijepanja glukuronida, obrađenom urinu dodani su deuterirani unutarnji standardi te se uzorak izravno podvrgnuo analizi (tablica 9.).

Tablica 9. Specifični parametri LC-MS/MS analize za flurbiprofen, 4'-hidroksiflurbiprofen i odgovarajuće deuterirane unutarnje standarde (Vogl i sur., 2015).

Sastavnica	Prijelaz (<i>m/z</i>)	Vrijeme zadržavanja (min)
Flurbiprofen	243 → 199	8,1
4'-Hidroksiflurbiprofen	259 → 215	7,7
Flurbiprofen-D ₃	246 → 202	8,1
4'-Hidroksiflurbiprofen-D ₃	262 → 218	7,7

Linearni statistički modeli koji koreliraju genotip i fenotip pružili su značajne alel-specifične procjene MR-a od 0,596 za alel divljeg tipa *CYP2C9*1*, 0,405 za *CYP2C9*2* (68 % divljeg tipa) i 0,113 za *CYP2C9*3* (19 % divljeg tip). Ako bi se ove procjene koristile za prilagodbu doze flurbiprofena, uzimajući 100 % za genotip **1/*1*, prosječno smanjenje na 84 %, 60 %, 68 %, 43 % i 19 % rezultiralo bi za genotipove **1/*2*, **1/*3*, **2/*2*, **2/*3*, odnosno **3/*3*. Zbog velikih individualnih varijacija unutar genotipova, dobiveni podatci dovode u pitanje korisnost individualnog doziranja lijeka, ako se ono temelji isključivo na genotipu (Vogl i sur., 2015).

Iako polimorfizmi rezultiraju smanjenjem aktivnosti pojedinih enzimskih molekula, Flora i Tracy (2012) ispitali su pretpostavku da smanjenje ukupnog broja aktivnih molekula enzima u *in vitro* sustavu (*CYP2C9*1/*1*, HLM) za ekvivalentan postotak može stvoriti istu neto promjenu ukupnog metaboličkog kapaciteta. U tu je svrhu korištena tijenilinska kiselina za nepovratno smanjenje ukupne aktivnosti CYP2C9 u mikrosomima ljudske jetre. Tijenilinska kiselina, derivat tiofena, je urikozurik povučen s tržišta nakon što je doveo do rijetkih slučajeva

imunoalergijskog hepatitisa (Homberg i sur., 1984). Smatra se suicidalnim supstratom CYP2C9 jer se putem tog enzima oksidira u reaktivni tiofen-sulfoksid, koji se kovalentno veže na CYP2C9, što rezultira inaktivacijom enzima. Aktivnost CYP2C9 analizirana je kako je sažeto u tablici (tablica 10.).

Tablica 10. Inkubacijski uvjeti i analitički parametri za ispitivanje CYP2C9 metabolizma (preuzeto i prilagođeno iz Tracy i sur., 2002).

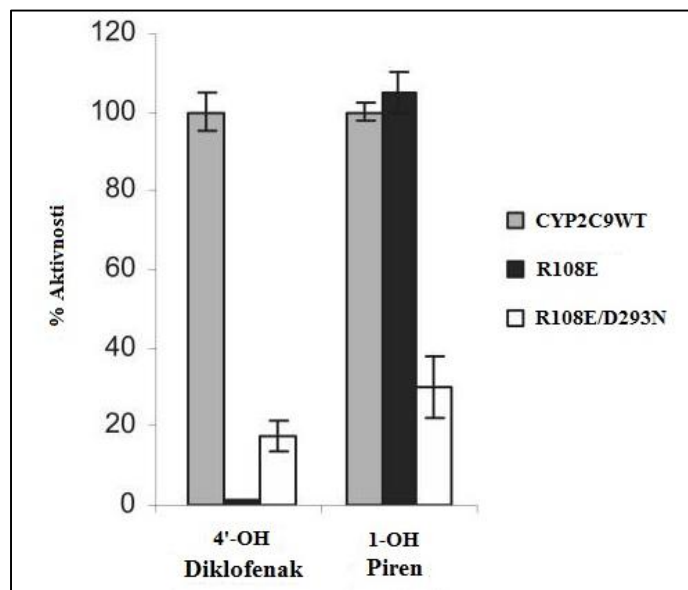
CYP2C9			
Supstrat	flurbiprofen	Analitički parametri	
Metabolit	4'-hidroksiflurbiprofen	Injekcijski volumen	30 μ L
Unutarnji standard	2-fluoro-4-bifeniloctena kiselina	Kolona	Brownlee Spheri-5 C ₁₈ , 4.6 \times 100 mm
Inkubacijski uvjeti		Mobilna faza A	90 % 5 mM kalijevog fosfata (pH 3) / 10 % acetonitrila
Koncentracije supstrata	2–300 μ M	Mobilna faza B	acetonitril
Vrijeme inkubacije	20 min	Brzina protoka	1 mL/min
Otapalo za gašenje	90 % acetonitrila / 10 % fosforne kiseline, 100 μ L	Program	izokratno, 33 % B
		λ ekscitacija / λ emisija	260/320 nm
		Vrijeme zadržavanja	2,5 min

Učinkovitom titracijom koncentracije tijenilinske kiseline dobiveni su mikrosomski pripravci s 43 i 73 % manje aktivnosti, oponašajući tako *CYP2C9*1/*3* i *CYP2C9*3/*3* genotipove. Ovakva demonstracija pruža potencijalno vrijedan alat za istraživanja metabolizma supstrata, utvrđivanje sposobnosti kompenzacije smanjene aktivnosti CYP2C9 drugim metaboličkim enzimima, te predviđanje opsega interakcija lijekova ovisnih o genotipu, što je posebno važno zato što se farmakološke terapije sve više individualno prilagođavaju pacijentima (Flora i Tracy, 2012).

Zajednička značajka mnogih liganada CYP2C9 je njihova slaba kiselost. Kao što je otkriveno kristalografijom, strukturna osnova za takvo ponašanje uključuje ionske interakcije između anionske skupine supstrata i R108 ostatka u aktivnom mjestu enzima. Tai i sur. (2008) pokušali su redizajnirati CYP2C9, radi boljeg prihvaćanja bazičnih liganada, inverzijom naboja na spomenutom ključnom ostatku uz dodatnu neutralizaciju nabijenih aminokiselina u aktivnom mjestu. U stanicama insekata su eksprimirani, te zatim pročišćeni R108E i R108E/D293N mutanti, nakon čega je uspoređena njihova sposobnost metaboliziranja diklofenaka i pirena s onom divljeg tipa CYP2C9.

Brzina stvaranja 4'-hidroksidiklofenaka u rekonstituiranoj enzimskoj smjesi određena je pomoću HPLC-UV-a, dok je stvaranje 1-hidroksipirena određeno HPLC-om uz upotrebu fluorimetrijske detekcije (Dickmann i sur., 2004).

Mutant R108E zadržao je svu aktivnost nativnog enzima prema 1-hidroksilaciji pirena, ali je katalitička aktivnost prema diklofenaku izostala. Suprotno tome, dvostruki mutant pokazao je mnogo manje selektivnosti u svom ponašanju prema ovim kontrolnim ligandima (slika 16.).



Slika 16. Katalitička aktivnost CYP2C9, te R108E i R108E/D293N mutanata prema diklofenaku i pirenu (preuzeto i prilagođeno iz Tai i sur., 2008).

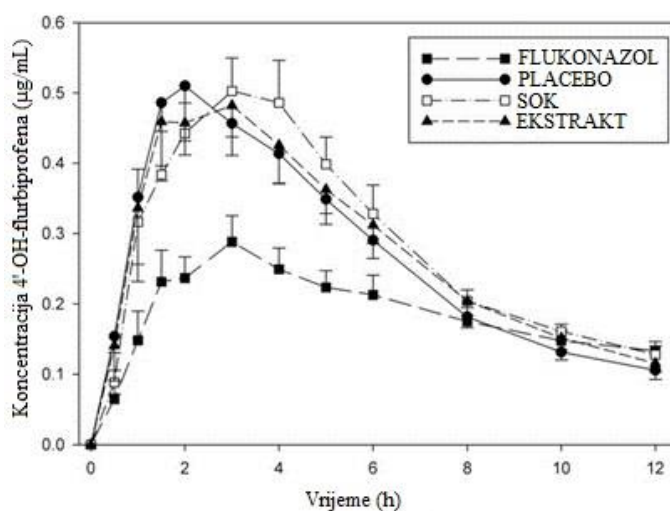
Pokušaj redizajniranja ligandne selektivnosti CYP2C9 inverzijom naboja na ključnom ostatku pružio je slabe rezultate, što govori o složenoj i vjerojatno interaktivnoj prirodi aktivnih mjesta P450 sisavaca, te sugerira da uspješan reinženjering supstratne specifičnosti P450 neće biti trivijalan postupak (Tai i sur., 2008).

U *in vitro* procjeni mogućnosti interakcije lijekova sa sokom od borovnice, koji se široko koristi u Sjevernoj Americi i Europi, Hanley i sur. (2013) su kao marker supstrat za CYP2C9 koristili flurbiprofen. Upotrijebljena je smjesa soka niskogrmolike (*Vaccinium angustifolium* Aiton) i visokogrmolike (*Vaccinium corymbosum* L.) borovnice (50:50), te je pomoću mikrosoma ljudske jetre procijenjena inhibicija aktivnosti CYP2C9.

Brzina transformacije marker supstrata određena je u kontrolnim uvjetima (bez inhibitora) i uz različite koncentracije soka. Kao pozitivna kontrola inhibicije korišten je azolni antimikotik flukonazol, a uzorci su analizirani HPLC metodom s ultraljubičastom detekcijom.

Sok od borovnice inhibirao je aktivnost CYP2C9 *in vitro* manje od 2 %, bez dokaza o ireverzibilnoj, na mehanizmu utemeljenoj inhibiciji. Stoga ovo istraživanje ne pruža dokaze koji upućuju na klinički značajne farmakokinetičke interakcije (Hanley i sur., 2013).

Identične markere i pozitivnu kontrolu inhibicije Hanley i sur. (2013) prethodno su koristili u *in vivo* ispitivanju inhibicijskog učinka soka od nara i kapsule koja sadrži 1 gram ekstrakta nara. Koncentracije marker supstrata flurbiprofena i njegova metabolita 4'-OH-flurbiprofena u prikupljenim uzorcima plazme određene su HPLC-om s fluorescencijskom detekcijom. Srednje vrijednosti plazmatske koncentracije 4'-OH-flurbiprofena u svakom od četiri različita ispitivanja prikazane su na slici (slika 17.). Koncentracije su bile slične u slučaju ispitanika koji su uzimali placebo, sok od nara ili ekstrakt nara, ali su smanjene istovremenom primjenom flukonazola.



Slika 17. Prosječne (\pm SEM, n=12) plazmatske koncentracije 4'-OH-flurbiprofena u određenim vremenskim točkama u svakom od 4 različita tretmana (Hanley i sur., 2012).

Rezultati pokazuju da farmakokinetika flurbiprofena u kliničkim ispitivanjima nije promijenjena sokom ili ekstraktom nara u usporedbi s kontrolnim placebo pićem s niskim sadržajem polifenola. Stoga, unatoč prethodno utvrđenoj inhibiciji CYP2C9 *in vitro*, pacijenti

koji uzimaju lijekove supstrate CYP2C9 mogu konzumirati antioksidansima bogate proizvode dobivene od nara sa zanemarivim rizikom od farmakokinetičke interakcije (Hanley i sur., 2012).

Još jednu razliku u odnosu na *in vitro* rezultate primijetili su Greenblatt i sur. (2006), koji su, nakon zabilježenih nevalidiranih izvješća o slučajevima koji su sugerirali pojačavanje antikoagulacijskog učinka varfarina sokom od brusnice zbog inhibicije CYP2C9, procijenili učinak placebo soka od brusnice, soka od brusnice, soka od grožđa, kuhanog čaja brusnice i inhibitora sulfafenazola na aktivnost CYP2C9 u mikrosomima ljudske jetre i kod 14 dobrovoljaca. Iako su sok od grožđa i čaj oslabili aktivnost CYP2C9 *in vitro*, niti jedno od tri pića nije promijenilo klirens flurbiprofena posredovan CYP2C9 enzimom kod ljudi.

Općenito, prediktivni modeli imaju manje preciznosti za inhibitore koji su visoko lipofilni, u velikoj se mjeri vežu na proteine ili podliježu djelovanju transportnih proteina. Još je teže protumačiti *in vitro* podatke o metaboličkoj inhibiciji prirodnim tvarima, uključujući sastojke hrane, kao što su primjerice flavonoidi, koji su u prirodi pretežno prisutni kao glikozidi. Uklanjanje šećera i naknadna glukuronidacija, koji se mogu dogoditi putem enteričkih bakterija ili metabolizma u crijevnoj sluznici, smanjuju prediktivnu učinkovitost *in vitro* modela (Greenblatt i sur., 2006).

Varfarin, iako se može koristiti kao marker CYP2C9 u farmakokinetičkim ispitivanjima, nije pogodan marker zbog vremena polueliminacije od približno 36 sati, što zahtijeva dugo trajanje uzorkovanja u jednodoznim kinetičkim ispitivanjima, a postoje i neizbježne nuspojave obzirom na njegov antikoagulacijski učinak. S druge strane, učinci njegovih metabolita iz reakcija kataliziranih CYP enzimima ukazuju na sposobnost kompetitivne inhibicije CYP2C9.

Jones i sur. (2010) testirali su pretpostavku da hidroksivarfarini, primarni metaboliti varfarina, inhibiraju hidroksilaciju varfarina kataliziranu CYP2C9 enzimom. Budući da se pacijentima dozira racemični varfarin te nastaju smjese hidroksivarfarina, istražena je sposobnost blokiranja aktivnosti CYP2C9 prema *S*-varfarinu za svih pet racemičnih hidroksivarfarina (6-, 7-, 8-, 10- i 4'-hidroksivarfarin).

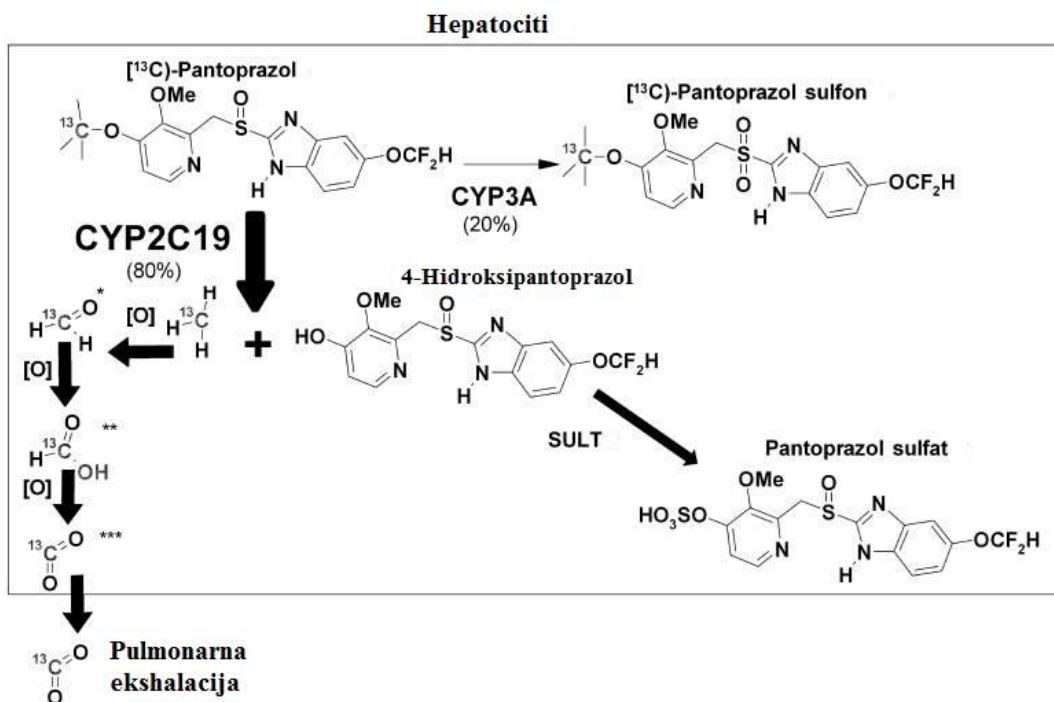
U usporedbi sa supstratom, CYP2C9 vezao je svoje hidroksivarfarinske produkte s manje afiniteta, ali je zadržao visoki afinitet za 10- i 4'-hidroksivarfarine, produkte reakcija CYP3A4. Daljnja inhibicijska ispitivanja ravnotežnog stanja *S*-varfarina s rekombinantnim CYP2C9 i mikrosomima ljudske jetre potvrdila su da hidroksivarfarinski produkti imaju sposobnost kompetitivne inhibicije CYP2C9 s biološki relevantnim inhibicijskim konstantama. Inhibicija

CYP2C9 7-hidroksivarfarinom može biti značajna obzirom na njegovu zastupljenost u ljudskoj plazmi, unatoč slabom afinitetu za enzim. 10-hidroksivarfarin, koji je zabilježen kao drugi najzastupljeniji metabolit u plazmi, bio je naj snažniji inhibitor CYP2C9 (Jones i sur., 2010).

Glavna svrha istraživanja Deste i sur. (2009) bila je utvrditi može li se stabilni [¹³C]pantoprazol *O*-demetilirati putem CYP2C19, te može li nastali i izdahnuti ¹³CO₂ (slika 18.) poslužiti kao siguran, brz i neinvazivan fenotipizacijski marker aktivnosti CYP2C19 *in vivo*. Pantoprazol je odabran za ispitivanje zbog njegove raširene kliničke primjene, široke sigurnosne granice, opsežnog metabolizma u jetri i povoljne strukturne značajke za obilježavanje stabilnim ¹³C izotopom.

[¹³C]pantoprazol izdisajni test iskoristio je upotrebu ¹³C biljega ugrađenog na 4-*O*-metilno mjesto pantoprazola, koje je specifično dizajnirano za *O*-demetilaciju posredovanu hepatskim CYP2C19. Budući da se izotopom neobilježeni pantoprazol uglavnom odstranjuje *O*-demetilacijom posredovanom CYP2C19 (Tanaka i sur., 1997), pretpostavljeno je da se [¹³C]pantoprazol *O*-demetilira istim enzimom, što rezultira postupnim oslobađanjem ¹³CO₂ i konačnim uklanjanjem iz tijela pulmonarnom ekshalacijom (slika 18.). Stoga bi kvantifikacija tako izdahnutog ¹³CO₂ poslužila kao mjera *in vivo* aktivnosti hepatskog CYP2C19.

Zdravim dobrovoljcima koji su genotipizirani za alele *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* i *CYP2C19*17* dana je pojedinačna oralna doza [¹³C]pantoprazol-natrij seskvihidrata s natrijevim bikarbonatom, koji se istodobno primjenjuje kako bi alkalizirao pH i olakšao apsorpciju sprječavanjem razgradnje labilnog pantoprazola u kiselom mediju.



Slika 18. Predloženi metabolizam [¹³C]pantoprazola kod ljudi i stvaranje ¹³CO₂ u izdahu (*formaldehid; **mravlja kiselina; ***ugljični dioksid) (preuzeto i prilagođeno iz Desta i sur., 2009).

Izdahnuti ¹³CO₂ i ¹²CO₂ izmjereni su IR spektroskopijom, uz interferencijske filtere koji selektivno odabiru valnu duljinu za apsorpciju ¹³CO₂ i ¹²CO₂, prije (početno stanje) i nakon doziranja. Omjer ¹³CO₂/¹²CO₂ nakon uzimanja [¹³C]pantoprazola u odnosu na ¹³CO₂/¹²CO₂ na početnoj razini izražen je kao razlika u odnosu na početnu vrijednost (DOB).

Određene DOB vrijednosti značajno su se razlikovale među tri genotipske skupine predviđenih ekstenzivnih (EM), intermedijarnih (IM) i sporih (PM) CYP2C19 metabolizatora. Linearna regresijska analiza ukazala je na odnos gena i učinka doze (r^2 u rasponu 0,236 - 0,522), dok je plazmatska ekspozicija [¹³C]pantoprazola pokazala značajno negativnu korelaciju s indeksima izdisajnog testa kod dotičnih ispitanika ($r = -0,74$). Dobiveni podatci sugeriraju da je ovaj izdisajni test pouzdan, brz i neinvazivan marker CYP2C19, kao i potencijalno koristan alat za optimizaciju terapije lijekovima metaboliziranim putem CYP2C19 (Desta i sur., 2009).

Kako je pokazano da (+)-[¹³C]pantoprazol više ovisi o metaboličkom statusu CYP2C19 od (-)-[¹³C]pantoprazola, Thacker i sur. (2013) su testirali hipotezu da je brzina *O*-demetilacije (+)-[¹³C]pantoprazola, izmjerena izdahnutim ¹³CO₂, brz marker aktivnosti hepatičnog CYP2C19 *in*

vivo kod ljudi, te da je osjetljiviji i selektivniji marker za procjenu aktivnosti CYP2C19 od racemične smjese.

Tablica 11. Usporedba parametara izdisajnog testa dobivenih nakon primjene (\pm)-[^{13}C] pantoprazola iz istraživanja Deste i suradnika (Desta i sur., 2009) s onima dobivenim s (+)-[^{13}C]pantoprazolom (Thacker i sur., 2013).

Supstrat	Ispitanici	DOB ₃₀ *	AUC _{DOB(0-120)} *
(\pm)-[^{13}C]pantoprazol	EM ($n = 10$)	4,3 (3,2 - 5,5)	6,4 (5,0 - 7,7)
(+)-[^{13}C]pantoprazol	EM ($n = 5$)	7,1 (4,8 - 9,5)	10,4 (7,4 - 13,4)
(\pm)-[^{13}C]pantoprazol	IM ($n = 10$)	3,3 (2,6 - 3,9)	5,3 (4,2 - 6,3)
(+)-[^{13}C]pantoprazol	IM ($n = 6$)	5,3 (3,7 - 6,9)	8,2 (5,8 - 10,6)
(\pm)-[^{13}C]pantoprazol	PM ($n = 4$)	0,7 (0,6 - 0,8)	1,0 (0,8 - 1,3)
(+)-[^{13}C]pantoprazol	PM ($n = 3$)	0,5 (0,0 - 1,0)	1,5 (0,9 - 2,1)

*Prosječne vrijednosti (\pm 95 %-tni interval pouzdanosti). Kratice: DOB₃₀, razlika u odnosu na početnu vrijednost 30 minuta nakon primjene markera; AUC_{DOB(0-120)}, površina ispod krivulje ovisnosti DOB o vremenu (0-120 min); PM, spori metabolizator; IM, intermedijarni metabolizator; EM, ekstenzivni metabolizator CYP2C19.

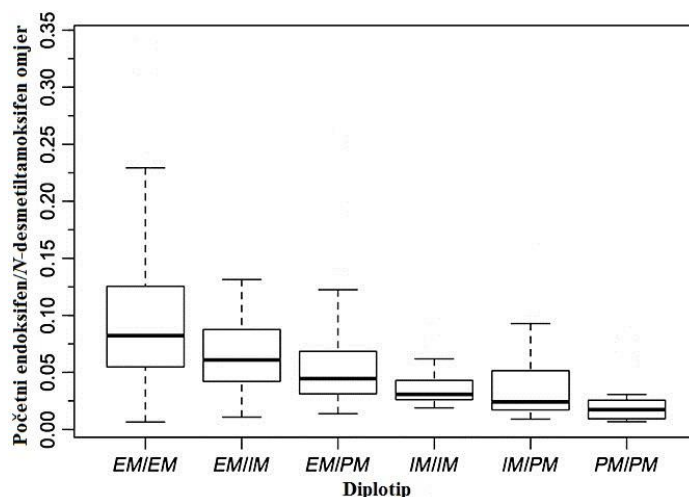
Podatci potvrđuju da metabolizam (+)-[^{13}C]pantoprazola u velikoj mjeri ovisi o metaboličkom statusu CYP2C19, ali provedeni izdisajni test nije superioran u odnosu na racemični [^{13}C]pantoprazol u procjeni aktivnosti CYP2C19 *in vivo* jer nije razlikovao EM od IM CYP2C19 (tablica 11.). Racemični [^{13}C]pantoprazol, koji se relativno lako sintetizira i stabilniji je od (+)-[^{13}C]pantoprazola, prikladan je kao dijagnostički marker ovog enzima (Thacker i sur., 2013).

4.3.3. Praćenje aktivnosti enzima CYP2D6

Aktivnost CYP2D6 enzima značajno se razlikuje među pojedincima, što se barem djelomično može pripisati genskoj varijaciji *CYP2D6*, koji je visoko polimorfan, s više od stotinu alelnih varijanti i genskih multiplikacija, delecija i drugih strukturnih varijanti. Aktivnost ili fenotip CYP2D6 enzima mogu se koristiti za individualiziranje doziranja određenih lijekova. Međutim, opsežna heterogenost *CYP2D6* komplicira predviđanje fenotipa.

Hertz i sur. (2015) su istražili je li moguće poboljšati predviđanje fenotipa aktivnosti CYP2D6 iz podataka o genotipu reklasifikacijom diplotipova ili alela. U tu svrhu, pacijentima genotipiziranim za *CYP2D6* izmjerene su koncentracije metabolita tamoksifena. Metabolički omjer endoksifen/*N*-desmetiltamoksifen, kao mjera aktivnosti CYP2D6, uspoređivan je između četiri diplotipa (*EM/IM*, *EM/PM*, *IM/IM*, *IM/PM*) koji obično spadaju u fenotip srednje brzog metabolizatora (IM).

Ravnotežne koncentracije tamoksifena u plazmi (*Z*-izomer), (*Z*)-4-hidroksitamoksifena, (*Z*)-*N*-desmetiltamoksifena i 4-hidroksi-*N*-desmetiltamoksifena (endoksifen; 10 % (*E*), 90 % (*Z*)) izmjerene su pomoću HPLC-MS/MS metode razvijene korištenjem difenhidramina kao unutarnjeg standarda nakon ekstrakcije inkubacijskih smjesa.



Slika 19. Početni endoksifen/*N*-desmetiltamoksifen omjer prema diplotipu CYP2D6. Unutar IM fenotipa, pacijenti s najvišom (*EM/IM*) i najnižom (*IM/PM*) aktivnošću diplofenotipova razlikovali su se od bolesnika s EM (*EM/EM*), odnosno PM (*PM/PM*) aktivnošću (Hertz i sur., 2015).

Svaki od četiri IM diplotipa ima različitu aktivnost CYP2D6 međusobno i od fenotipskih skupina EM i PM (slika 19.). Postavljajući aktivnost *EM* alela na 1,0, relativne aktivnosti *UM*, *IM* i *PM* alela bile su 0,85, 0,67, odnosno 0,52. Aktivnost *EM* bila je statistički različita, s *CYP2D6*2* alelom po aktivnosti bližim *IM* nego *EM*. Aktivnost *IM* alela također je bila statistički različita.

Farmakogenetsko-farmakokinetička analiza koncentracija metabolita tamoksifena potvrđuje da se predviđeni fenotipovi CYP2D6 sastoje od metabolički različitih diplotipova, te da postojeći sustavi za prevođenje genotipa CYP2D6 u fenotip nisu optimalno kalibrirani u pogledu IM diplotipova i alela *CYP2D6*2*, koji nema potpunu aktivnost. Stoga su potrebna dodatna istraživanja kako bi se poboljšalo predviđanje aktivnosti CYP2D6 iz genetičkih podataka (Hertz i sur., 2015).

Kako bi se utvrdila aktivnost CYP2D6 razvijen je i izdisajni test, zasnovan na primjeni ¹³C-obilježenog dekstrometorfan-hidrobromida na *O*-CH₃ skupini (¹³C-DMBT) (Leeder i sur., 2008). Safgren i sur. (2015) proveli su prospektivno istraživanje na osobama kojima je preporučena terapija selektivnim modulatorom estrogenskih receptora tamoksifenom najmanje 6 mjeseci kako bi se ispitala sposobnost ¹³C-DMBT-a da identificira poznate CYP2D6 genotipove slabih metabolizatora, te utvrdi korelacija između enzimske aktivnosti i razine endoksifena u plazmi. Budući da je tamoksifen prolijek koji se metabolizira jetrenim enzimima citokroma P450 (3A i 2D6), ovi su rezultati važni zato što se obzirom na genotip CYP2D6 i ravnotežne koncentracije endoksifena razlikuje i učestalost recidiva raka dojke.

¹³CO₂ i ¹²CO₂ u uzorcima daha izmjereni su IR spektrometrijom. Količina ¹³CO₂ prisutna u uzorcima daha izražena je kao razlika u odnosu na početnu vrijednost (DOB), što predstavlja promjenu ¹³CO₂/¹²CO₂ omjera u uzorcima daha prikupljenim prije i nakon ingestije ¹³C-dekstrometorfana:

$$\text{DOB} = [^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2]_{\text{poslije primjene}} - [^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2]_{\text{prije primjene}}$$

U bolesnika koji nisu uzimali snažne inhibitore CYP2D6, ¹³C-DMBT bio je povezan s CYP2D6 genotipom, te tromjesečnom i šestomjesečnom ravnotežnom koncentracijom endoksifena, ali nije pružio bolju diskriminaciju ravnotežne koncentracije u odnosu na sam CYP2D6 genotip. Potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se utvrdilo može li ¹³C-DMBT zamijeniti genotipizaciju u identificiranju bolesnika sa smanjenom aktivnošću CYP2D6 enzima, a time i koncentracijom

endoksifena, posebno u onih bolesnika koji istodobno uzimaju inhibitore CYP2D6 (Safgren i sur., 2015).

CYP2D6 je enzim za kojeg se smatra da ga induktori potporodica CYP2C, CYP2B i CYP3A, poput rifampicina, ne mogu inducirati. Za fenotipizaciju tog enzima, može se koristiti i kardioselektivni beta-blokator metoprolol. Nakon što je pri procjenjivanju aktivnosti CYP2D6 u bazalnim uvjetima i nakon primjene rifampicina *in vivo* primijećen pad u omjeru metoprolol/ α -OH-metoprolol, što bi sugeriralo indukciju CYP2D6, provedena su *in vitro* ispitivanja pomoću primarnih humanih hepatocita (prije i nakon tretmana s rifampicinom). Enzimska aktivnost procijenjena je dodatkom svježeg medija koji sadrži marker supstrate (metoprolol ili midazolam).

U skladu s podacima o mRNA, predtretman rifampicinom povezan je sa značajnim povećanjem stvaranja 1'-OH-midazolama, što odražava indukciju CYP3A4 rifampicinom. Za razliku od rezultata dobivenih za mRNA CYP2D6, predtretman rifampicinom također je povezan sa značajnim porastom stvaranja α -OH-metoprolola. Inhibicijskim ispitivanjima pomoću mikrosoma ljudske jetre i supersoma koji prekomjerno eksprimiraju CYP3A4, u kojima je metoprolol α -hidroksiliran u reakciji inhibiranoj specifičnim inhibitorom CYP3A4 ketokonazolom, ali ne i specifičnim inhibitorom CYP2D6 kinidinom, zaključeno je da se metoprolol ne metabolizira isključivo pomoću CYP2D6, nego da CYP3A4, 2B6 i 2C9, koje inducira rifampicin, također doprinose α -hidroksilaciji, *O*-demetilaciji i *N*-dealkilaciji metoprolola. Taj doprinos je veći nakon indukcije CYP enzima rifampicinom, ali je premali da bi mogao kompromitirati upotrebljivost α -hidroksilacije metoprolola za fenotipizaciju CYP2D6 (Berger i sur., 2018).

Fenotipizacija uporabom endogenih biomarkera alternativna je metoda procjene aktivnosti CYP2D6, koja može eliminirati rizike primjene egzogenih tvari u ispitivanjima interakcija lijekova ovisnih o CYP2D6 ili ispitivanjima promijenjene aktivnosti u posebnim populacijama pacijenata. Nekoliko endogenih supstrata predloženi su kao CYP2D6 supstrati, uključujući 5-metoksi-*N,N*-dimetiltriptamin, pinolin, progesteron i anandamid. Međutim, identifikacija i validacija endogenih biomarkera za fenotipizaciju CYP2D6, posebno u ljudi, nedovoljno je razvijena. Ovdje je naveden primjer otkrivanja endogenog biomarkera aktivnosti humanog CYP2D6 u urinu.

Zdravi pedijatrijski ispitanici fenotipizirani su za aktivnost CYP2D6 korištenjem metaboličkog dekstrometorfan/dekstrorfan omjera u urinu (DM/DX). Koncentracije dekstrometorfana (DM)

i ukupnog dekonjugiranog dekstrorfana (DX) određene su nakon hidrolize upotrebom obrnute-fazne HPLC s fluorescencijskom detekcijom. Na temelju metaboličkog omjera, ispitanici su podijeljeni u sporo metabolizirajuće ($DM/DX \geq 0,3$) ili ostale fenotipove ($DM/DX < 0,3$). Zatim je korišten globalni pristup metabolomike za otkrivanje endogenih metabolita sposobnih za predviđanje DM/DX-a na pedijatrijskoj testnoj grupi. Rezultati dodatne analize odnosa između biomarkera kandidata i aktivnosti CYP2D6 potvrđeni su u urinu druge skupine djece, a promjena u razini metabolita i aktivnosti CYP2D6 procijenjena je u odraslih tijekom inhibicije CYP2D6 fluoksetinom. Jedan od metabolita predložen je za daljnja ispitivanja kao biomarker (Tay-Sontheimer i sur., 2014).

Qu i sur. (2014) proveli su ispitivanje čiji je cilj bio istražiti učinke fitospojeva na katalitičku aktivnost CYP2D6 pomoću HPLC-a i fluorimetrije. Među 63 ispitana fitospoja, 6 spojeva je pri 100 $\mu\text{mol/L}$ inhibiralo CYP2D6*1 i CYP2D6*10 posredovanu *O*-demetilaciju kumarinskog marker supstrata, i to više od 50 %. Da bi se dalje karakterizirala inhibicija CYP2D6*1 i *10 posredovane *O*-demetilacije, stabilno transficirane stanice inkubirane su s različitim koncentracijama inhibitora i supstrata, a rezultati su prikazani u tablici (tablica 12.).

Tablica 12. Inhibicija *O*-demetilacije AMMC-a putem CYP2D6*1 i CYP2D6*10 odabranim fitospojevima (preuzeto i prilagođeno iz Qu i sur., 2014).

Fitokemikalije	IC ₅₀ ± SD ($\mu\text{mol/L}$)	
	CYP2D6*1	CYP2D6*10
Koptizin sulfat	12,70 ± 0,87	12,55 ± 0,44
Bilobalid	16,88 ± 0,97	18,28 ± 1,86
Šisandrin B	24,80 ± 0,90	28,33 ± 2,28
Luteolin	25,47 ± 2,90	32,40 ± 2,59
Puerarin	25,96 ± 1,64	26,44 ± 1,23
Šisandrin A	27,77 ± 1,14	29,98 ± 4,55

IC₅₀ vrijednosti dobivene su kroz nekoliko provedenih inhibicija CYP2D6*1 i CYP2D6*10 katalizirane *O*-demetilacije AMMC-a fitospojevima. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD; $n \geq 3$.

Inhibicija ovisna o koncentraciji i reprezentativni Eadie-Hofstee grafovi pokazali su da ovi fitospojevi kompetitivno inhibiraju aktivnosti CYP2D6*1 i *10. Iako je CYP2D6*10 imao nižu enzimsku aktivnost od CYP2D6*1, inhibicije fitospojevima bile su slične za obje varijante (Qu i sur., 2014).

Gurley i sur. (2008) procijenili su šest biljnih ekstrakata u tri zasebna ispitivanja, od kojih je svako uključivalo zdrave dobrovoljce. Ispitanici su randomizirani kako bi primili

standardizirani biljni ekstrakt tijekom 14 dana. Između svake faze primjene postavljeno je 30-dnevno razdoblje ispiranja. Korišteni su ekstrakti sikavice (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), cimicifuge (*Cimicifuga racemosa* L.), kava kave (*Piper methysticum* G. Forst.), kanadske žutike (*Hydrastis canadensis* L.), gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) i ehinaceje (*Echinacea purpurea* (L.) Moench).

Supstrat CYP2D6, deprizokin, primijenjen je prije i na kraju suplementacije. Aktivnost CYP2D6 utvrđena je korištenjem omjera osmosatnog sadržaja metabolita deprizokina i ukupnog sadržaja deprizokina i metabolita [DURR = 4-hidroksideprizokin/(deprizokin + 4-hidroksideprizokin)]. HPLC metoda s fluorescencijskom detekcijom korištena je za određivanje deprizokina i 4-hidroksideprizokina u urinu (Frye i Branch, 1996).

Usporedbe DURR-a prije i poslije suplementacije otkrile su značajnu inhibiciju aktivnosti CYP2D6 za kanadsku žutiku, ali ne i za ostale ekstrakte. U skladu s tim, pacijente treba snažno odvratiti od uzimanja dodataka koji sadrže kanadsku žutiku istodobno s lijekovima na recept, posebno onima koji se u velikoj mjeri metaboliziraju enzimom CYP2D6 (Gurley i sur., 2008).

Prisutnost atoma dušika u strukturi zajednička je karakteristika većine inhibitora CYP2D6. Međutim, Yamaori i sur. (2011) ispitali su snagu i mehanizam inhibicije CYP2D6 fitokanabinoidima prisutnim u marihuani, Δ^9 -tetrahidrokanabinolom, kanabidiolom (CBD) i kanabinolom, koji u svojim strukturama nemaju atome dušika. Rekombinantni CYP2D6 inkubiran je s AMMC-om ili dekstrometorfanom u prisutnosti ispitivanih spojeva. Nakon provedenih inkubacija supernatant je podvrgnut HPLC analizi s fluorescentnim detektorom. Stvaranje dekstrorfana praćeno je uz ekscitaciju na 280 nm i emisiju na 310 nm.

Ispitivani kanabinoidi inhibirali su aktivnosti *O*-demetiliranja AMMC-a i dekstrometorfana rekombinantnog CYP2D6 ovisno o koncentraciji ($IC_{50} = 4,01 - 24,90 \mu M$), ali nisu pokazali značajnu inhibiciju ovisnu o metabolizmu. U konačnici je CBD okarakteriziran kao snažan kompetitivni inhibitor CYP2D6, a dodatna ispitivanja strukturnih značajki sugerirala su da su za inhibiciju CYP2D6 potrebne dvije slobodne fenolne hidroksilne skupine u rezorcinolnom dijelu i pentilni bočni lanac CBD-a (Yamaori i sur., 2011).

4.3.4. Praćenje aktivnosti enzima CYP3A4

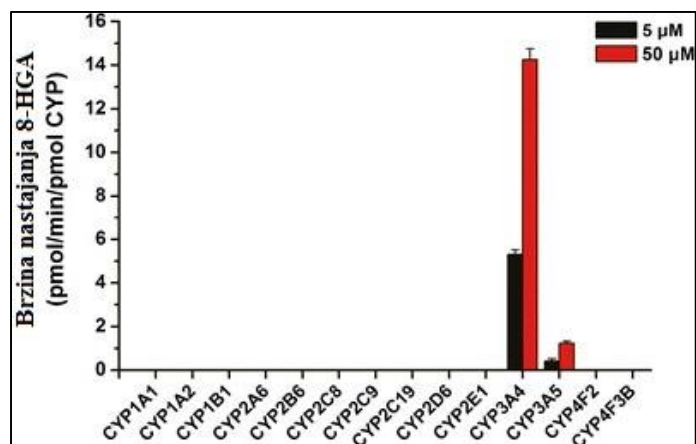
Supstrati CYP3A4 strukturno su raznoliki i pokazuju širok raspon veličina i afiniteta. Smatra se da su interakcije između CYP3A4 i njegovih supstrata i inhibitora složene te mogu rezultirati inhibicijom kompetitivne, nekompetitivne ili akompetitivne prirode, parcijalnom inhibicijom, ireverzibilnom inaktivacijom putem inhibicije utemeljene na mehanizmu ili aktivacijom enzima. Takva se opažanja potencijalno mogu pripisati vezivanju više supstrata unutar aktivnog mjesta enzima. Kao posljedica, interakcije uočene s jednim CYP3A4 markerom možda neće biti reprezentativne u odnosu na one primijećene s drugim CYP3A4 markerima, što može značajno utjecati i na uspješnost ekstrapolacije interakcija lijekova iz *in vitro* ispitivanja u *in vivo* situaciju (Kenworthy i sur., 1999).

Stoga su istraženi učinci 34 spoja na CYP3A4 posredovan metabolizam (Kenworthy i sur., 1999). Inhibicija *N*-demetilacije eritromicina, dekstrometorfana i diazepama, 6 β -hidroksilacije testosterona, 1'-hidroksilacije midazolama, 4-hidroksilacije triazolama, oksidacije nifedipina i ciklosporina, hidroksilacije i *N*-dealkilacije terfenadina, te *O*-dealkilacije benziloksirezorufina procijenjena je na prividnoj vrijednosti K_m ili S_{50} (za supstrate koji pokazuju sigmoidnost). Rezultati svakog ispitivanja statistički su uspoređeni s utvrđenim međusobnim odnosima različitih supstrata CYP3A4 kako bi se pomoglo u odabiru najreprezentativnijih testova za predviđanje enzimske aktivnosti CYP3A4.

Iako svi marker supstrati CYP3A4 pokazuju određeni stupanj sličnosti, rezultati pokazuju da se sedam supstrata može kategorizirati u dvije različite skupine. Eritromicin, ciklosporin i testosteron tvore najuže povezanu skupinu, a dekstrometorfan, diazepam, midazolam i triazolam drugu skupinu. Terfenadin se može jednako dobro smjestiti u obje skupine, dok nifedipin pokazuje izrazito drugačiji odnos. Benziloksirezorufin pokazuje najslabiju korelaciju sa svim ostalim markerima. Zaključno, kako bi se izbjegle pogreške u predviđanju važnih interakcija lijekova, preporučuje se korištenje barem tri CYP3A4 testa sa supstratom iz svake skupine (Kenworthy i sur., 1999).

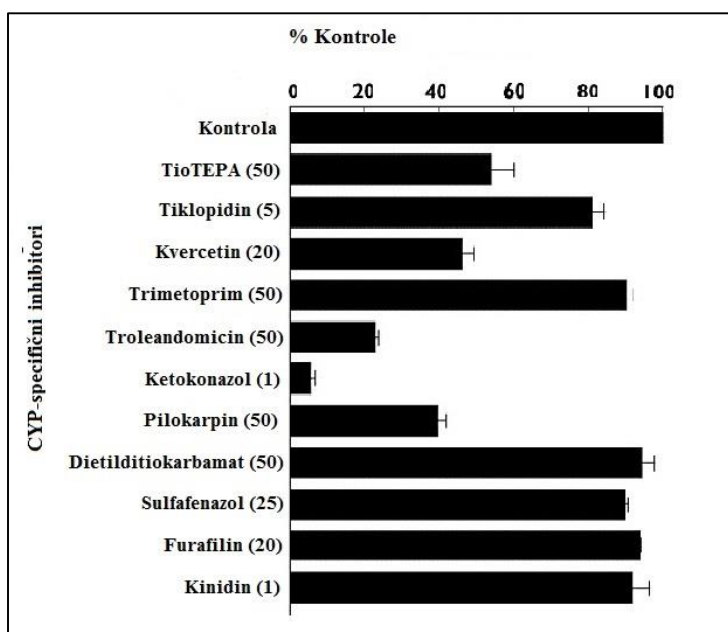
U posljednjih nekoliko desetljeća stalno se poduzimaju brojni naponi kako bi se specifično detektirala aktivnost CYP3A4 u mikrosomima jetre i živim stanicama. Zbog otkrića da CYP3A4 ima ključnu ulogu u biotransformaciji prirodnih lignana, Wu i sur. (2016) predstavili su gomizin A (GA) s dibenzociklootadienskim skeletom kao novi selektivni marker supstrat CYP3A4. Glavni metabolit GA u potpunosti je okarakteriziran kao 8-hidroksi-GA. Uočeno je da je 8-

hidroksilacija GA pretežno katalizirana od strane CYP3A4, ali je samo ograničeno katalizirana od strane CYP3A5 pri različitim ispitivanim koncentracijama supstrata (slika 20.), što ide u prilog selektivnosti gomizina A kao markera (Wu i sur., 2016).



Slika 20. Citokrom P450 enzimi uključeni u reakciju 8-hidroksilacije gomizina A (8-HGA), podaci predstavljaju prosjek ± SD tri pokusa izvedena u duplikatu (Wu i sur., 2016).

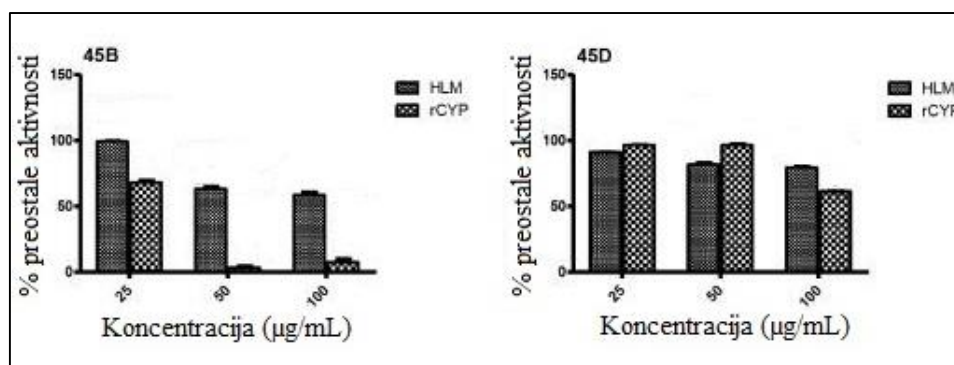
Još jedna reakcija koju dominantno katalizira CYP3A4 je hidroksilacija anastrozola, nesteroidnog inhibitora aromataze. Do tog su zaključka došli Kamdem i sur. (2010) primjenom specifičnih inhibitora CYP enzima i LC-MS/MS metode. Postotak inhibicije brzine stvaranja metabolita izračunat je usporedbom inhibirane aktivnosti s kontrolama (slika 21.).



Slika 21. Inhibicija stvaranja hidroksianastrozola inhibitorima specifičnim za CYP enzim. Koncentracije korištenih inhibitora naznačene su u zagradama (μM) (Kamdem i sur., 2010).

Za biljne preparate je važno provjeriti potencijal uzrokovanja interakcija s lijekovima, a za tu svrhu mogu se koristiti humani jetreni mikrosomi (HLM) i rekombinantni humani CYP enzimi. Odsutnost doprinosa drugih metaboličkih enzima u modelu rekombinantnih CYP enzima umanjuje njegovu primjenu kao idealnog *in vitro* modela za predstavljanje *in vivo* uvjeta. Tako za primjer, inhibicijski učinci uočeni u HLM modelu mogu biti niži od učinaka u modelu rekombinantnih CYP enzima zbog prisutnosti drugih CYP enzima. Međutim, kako HLM model zahtijeva dugotrajne i opsežne analitičke metode, rekombinantni CYP enzimi preporučuju se kao metoda probira za brzu procjenu i predviđanje potencijala nastanka interakcija lijekova *in vivo*.

Prikazana je usporedna procjena inhibitornih učinaka različitih frakcija *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw., koja se koristi se u većini afričkih zemalja za liječenje kroničnih bolesti poput dijabetesa, astme i infekcija povezanih s AIDS-om, na aktivnost CYP3A4 u HLM-u i rekombinantnom humanom CYP3A4 (slika 22.). Stvaranje 6 β -hidroksitestosterona korišteno je za praćenje aktivnosti CYP3A4, uz HPLC metodu s izokratnom eluacijom i UV detekcijom (254 nm).



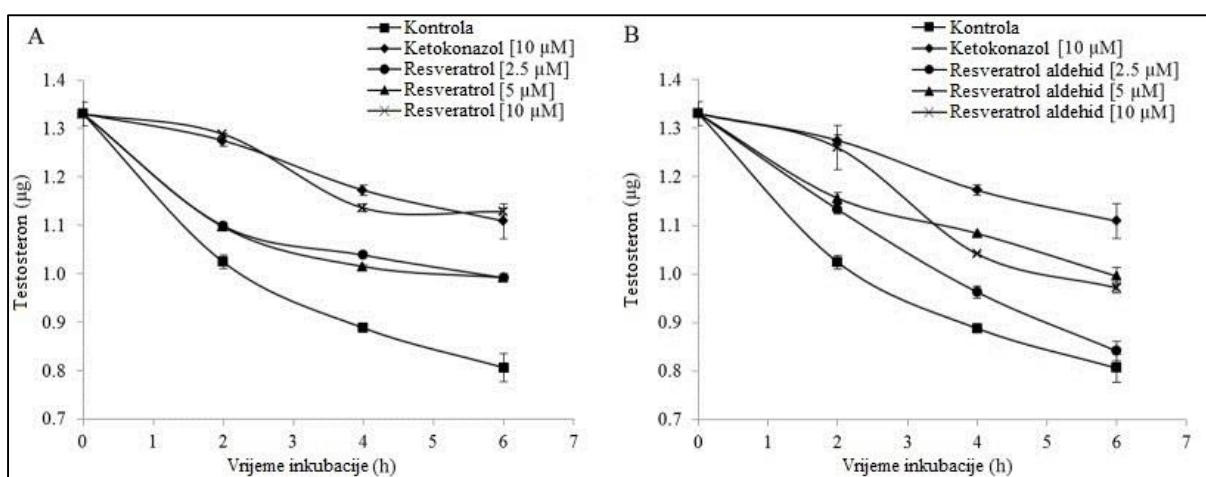
Slika 22. Inhibitorni učinci frakcija *K. crenata* **45B** i **45D** (25 - 100 µg/mL) na CYP3A4 katalizirano nastajanje 6 β -hidroksitestosterona u HLM-u i rekombinantnom humanom CYP3A4 (preuzeto i prilagođeno iz Awortwe i sur., 2015).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da kombinacija humanih jetrenih mikrosoma (HLM) i rekombinantnih humanih CYP enzima kao *in vitro* modela smanjuje tendenciju prekomjerne ili podcijenjene procjene potencijala biljnih sastojaka za interakcije s lijekovima (Awortwe i sur., 2015).

Basheer i sur. (2015) demonstrirali su prediktivnu snagu računalnog modeliranja za proučavanje interakcija koje uključuju CYP enzime. Kako bi ispitali upotrebu računalnog

modeliranja interakcija enzima i liganda, proučili su učinak stilbena resveratrola, prehrambenog spoja koji promiče zdravlje te djeluje kao inhibitor CYP3A4, i polusintetskog aldehida resveratrola na aktivnost CYP3A4 u *in vitro* modelu, te su utvrdili korelaciju biokemijskih nalaza s *in silico* rezultatima dobivenim virtualnim istraživanjem sidrenja (engl. *docking*).

Metabolizam markera testosterona ispitivan je u humanoj intestinalnoj staničnoj liniji (Caco-2/TC7) korištenjem tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti s detektorom s nizom fotodioda (DAD). Pokazano je da resveratrol i njegov aldehyd inhibiraju metabolizam testosterona (slika 23.), te da aldehyd ima slabiji inhibicijski učinak na CYP3A4 u usporedbi s resveratrolom.



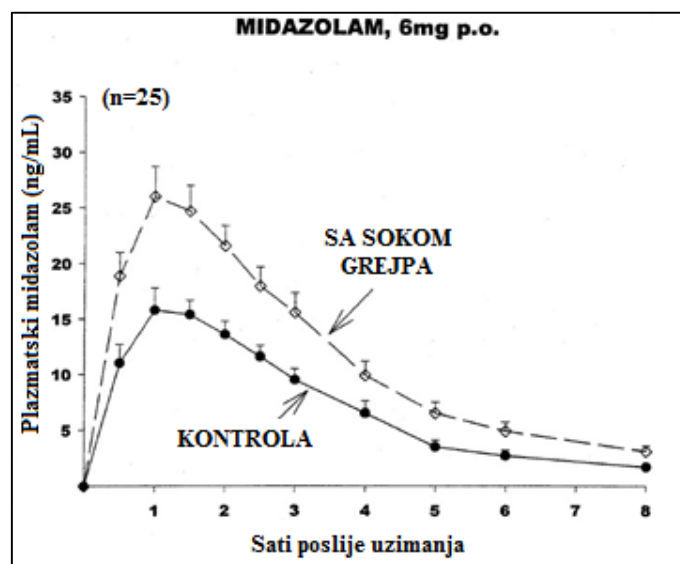
Slika 23. Inhibicija metabolizma testosterona u Caco2/TC7 staničnoj liniji različitim koncentracijama resveratrola (A) i resveratrol aldehida (B) za različite periode inkubacije, u usporedbi s kontrolom (bez inhibicije) i tretmanom ketokonazolom (Basheer i sur., 2015).

Niža inhibicijska sposobnost resveratrol aldehida u usporedbi s resveratrolom, može se objasniti time da aldehyd sudjeluje u manje hidrofobnih i elektrostatskih interakcija na veznom mjestu CYP3A4, kako je i izračunato pomoću modela sidrenja supstrata. Stoga se uporaba računalnih alata može pokazati vrlo korisnom za predviđanje inhibicije CYP3A4 terapijskim kandidatima, a također i za interakcije fitospojeva iz hrane s lijekovima (Basheer i sur., 2015).

Budući da sastavnice soka grejpa mogu narušiti aktivnost intestinalnih CYP3A enzima, što ponekad rezultira klinički značajnim interakcijama lijekova, Greenblatt i sur. (2003) su proučili vremenski tijek oporavka enzimske aktivnosti CYP3A nakon inhibicije jednokratnom dozom soka grejpa. Kao *in vivo* marker aktivnosti humanog CYP3A korišten je benzodiazepinski

derivat midazolam, čije su koncentracije u plazmi određene plinskom kromatografijom s detektorom zarobljavanja elektrona (ECD).

U svih ispitanika, primjena midazolama dva sata nakon konzumacije soka grejpa uzrokovala je povećanje površine ispod krivulje ovisnosti plazmatske koncentracije o vremenu (AUC) i smanjenje klirensa midazolama u usporedbi s kontrolnim ispitivanjem provedenim prije konzumacije soka grejpa (slika 24.). U prosjeku je AUC bila 1,65 puta veća od kontrolne, dok je klirens iznosio 62 % kontrolnog. Međutim, nije došlo do promjene u vremenu polueliminacije. Nakon ponovne primjene midazolama jedan, dva i tri dana nakon konzumacije soka grejpa, došlo je do progresivnog povratka AUC i klirensa midazolama prema vrijednostima uočenim u kontrolnom ispitivanju, a odnos vremena nakon izlaganja soku grejpa i omjera srednjih vrijednosti AUC dao je vrijeme poluoporavka procijenjeno na 23 sata.

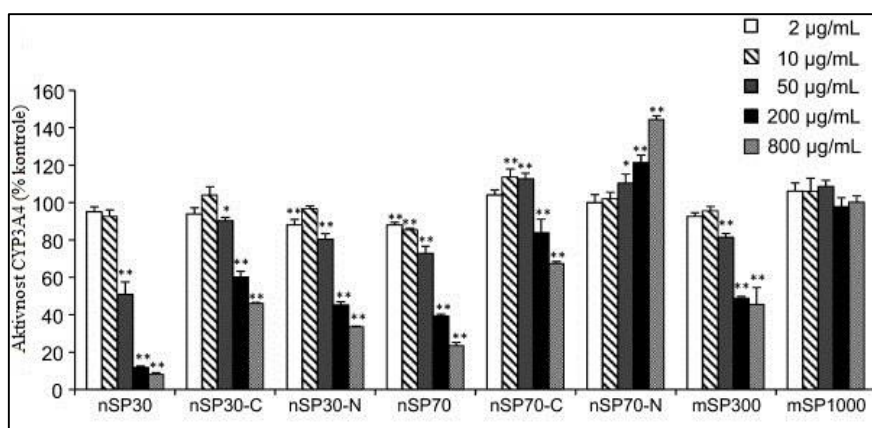


Slika 24. Prosječne (\pm SEM) razine midazolama u plazmi nakon oralne doze od 6 mg 1. dana (kontrolno ispitivanje, prije ingestije soka grejpa) i 3. dana (kada je midazolam primijenjen 2 sata nakon soka grejpa) (Greenblatt i sur., 2003).

Rezultati su pokazali da uobičajena jednokratna izloženost soku grejpa oštećuje enteričku, ali ne i jetrenu komponentu presistemskog izlučivanja oralnog midazolama. Oporavak se događa unutar 3 dana, što je skladu s vremenskim tijekom ekspresije enzima nakon nepovratne inhibicije (Greenblatt i sur., 2003).

Imai i sur. (2014) su u *in vitro* istraživanju ispitali učinke amorfnih silika čestica različitih veličina i površinskih izmjena na aktivnost CYP3A4 enzima pomoću luminescencijske metode. Korištene su silika nanočestice promjera 30 i 70 nm (nSP30, nSP70), konvencionalne silika mikročestice promjera 300 i 1000 nm (mSP300, mSP1000), te nSP30 i nSP70 modificirane karboksilnim skupinama (nSP30-C i nSP70-C), odnosno amino skupinama (nSP30-N, nSP70-N), u različitim koncentracijama (2-800 µg/mL) u mikrosomima ljudske jetre.

Aktivnost CYP3A4 smanjivala se ovisno o dozi nakon inkubacije s većinom nanočestica (nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, mSP300). Suprotno tome, nije primijećena značajna razlika u aktivnosti CYP3A4 u uzorcima tretiranim s mSP1000 u usporedbi s kontrolom (slika 25.). Za nemodificirane silika čestice, IC₅₀ se povećavao s povećanjem veličine čestica. Uočeno je da modifikacija nanočestica s amino skupinama (nSP70-N) rezultira povećanom aktivnošću CYP3A4, što bi se moglo objasniti različitim načinom vezanja na proteine, kao posljedicom razlike u veličini nanomaterijala.



Slika 25. Učinak silika čestica na aktivnost CYP3A4 u HLM-u. Kratice: nSP30 i nSP70, silika nanočestice promjera 30 i 70 nm; mSP300 i mSP1000, silika mikročestice promjera 300 i 1000 nm; -C karboksilna modifikacija; -N, amino modifikacija (Imai i sur., 2014).

Dobiveni rezultati sugeriraju da veličina i površinske karakteristike silika čestica određuju njihov utjecaj na aktivnost CYP3A4, te da je optimizacijom ovih svojstava moguće razviti silika čestice koje nemaju nepoželjne učinke na metaboličke enzime, što je izrazito važno saznanje jer se zbog korisnih kemijskih i fizikalnih svojstava nanomaterijala očekuje porast njihove upotrebe kao aditiva u budućnosti (Imai i sur., 2014).

4.3.5. Pojedinačno praćenje aktivnosti više citokrom P450 enzima

Ispitivanje enzimske aktivnosti citokroma P450 rutinski se koristi za procjenu potencijala interakcija lijekova posredovanih ovim enzimima. Većina CYP enzima podložna je inhibiciji ili indukciji zbog djelovanja lijekova i različitih kemikalija, što može dovesti do toksičnosti ili neuspjeha u liječenju. Stoga su česta istraživanja u kojima se provjerava učinak ispitivanog spoja na aktivnost više CYP enzima, s naglaskom na farmakološki najvažnije CYP enzime.

Fasinu i sur. (2014) istražili su potencijal za inhibiciju glavnih citokrom P450 enzima sirovim vodenim ekstraktima tri popularne ljekovite biljke čija je upotreba raširena u južnoj Africi. Ekstrakti *Bowiea volubilis* Harv. ex Hook. f., *Spirostachys africana* Sond. i *Tulbaghia violacea* Harv. inkubirani su s mikrosomima ljudske jetre radi praćenja odgovarajućih marker reakcija za CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4 (tablica 13.). Kontrolne inkubacije provedene su bez i s inhibitorom specifičnim za CYP, a za analizu je korištena LC/MS metoda.

Tablica 13. Marker supstrati, koncentracija mikrosomskog proteina i specifični inhibitori za ispitivanje CYP enzima (Fasinu i sur., 2014).

Enzim	Marker supstrat	Mikrosomska koncentracija (mg/mL)	Koncentracija marker supstrata (µg/mL)	CYP-specifični inhibitor
CYP1A2	fenacetin	0,2	10	furafilin
CYP2C9	diklofenak	0,1	5	sulfafenazol
CYP2C19	S-mefenitoin	0,5	30	tiklopidin
CYP3A4/5	testosteron	0,2	30	ketokonazol

Ekstrakti *B. volubilis* inhibirali su metaboličku aktivnost CYP1A2 i CYP3A4, ali nije primijećen značajniji učinak na aktivnost CYP2C9 i CYP2C19. Ekstrakti *S. africana* također su pokazali inhibicijsko djelovanje na CYP1A2 i CYP3A4, dok su ekstrakti *T. violacea* pokazali samo relativno slabo inhibitorno djelovanje na CYP1A2. Dobiveni rezultati sugeriraju potencijal za interakciju biljaka i supstrata zahvaćenih enzima, ako se postigne dovoljna koncentracija *in vivo* (Fasinu i sur., 2014).

Zhang i sur. (2019) su proučavali bioaktivni flavonoid kempferitrin, koji je izoliran iz vodenog ekstrakta *Justicia spicigera* Schltdl., listova *Bauhinia forficata* L. i listova *Vepris heterophylla* (Engl.) Letouzey. Koristili su jetrene mikrosome i odgovarajuće marker supstrate kako bi ispitali inhibitorski učinak kempferitrina na osam CYP enzima (1A2, 3A4, 2A6, 2E1, 2D6, 2C9, 2C19 i 2C8) *in vitro*. Marker reakcije prikazane su u tablici (tablica 14.). Nastali metaboliti analizirani su HPLC-om uz ultraljubičastu ili fluorescentnu detekciju.

Tablica 14. Ispitivani CYP enzimi, marker reakcije i inkubacijski uvjeti korišteni u inhibicijskom ispitivanju (Zhang i sur., 2019).

CYP enzim	Marker reakcija	Koncentracija supstrata (μM)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Vrijeme inkubacije (min)
1A2	<i>O</i> -deetilacija fenacetina	40	0,20	30
3A4	6 β -hidroksilacija testosterona	50	0,50	10
2A6	7-hidroksilacija kumarina	1	0,10	10
2E1	6-hidroksilacija klorzoksazona	120	0,40	30
2D6	<i>O</i> -demetilacija deksstrometorfana	25	0,25	20
2C9	4'-hidroksilacija diklofenaka	10	0,30	10
2C19	4'-hidroksilacija <i>S</i> -mefenitoina	100	0,20	40
2C8	6 α -hidroksilacija paklitaksela	10	0,50	30

Rezultati su pokazali da kempferitrin ima potencijal uzrokovati farmakokinetičke interakcije s drugim istodobno primijenjenim lijekovima koji se metaboliziraju putem CYP1A2, CYP3A4 i CYP2C9. Stoga, kako bi se izbjegle štetne interakcije lijekova, preporučuje se izbjegavanje njegove upotrebe s lijekovima koji se metaboliziraju navedenim enzimima (Zhang i sur., 2019).

Slično je ispitivanje provedeno s korinolinom, izokinolinskim alkaloidom izoliranim iz roda *Corydalis*, koji pokazuje višestruke biološke učinke, uključujući inhibiciju acetilkolinesteraze, inhibiciju stanične adhezije, fungitoksično i citotoksično djelovanje. Da bi se procijenio inhibicijski učinak korinolina na sedam različitih humanih CYP enzima, izvedeni su marker testovi za svaki CYP u prisutnosti korinolina ili specifičnih pozitivnih inhibitora u mikrosomima ljudske jetre. Korinolin je pokazao snažne inhibitorne učinke na aktivnosti CYP3A4 i CYP2C9, što je značajan podatak za njegovu kliničku primjenu (Fang i sur., 2011).

Glavni klinički problem vorikonazola, derivata flukonazola koji pripada drugoj generaciji triazolnih antifungalnih lijekova, predstavljaju nepovoljne interakcije povezane s njegovom primjenom. Da bi se identificirali mehanizmi tih interakcija, ispitana je inhibicijska snaga vorikonazola na osam humanih citokrom P450 enzima *in vitro*.

Korištene specifične enzimске marker reakcije u početnoj analizi uključivale su *O*-deetilaciju fenacetina (CYP1A2), 7-hidroksilaciju kumarina (CYP2A6), 8-hidroksilaciju efavirena (CYP2B6), 4-hidroksilaciju bupropiona (CYP2B6), *N*-deetilaciju amodiakina (CYP2C8), hidroksilaciju metilne skupine tolbutamida (CYP2C9), 4'-hidroksilaciju *S*-mefenitoina (CYP2C19), *O*-demetilaciju dekstrometorfana (CYP2D6) i 1'-hidroksilaciju midazolama (CYP3A). Koncentracije metabolita i unutarnjih standarda izmjerene su HPLC-om s UV ili fluorescentnim načinom detekcije.

Vorikonazol je pokazao inhibiciju CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A, dok je njegov učinak na CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 i CYP2D6 bio slab. Detaljniji eksperimenti s jetrenim mikrosomima pokazali su da je vorikonazol snažan kompetitivni inhibitor CYP2B6, CYP2C9 i CYP2C19, dok je inhibicija CYP3A vorikonazolom okarakterizirana kao kompetitivna i miješanog tipa (Jeong i sur., 2009).

Indukcija CYP enzima može se mjeriti enzimskom aktivnošću ili ekspresijom mRNA. Ti eksperimenti često oduzimaju puno vremena, a varijabilnost među analizama može dovesti do pogrešnih interpretacija rezultata. Da bi se riješili ovi problemi i uspostavila moćnija metoda za mjerenje indukcije CYP enzima, Kim i sur. (2015) proveli su mjerenje pomoću luminescentnog testa, koji ima prednost brzine i sigurnosti u odnosu na qRT-PCR i LC-MS/MS (Cali i sur., 2006), pa se može koristiti kao robusni alat za visokoprotočne CYP probire.

Indukcija četiri CYP enzima (1A2, 2B6, 2C9 i 3A4) mesalazinom, lijekom za kolitis, izmjerena je pomoću luminometra u kriokonzerviranim humanim hepatocitima. Rezultati su pokazali da su aktivnosti CYP2B6 i CYP3A4 potaknute mesalazinom na način ovisan o koncentraciji, te je moguće zaključiti da mesalazin djeluje kao induktor tih enzima (Kim i sur., 2015).

4.3.6. Koktel ispitivanja za praćenje aktivnosti više citokrom P450 enzima

Mnogi su istraživači usvojili pristup CYP koktela kako bi istovremeno procijenili aktivnosti različitih CYP enzima. Tako su Pillai i sur. (2013) razvili i validirali osjetljiv i specifičan CYP koktel test za istodobno mjerenje aktivnosti glavnih humanih citokrom P450 enzima, CYP1A2 (fenacetin), CYP3A4/5 (midazolam), CYP2C9 (diklofenak), CYP2C19 (*S*-mefenitoin) i CYP2D6 enzima (dekstrometorfan), u primarnoj kulturi humanih hepatocita primjenom LC-MS/MS metode. Metaboliti nastali iz svakog supstrata istodobno su kvantificirani pomoću odgovarajućih unutarnjih standarda obilježenih stabilnim izotopima, u pozitivnom elektrosprej načinu ionizacije korištenjem višestrukog praćenja reakcija (MRM). MS uvjeti za metabolite prikazani su u tablici (tablica 15.).

Tablica 15. MS uvjeti za određivanje metabolita markera u koktel ispitivanju (Pillai i sur., 2013).

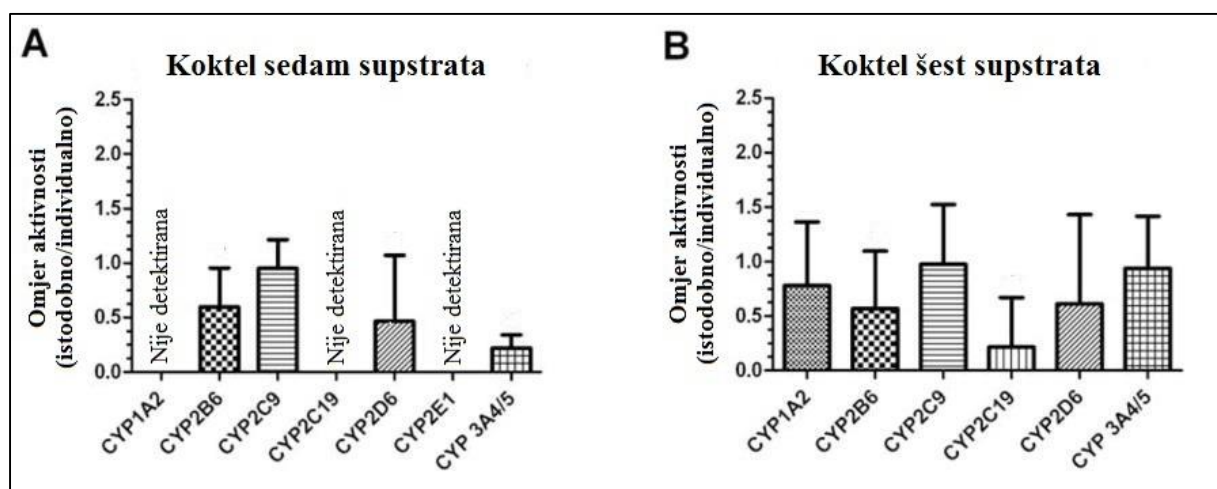
Enzim	Metabolit	Prekursor ion (<i>m/z</i>)	Produkt ion (<i>m/z</i>)	Vrijeme zadržavanja (min.)
CYP1A2	paracetamol	152,03	110,03	4,26
CYP2C9	4'-OH-diklofenak	311,82	229,97	5,24
CYP2C19	4'-OH-mefenitoin	234,91	132,77	4,64
CYP2D6	dekstrosorfan	257,98	156,96	4,29
CYP3A4	1'-OH-midazolam	341,91	323,85	5,09

Glavnu zabrinutost pri istodobnoj upotrebi više markera CYP aktivnosti u koktel ispitivanju predstavljaju interakcije supstrata. Kao rezultat, aktivnosti CYP enzima bit će kompromitirane, te je stoga neophodno pokazati minimalnu/nepostojeću interakciju supstrata u analizi koktela pojedinačnom i istodobnom inkubacijom supstrata CYP koktela s primarnim kulturama ljudskih hepatocita.

Da bi pokazali primjenjivost metode, Pillai i sur. (2013) inkubirali su humane hepatocite s pojedinačnim CYP supstratom ili koktelom CYP supstrata. Specifični supstrati korišteni u inicijalnom koktel ispitivanju uključivali su: fenacetin (CYP1A2), bupropion (CYP2B6), diklofenak (CYP2C9), *S*-mefenitoin (CYP2C19), dekstrometorfan (CYP2D6), klorzoksazon (CYP2E1) i midazolam (CYP3A4/5) (slika 26.).

Značajna inhibicija aktivnosti CYP3A4/5, CYP2B6 i CYP2D6 uočena je u koktel testu sa sedam supstrata u usporedbi s ispitivanjem pojedinačnih supstrata. Uz to, aktivnosti CYP1A2,

CYP2C19 i CYP2E1 bile su ispod granice detekcije. Ranije zabilježeni dokazi temeljeni na *in vivo* ispitivanjima sugeriraju da klorzoksazon može značajno inhibirati hidroksilaciju midazolama (aktivnost CYP3A) u zdravih ljudi. Uz to, za klorzoksazon je također uočeno da stupa u interakciju sa supstratima CYP1A2 (Palmer i sur., 2001). Zbog toga je CYP2E1 marker klorzoksazon isključen iz početne smjese supstrata. Trajanje inkubacije *S*-mefenitoina produljeno je jer manja brzina metabolizma *S*-mefenitoina (CYP2C19) ili intersupstratna inhibicija aktivnosti CYP2C19 mogu biti odgovorne za smanjenu aktivnost CYP2C19 u humanim hepatocitima.



Slika 26. Omjer aktivnosti različitih CYP enzima nakon istodobne i pojedinačne inkubacije (A) sedam supstrata (pet korištenih enzima uz CYP2B6 i CYP2E1), te (B) šest supstrata (nakon uklanjanja CYP2E1 markera iz koktela sa sedam supstrata) (Pillai i sur., 2013).

Iako uklanjanje klorzoksazona iz početne smjese supstrata CYP koktela u potpunosti obnavlja aktivnost CYP3A, još uvijek je uočena značajna inhibicija aktivnosti CYP2C19, CYP2B6 i CYP2D6 u koktel testu sa šest markera u usporedbi s pojedinačnim ispitivanjima. Prethodna ispitivanja sugeriraju da bupropion može inhibirati *O*-demetilaciju dekstrometorfana u mikrosomima ljudske jetre (Hesse i sur., 2000), kao i 4'-hidroksilaciju *S*-mefenitoina (Lee i Kim, 2013). Stoga je i bupropion izuzet iz smjese markera za CYP koktel ispitivanje (Pillai i sur., 2013).

Važan korak u tijeku postupka validacije novog fenotipizacijskog koktela je dobivanje opsežnih podataka o fenotipizacijskim mjerenjima ispitanika s inhibiranom i induciranom aktivnošću

enzima. Derungs i sur. (2016) proveli su takvo ispitivanje u zdravih muških ispitanika kako bi okarakterizirali metodu fenotipizacije „Basel koktelom“.

U randomiziranom ispitivanju markeri za istovremenu fenotipizaciju CYP1A2 (kofein), CYP2B6 (efavirenz), CYP2C9 (losartan), CYP2C19 (omeprazol), CYP2D6 (metoprolol) i CYP3A4 (midazolam) primijenjeni su kod ispitanika bez prethodnog tretmana (početna vrijednost), nakon prethodnog tretmana kombinacijom CYP inhibitora (ciprofloksacin, ketokonazol i paroksetin) i nakon indukcije CYP-a rifampicinom. Koncentracije svih analita u uzorcima plazme određene su obrnuto-faznom HPLC u kombinaciji s tandemskim masenim spektrometrom, u pozitivnom elektrosprej načinu ionizacije, osim za efavirenz i njegov metabolit, koji su detektirani u negativnom načinu. Rezultati su iskorišteni za određivanje farmakokinetičkih profila marker supstrata.

Najveća ukupna korelacija između metaboličkih omjera i omjera AUC za sva tri kombinirana stanja pronađena je dva sata nakon primjene markera za CYP3A4, četiri sata nakon primjene za CYP1A2 i CYP2C19, te šest sati nakon primjene za CYP2B6, CYP2C9 i CYP2D6. Iako se inhibicija mogla pouzdano detektirati za sve CYP enzime kod gotovo svakog ispitanika, detekcija indukcije bila je izazovnija. Omjer losartana i njegova metabolita u plazmi nije na odgovarajući način odražavao induciranu aktivnost CYP2C9, a za CYP3A4 inducirana aktivnost samo se adekvatno odražavala metaboličkim omjerima koji koriste ukupnu koncentraciju 1'-hidroksimidazolama (Derungs i sur., 2016).

Sličnom su metodom Turpault i sur. (2009) izvršili farmakokinetičku procjenu selektivnih supstrata CYP1A2 (kofein), CYP2C9 (*S*-varfarin), CYP2C19 (omeprazol), CYP2D6 (metoprolol) i CYP3A enzima (midazolam) pri istovremenoj oralnoj primjeni. Budući da je 90 %-tni interval pouzdanosti farmakokinetičkih parametara bio unutar unaprijed određenih granica bioekvivalencije (0,80 i 1,25), pokazano je da ne postoje farmakokinetičke interakcije, što ukazuje na mogućnost korištenja ovog koktela za procjenu potencijala višestrukih lijek-lijek interakcija *in vivo* (Turpault i sur., 2009).

Tomalik-Scharte i sur. (2010) upotrijebili su koktel pristup u proučavanju pacijenata s kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom zbog deficijencije P450 oksidoreduktaze (POR). Takvi pacijenti pate od poremećaja spolnog razvoja i nedostatka glukokortikoida, a uzrok tome je poremećaj prijenosa elektrona s mutantne POR na mikrosomske citokrom P450 enzime koji imaju ključnu ulogu u sintezi glukokortikoida i spolnih steroida. POR također prenosi elektrone

na sve glavne CYP enzime koji metaboliziraju lijekove, uključujući CYP3A4, koji inaktivira glukokortikoide i estrogene.

Proučavali su pacijenticu s homozigotnom POR A287P mutacijom i njezinu heterozigotnu majku. Obje ispitanice podvrgnute su *in vivo* koktel fenotipizaciji (tablica 16.) kako bi se procijenila aktivnost pet glavnih CYP enzima koji metaboliziraju lijekove. Plazmatske koncentracije markera i njihovih metabolita određene su pomoću LC-MS/MS-a.

Tablica 16. Primjer *in vivo* fenotipizacije koktelom niskodoziranih lijekova za procjenu CYP enzima koji metaboliziraju lijekove, uključujući korištene selektivne supstrate, odgovarajuće doze i parametre fenotipizacije (Tomalik-Scharte i sur., 2010).

Enzim	Lijek	Doza (mg)	Fenotipizacijski parametar (mjerna jedinica)
CYP1A2	kofein	150	oralni klirens kofeina (mL/min po kg tjelesne mase)
CYP2C9	tolbutamid	125	plazmatska koncentracija tolbutamida 24h poslije primjene (µg/mL)
CYP2C19	omeprazol	20	omjer molarnih plazmatskih koncentracija omeprazola i 5-hidroksiomeprazola 3h poslije primjene
CYP2D6	dekstrometorfan-hidrobromid	30	omjer molarnih plazmatskih koncentracija dekstrometorfana i dekstrorfana 3h poslije primjene
CYP3A4	midazolam	2	oralni klirens midazolama (mL/min po kg tjelesne mase)

Iako je genotipizacija predviđala normalne ili visoke enzimске aktivnosti kod obje ispitanice, *in vivo* procjena pokazala je ispodprosječnu aktivnost CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A4 enzima kod pacijentice te CYP1A2 i CYP2C9 kod njezine majke. Ovi rezultati pružaju *in vivo* dokaze o važnoj ulozi POR u regulaciji metabolizma i detoksikacije lijekova. Također pokazuju da kod pacijenata koji boluju od kongenitalne adrenalne hiperplazije treba razmotriti *in vivo* procjenu aktivnosti metaboliziranja lijekova, uz naknadno prilagođavanje terapije lijekovima i zamjene steroida (Tomalik-Scharte i sur., 2010).

Indukciju humanih CYP3A4, CYP2B6 i CYP1A2 enzima važno je uzeti u obzir pri odabiru kliničkih kandidata kako bi se izbjegle potencijalno štetne lijek-lijek interakcije. Prednost upotrebe koktela u takvim istraživanjima je mogućnost istodobne detekcije indukcije CYP enzima regulirane trima glavnim transkripcijskim faktorima: AhR (aril-ugljikovodični

receptor) (CYP1A), CAR (konstitutivni androstanski receptor) i PXR (pregnanski X receptor) (CYP2 i CYP3A). Cilj istraživanja kojeg su proveli Rhodes i sur. (2011) bio je istodobno procijeniti indukciju aktivnosti CYP3A4, CYP2B6 i CYP1A2 u kulturi humanih hepatocita tretiranih različitim prototipskim ligandima navedenih receptora (tablica 17.) uporabom optimiziranog koktela supstrata, kao i brze, osjetljive metode tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom.

Tablica 17. Ispitivanje indukcije CYP enzima koktelom supstrata i konvencionalno uz pojedinačne supstrate (Rhodes i sur., 2011).

P450 enzim	Marker supstrat	Induktor
CYP3A4	midazolam (5 µM)	rifampicin (10 µM)
		fenobarbital (1 mM)
CYP2B6	bupropion (50 µM)	CITCO (1 µM)
		artemisinin (50 µM)
CYP1A2	fenacetin (100 µM)	3-metilkolantren (1 µM)
		omeprazol (50 µM)

Kratice: CITCO, 6-(4-klorofenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-karbaldehid-*O*-(3,4-diklorobenzil)oksim.

Prosječna induksijska promjena aktivnosti CYP3A4, CYP2B6 i CYP1A2 bila je usporediva između koktela i uobičajenog konvencionalnog ispitivanja. Stoga se može zaključiti kako primjena ovog supstratnog koktela rezultira metodologijom više protočnosti u usporedbi s konvencionalnim pristupom uz istovremeno očuvanje induksijskih odgovora prototipskih induktora (Rhodes i sur., 2011).

Gerin i sur. (2013) validirali su brzu, jednostavnu i jeftinu metodu za procjenu indukcije CYP enzima u kriokonzerviranim humanim hepatocitima. Upotrijebili su koktel strategiju (uz *in situ* inkubaciju) za procjenu indukcije CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 i CYP3A4 enzima uporabom fenacetina, bupropiona, diklofenaka i midazolama kao marker supstrata. Iako upotrijebljena *in situ* inkubacija, u kojoj se supstrati dodaju ispranom monosloju hepatocita, ima glavni nedostatak u niskoj osjetljivosti mjerenja, ona zahtijeva mnogo manje hepatocita od mjerenja aktivnosti u mikrosomima pripremljenim iz monosloja, a daje i prikaz funkcionalnosti hepatocita nakon tretmana s ispitivanim spojevima.

Kinetički parametri procijenjeni su za svaki marker supstrat u kontrolnim i induciranim hepatocitima u linearnim uvjetima, u svrhu provjere neovisnosti induksijske promjene o koncentraciji marker supstrata te odabira koncentracije marker supstrata koja će se koristiti u koktelu.

Tablica 18. Indukcijska promjena izračunata korištenjem nekoliko različitih pristupa

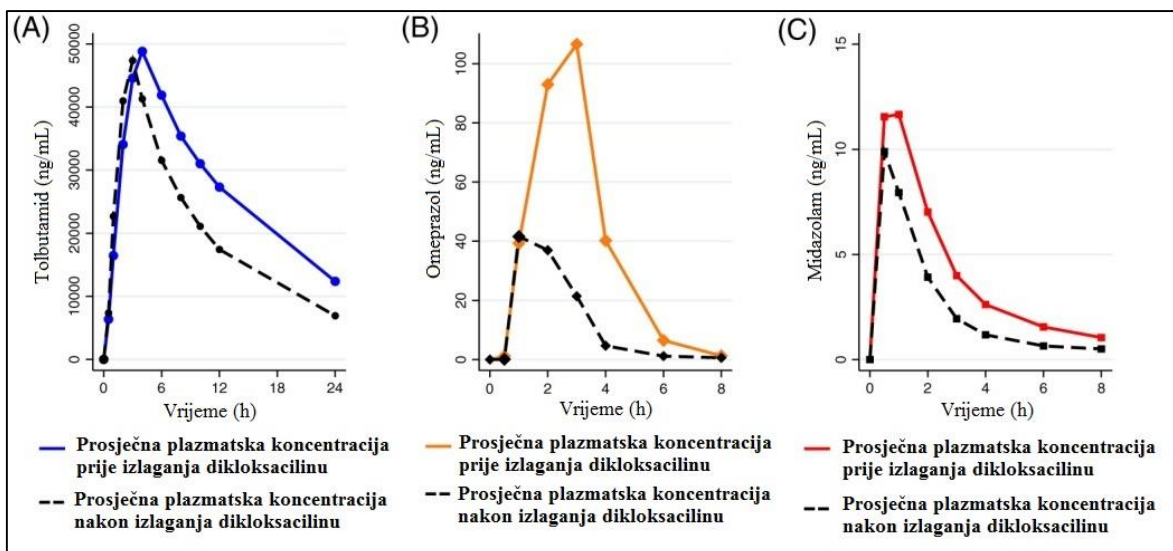
(Gerin i sur., 2013).

P450	Indukcijska promjena izračunata na omjeru (indukcija/kontrola):			
	V_{max}	CL_{int}	Enzimске aktivnosti (prosjeak)*	Enzimске aktivnosti (koncentracija u koktelu)**
CYP1A2	11,0	12,0	9,1 ± 2,3	13,0 ± 1,0
CYP2B6	10,0	22,0	12,0 ± 2,0	12,0 ± 4,0
CYP2C9	2,1	2,4	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,3
CYP3A4	4,6	2,6	4,1 ± 1,0	4,1 ± 0,4

* Za svaku koncentraciju supstrata izračunat je omjer enzimskih aktivnosti u induciranim hepatocitima nad kontrolom, te je predstavljena srednja vrijednost svih omjera. ** Predstavljen je omjer enzimskih aktivnosti u induciranim hepatocitima nad kontrolom pri predviđenoj koncentraciji marker supstrata u koktelu.

Parametar induksijske promjene (engl. *fold-induction*) krajnja je točka koja se klasično koristi za procjenu potencijala indukcije CYP enzima u *in vitro* ispitivanjima. Podatci su pokazali da su parametri induksijske promjene slični, bez obzira na pristup koji se koristio, za sve testirane P450, izuzev CYP2B6 i CYP3A4 kada je korišten omjer CL_{int} (tablica 18.). Kako je CL_{int} omjer V_{max}/K_m , ovaj se nesklad lako objašnjava različitim K_m vrijednostima uočenim u kontroli i u induciranim hepatocitima za ova dva enzima. Budući da je određivanje parametra induksijske promjene neovisno o koncentraciji marker supstrata, jedino ograničenje za odabir koncentracije marker supstrata u koktelu preostaje osjetljivost analitičke metode (Gerin i sur., 2013).

S ciljem istraživanja potencijalne indukcije citokroma P450 dikloksacilinom, Stage i sur. (2018) su proveli farmakokinetičko ispitivanje koktela pet lijekova s i bez prethodnog tretmana dikloksacilinom. Uzorci urina i plazme analizirani su na kofein i paraksantin (CYP1A2), omeprazol i 5-hidroksioimeprazol (CYP2C19), tolbutamid i 4'-hidroksitolbutamid (CYP2C9), dekstrometorfan i dekstorfan (CYP2D6), te midazolam i α -hidroksimidazolam (CYP3A4). Analiza plazme provedena je primjenom razrjeđenja izotopa, ekstrakcije čvrstom fazom (SPE) i LC-MS/MS-a (Wohlfarth i sur., 2012). Uzorci urina su hidrolizirani (razgradnja glukuronida) prije dodavanja stabilnim izotopom obilježenih unutarnjih standarda. Analiza omeprazola i njegovog metabolita u urinu provedena je prije hidrolize jer ti spojevi nisu stabilni u kiselom.



Slika 27. Krivulje ovisnosti plazmatske koncentracije o vremenu za (A) tolbutamid, (B) omeprazol i (C) midazolam, s i bez dikloksacilina (preuzeto i prilagođeno iz Stage i sur., 2018).

Nakon deset dana primjene dikloksacilina došlo je do klinički i statistički značajnog smanjenja površine ispod krivulje ovisnosti plazmatske koncentracije o vremenu za omeprazol (CYP2C19), tolbutamid (CYP2C9) i midazolam (CYP3A4) (slika 27.). Obzirom na rezultate, preporučuje se oprez pri propisivanju dikloksacilina korisnicima lijekova s uskom terapijskom širinom koji se metaboliziraju navedenim enzimima (Stage i sur., 2018).

5. ZAKLJUČAK

Citokrom P450 superporodica enzima odgovorna je za klirens brojnih lijekova, kao i za bioaktivaciju prolijekova. Praćenje metaboličke aktivnosti CYP enzima važno je kako bi se smanjili neželjeni učinci, poboljšala učinkovitost liječenja i minimalizirao broj povučениh lijekova s tržišta. Najkorištenije analitičke metode za tu svrhu uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnutu s masenom spektrometrijom, fluorimetriju, luminometriju i radiometriju.

Klasična metoda kvantifikacije aktivnosti CYP enzima temelji se na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC), koja je dugotrajna i zahtijeva velike količine reagensa. U posljednja dva desetljeća razvijene su i visokoprotočne metode koje se temeljene na masenoj spektrometriji, fluorescenciji i luminescenciji. Ove su metode brže i koriste manji volumen za analizu, a samim tim i manji volumen reagensa od HPLC-a, te pružaju mogućnost izvođenja višestrukih ispitivanja u formatu mikrotitarske pločice s 96 jažica. Također su razvijene i visokoprotočne radiometrijske metode, koje koriste scintilacijske brojače. Međutim, i ove metode imaju svoje nedostatke. Fluorimetrija je ograničena niskom specifičnošću supstrata za pojedini enzim, prigušivanjem i interferencijom ispitivanih spojeva, dok primjenu luminometrije mogu ograničiti potrebni reagensi za obradu i gašenje. Za radiometriju najveći problem predstavlja velika količina radioobilježenih tvari, te odlaganje radioaktivnog otpada.

U ovom je radu prikazano kako su navedene metode primijenjene za praćenje metaboličke aktivnosti humanih CYP enzima, s naglaskom na najvažnije enzime u metabolizmu lijekova: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4. Prikazana su i ispitivanja u kojima se pratila aktivnost više CYP enzima, pojedinačnim ili koktel pristupom. Upotrebom odgovarajućeg izvora enzima *in vitro* (jetrenih mikrosoma, rekombinantnih enzima ili hepatocita) ili na kliničkim ispitanicima *in vivo*, uz odgovarajuće marker supstrate, metabolička aktivnost praćena je u svrhu fenotipizacije radi optimizacije terapije, utvrđivanja odnosa fenotipa i genotipa, probira modulacijskih učinaka kandidata za nove lijekove, proučavanja inhibicijskog ili induktivnog djelovanja lijekova, ljekovitog bilja, sastojaka hrane i prehrambenih aditiva, te usporedbe postojećih i validacije novih markera i pristupa.

6. LITERATURA

Abraham K, Geusau A, Tosun Y, Helge H, Bauer S, Brockmüller J. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: insights into the measurement of hepatic cytochrome P450 1A2 induction. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72, 163-174.

Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999, 353, 717-719.

Ansele JH, Thakker DR. High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism. *J Pharm Sci*, 2004, 93, 239-255.

Auld DS, Veith H, Cali JJ. Bioluminescent Assays for Cytochrome P450 Enzymes. *Methods Mol Biol*, 2013, 987, 1-9.

Awortwe C, Manda VK, Avonto C, Khan SI, Khan IA, Walker LA, Bouic PJ, Rosenkranz B. In Vitro Evaluation of Reversible and Time-Dependent Inhibitory Effects of *Kalanchoe crenata* on CYP2C19 and CYP3A4 Activities. *Drug Metab Lett*, 2015, 9, 48-62.

Basheer L, Schultz K, Fichman M, Kerem Z. Use of In Vitro and Predictive In Silico Models to Study the Inhibition of Cytochrome P4503A by Stilbenes. *PLoS One*, 2015, 10, članak br. e0141061.

Berger B, Bachmann F, Duthaler U, Krähenbühl S, Haschke M. Cytochrome P450 Enzymes Involved in Metoprolol Metabolism and Use of Metoprolol as a CYP2D6 Phenotyping Probe Drug. *Front Pharmacol*, 2018, 9, članak br. 774.

Božina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic Polymorphism of Metabolic Enzymes P450 (CYP) as a Susceptibility Factor for Drug Response, Toxicity, and Cancer Risk. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009, 60, 217-242.

Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lawsen MF, Kadlubar FF. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics*, 1992, 2, 116-27.

Cali JJ, Ma D, Sobol M, Simpson DJ, Frackman S, Good TD, Daily WJ, Liu D. Luminogenic cytochrome P450 assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2, 629-645.

Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA. Effect of common solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos*, 1998, 26, 1-4.

CPIC terapijske smjernice za supstrate CYP2D6, 2020., <https://cpicpgx.org/cyp2d6-cpic-guidelines/>, pristupljeno 2.7.2020.

Delaporte E, Rodrigues AD, Cytochrome P450 Assays. *Curr Protoc Pharmacol*, 2001, 15, 3.9.1-3.9.32.

Delaporte E, Slaughter DE, Egan MA, Gatto GJ, Santos A, Shelley J, Price E, Howells L, Dean DC, Rodrigues AD. The Potential for CYP2D6 Inhibition Screening Using a Novel Scintillation Proximity Assay-Based Approach. *J Biomol Screen*, 2001, 6, 225-231.

Derungs A, Donzelli M, Berger B, Noppen C, Krähenbühl S, Haschke M. Effects of Cytochrome P450 Inhibition and Induction on the Phenotyping Metrics of the Basel Cocktail: A Randomized Crossover Study. *Clin Pharmacokinet*, 2016, 55, 79-91.

Desta Z, Modak A, Nguyen PD, Lemler SM, Kurogi Y, Li L, Flockhart DA. Rapid identification of the hepatic cytochrome P450 2C19 activity using a novel and noninvasive [¹³C]pantoprazole breath test. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329, 297-305.

Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet*, 2002, 41, 913-58.

Dickmann LJ, Locuson CW, Jones JP, Rettie AE. Differential roles of Arg97, Asp293, and Arg108 in enzyme stability and substrate specificity of CYP2C9. *Mol Pharmacol*, 2004, 65, 842-850.

Di Marco A, Cellucci A, Chaudhary A, Fonsi M, Laufer R. High-throughput radiometric CYP2C19 inhibition assay using tritiated (S)-mephenytoin. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35, 1737-1743.

Dobrinas M, Cornuz J, Oneda B, Kohler Serra M, Puhl M, Eap CB. Impact of smoking, smoking cessation, and genetic polymorphisms on CYP1A2 activity and inducibility. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90, 117-25.

Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32, 699-706.

Fang ZZ, Zhang YY, Ge GB, Liang SC, Sun DX, Zhu LL, Dong PP, Cao YF, Yang L. Identification of cytochrome P450 (CYP) isoforms involved in the metabolism of corynoline, and assessment of its herb-drug interactions. *Phytother Res*, 2011, 25, 256-63.

Fasinu PS, Bouic PJ, Rosenkranz B. The inhibitory activity of the extracts of popular medicinal herbs on CYP1A2, 2C9, 2C19 and 3A4 and the implications for herb-drug interaction. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11, 54-61.

Flora DR, Tracy TS. Development of an in vitro system with human liver microsomes for phenotyping of CYP2C9 genetic polymorphisms with a mechanism-based inactivator. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40, 836-842.

Fontana RJ, deVries TM, Woolf TF, Knapp MJ, Brown AS, Kaminsky LS, Tang BK, Foster NL, Brown RR, Watkins PB. Caffeine based measures of CYP1A2 activity correlate with oral clearance of tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, 46, 221-228.

Fowler S, Zhang H. In vitro evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions. *AAPS J*, 2008, 10, 410-424.

Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007, 63, 321-33.

Frye RF, Branch RA. Improved high-performance liquid chromatographic determination of debrisoquine and 4-hydroxydebrisoquin in human urine following direct injection. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 677, 178-182.

Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, Branch RA. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 80, 235-45.

Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and saliva. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 109-116.

Gao N, Qi B, Liu FJ, Fang Y, Zhou J, Jia LJ, Qiao HL. Inhibition of baicalin on metabolism of phenacetin, a probe of CYP1A2, in human liver microsomes and in rats. *PLoS One*, 2014, 9, članak. br. e89752.

Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med*, 2004, 351, 2827-2831.

Gerin B, Dell'Aiera S, Richert L, Smith S, Chanteux H. Assessment of cytochrome P450 (1A2, 2B6, 2C9 and 3A4) induction in cryopreserved human hepatocytes cultured in 48-well plates using the cocktail strategy. *Xenobiotica*, 2013, 43, 320-335.

Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38, 1147-1158.

Glue P, Clement RP. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism--basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol*, 1999, 19, 309-323.

Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52, 349-355.

Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Jiménez N, Vicente Castell J, Donato MT. Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica*, 2006, 36, 457-472.

Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Chen G, Weemhoff JL, Jen C, Kelley CJ, LeDuc BW, Zinny MA. Time course of recovery of cytochrome p450 3A function after single doses of grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 74, 121-129.

Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perloff ES, Luo Y, Harmatz JS, Zinny MA. Interaction of flurbiprofen with cranberry juice, grape juice, tea, and fluconazole: in vitro and clinical studies. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79, 125-133.

Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 70-83.

Guengerich FP, Rendic S. Update information on drug metabolism systems--2009, part I. *Curr Drug Metab*, 2010, 11, 1-3.

Gurley BJ, Swain A, Hubbard MA, Williams DK, Barone G, Hartsfield F, Tong Y, Carrier DJ, Cheboyina S, Battu SK. Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and Echinacea. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52, 755-763.

Hanley MJ, Masse G, Harmatz JS, Court MH, Greenblatt DJ. Pomegranate juice and pomegranate extract do not impair oral clearance of flurbiprofen in human volunteers: divergence from in vitro results. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92, 651-657.

Hanley MJ, Masse G, Harmatz JS, Cancalon PF, Dolnikowski GG, Court MH, Greenblatt DJ. Effect of blueberry juice on clearance of buspirone and flurbiprofen in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75, 1041-1052.

Hansen LL, Brosen K. Quantitative determination of tolbutamide and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography and UV detection. *Ther Drug Monit*, 1999, 21, 664-671.

Harvey AT, Preskorn SH. Interactions of serotonin reuptake inhibitors with tricyclic antidepressants. *Arch. Gen. Psychiat*, 1995, 52, 783-784.

Hertz DL, Snaveley AC, McLeod HL, Walko CM, Ibrahim JG, Anderson S, Weck KE, Magrinat G, Olajide O, Moore S, Raab R, Carrizosa DR, Corso S, Schwartz G, Peppercorn JM, Evans JP, Jones DR, Desta Z, Flockhart DA, Carey LA, Irvin WJ Jr. In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. *Br J Clin Pharmacol*, 2015, 80, 1122-1130.

Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, Greenblatt DJ. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28, 1176-1183.

Homberg JC, Andre C, Abuaf N. A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM2) in tienilic acid-induced hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1984, 55, 561-570.

Hong CC, Tang BK, Rao V, Agarwal S, Martin L, Tritchler D, Yaffe M, Boyd NF. Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res*, 2004, 6, 338-351.

Hukkanen J. Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012, 5, 569-585.

Hutzler JM, Frye RF, Tracy TS. Sensitive and specific high performance liquid chromatographic assay for 4'-hydroxyflurbiprofen and flurbiprofen in human urine and plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 749, 119-125.

Imai S, Yoshioka Y, Morishita Y, Yoshida T, Uji M, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro. *Nanoscale Res Lett*, 2014, 9, članak br. 651.

Ince I, de Wildt SN, Wang C, Peeters MY, Burggraaf J, Jacqz-Aigrain E, van den Anker JN, Tibboel D, Danhof M, Knibbe CA. A novel maturation function for clearance of the cytochrome P450 3A substrate midazolam from preterm neonates to adults. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52, 555-565.

Interakcije lijekova, Flockhart Table TM, 2020., <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx>, pristupljeno 29.6.2020.

Ishizawa Y, Yasui-Furukori N, Takahata T, Sasaki M, Tateishi T. The effect of aging on the relationship between the cytochrome P450 2C19 genotype and omeprazole pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44, 1179-1189.

Jeong S, Nguyen PD, Desta Z. Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 541-551.

Jones DR, Kim SY, Guderyon M, Yun CH, Moran JH, Miller GP. Hydroxywarfarin metabolites potently inhibit CYP2C9 metabolism of S-warfarin. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23, 939-945.

Jurica J, Sulcova A. Determination of Cytochrome P450 Metabolic Activity Using Selective Markers. *Topics on Drug Metabolism*, 2012, James Paxton, IntechOpen.

Kamdem LK, Liu Y, Stearns V, Kadlubar SA, Ramirez J, Jeter S, Shahverdi K, Ward BA, Ogburn E, Ratain MJ, Flockhart DA, Desta Z. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 70, 854-869.

Kanebratt KP, Diczfalusy U, Bäckström T, Sparve E, Bredberg E, Böttiger Y, Andersson TB, Bertilsson L. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 84, 589-594.

Kapelyukh Y, Henderson CJ, Scheer N, Rode A, Wolf CR. Defining the Contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to Drug Metabolism Using Humanized CYP1A1/1A2 and CYP1A1/CYP1A2 Knockout Mice. *Drug Metab Dispos*, 2019, 47, 907-918.

Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38, 92-99.

Kenworthy KE, Bloomer JC, Clarke SE, Houston JB. CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, 48, 716-727.

Kim YH, Bae YJ, Kim HS, Cha HJ, Yun JS, Shin JS, Seong WK, Lee YM, Han KM. Measurement of Human Cytochrome P450 Enzyme Induction Based on Mesalazine and Mosapride Citrate Treatments Using a Luminescent Assay. *Biomol Ther*, 2015, 23, 486-492.

Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom*, 2003, 38, 357-372.

Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker AL, Schaffer DD, Josephs H. The caffeine CO₂ breath test: dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther*, 1982, 32, 261-269.

Kozakai K, Yamada Y, Oshikata M, Kawase T, Suzuki E, Haramaki Y, Taniguchi H. Cocktail-substrate approach-based high-throughput assay for evaluation of direct and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 29, 198-207.

Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43, 84-91.

Lee KS, Kim SK. Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. *J Appl Toxicol*, 2013, 33, 100-108.

Leeder JS, Pearce RE, Gaedigk A, Modak A, Rosen DI. Evaluation of a [¹³C]-dextromethorphan breath test to assess CYP2D6 phenotype. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48, 1041-1051.

Levy RH. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia*, 1995, 36, S8-S13.

Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements-a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65, 365-375.

McGready R, Stepniewska K, Seaton E, Cho T, Cho D, Ginsberg A, Edstein MD, Ashley E, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. Pregnancy and use of oral contraceptives reduces the biotransformation of proguanil to cycloguanil. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 59, 553-557.

Michaels S, Wang MZ. The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42, 1241-1251.

Moody GC, Griffin SJ, Mather AN, McGinnity DF, Riley RJ. Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential. *Xenobiotica*, 1999, 29, 53-75.

Moskaleva NE, Zgoda VG. Modern methods of cytochrome P450 analysis. *Biochem Moscow Suppl*, 2013, B7, 124-135.

Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev*, 2018, 70, 384-411.

Otyepka M, Berka K, Anzenbacher P. Is There a Relationship Between the Substrate Preferences and Structural Flexibility of Cytochromes P450? *Current Drug Metabolism*, 2011, 13, 130-142.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, 2006, 34, 880-886.

Palmer JL, Scott RJ, Gibson A, Dickins M, Pleasance S. An interaction between the cytochrome P450 probe substrates chlorzoxazone (CYP2E1) and midazolam (CYP3A). *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52, 555-561.

Parkinson, A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Pathol*, 1996, 24, 45-57.

Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*, 1998, 28, 1203-1253.

Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, 2008, 82, 667-715.

Pillai VC, Strom SC, Caritis SN, Venkataramanan R. A sensitive and specific CYP cocktail assay for the simultaneous assessment of human cytochrome P450 activities in primary cultures of human hepatocytes using LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 74, 126-132.

Poulos TL. Heme enzyme structure and function. *Chem Rev*, 2014, 114, 3919-3962.

Prough RA, Burke MD, Mayer RT. Direct fluorometric methods for measuring mixed function oxidase activity. *Methods Enzymol*, 1978, 52, 372-377.

Qu Q, Qu J, Han L, Zhan M, Wu LX, Zhang YW, Zhang W, Zhou HH. Inhibitory effects of phytochemicals on metabolic capabilities of CYP2D6(*)1 and CYP2D6(*)10 using cell-based models in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35, 685-696.

Rendic S, Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes 5-51 as targets of drugs and natural and environmental compounds: mechanisms, induction, and inhibition - toxic effects and benefits. *Drug Metab Rev*, 2018, 50, 256-342.

Rendic S, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28, 38-42.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132-172.

Rhodes SP, Otten JN, Hingorani GP, Hartley DP, Franklin RB. Simultaneous assessment of cytochrome P450 activity in cultured human hepatocytes for compound-mediated induction of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, 63, 223-226.

Riley RJ, Howbrook D. In vitro analysis of the activity of the major human hepatic CYP enzyme (CYP3A4) using [N-methyl-14C]-erythromycin. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1997, 38, 189-193.

Rodrigues AD. Use of in vitro human metabolism studies in drug development. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48, 2147-2156.

Rodrigues AD, Kukulka MJ, Surber BW, Thomas SB, Uchic JT, Rotert GA, Michel G, Thome-Kromer B, Machinist JM. Measurement of liver microsomal cytochrome P450 (CYP2D6) activity using [O-methyl-14C]dextromethorphan. *Anal Biochem*, 1994, 219, 309-320.

Rodrigues AD, Kukulka MJ, Roberts EM, Ouellet D, Rodgers TR. [O-methyl ¹⁴C]naproxen O-demethylase activity in human liver microsomes: Evidence for the involvement of cytochrome P4501A2 and P4502C9/10. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24, 126-136.

Rodrigues AD, Surber BW, Yao Y, Wong SL, Roberts EM. [O-ethyl ¹⁴C]phenacetin O-deethylase activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1997, 25, 1097-1100.

Safgren SL, Suman VJ, Kosel ML, Gilbert JA, Buhrow SA, Black JL, Northfelt DW, Modak AS, Rosen D, Ingle JN, Ames MM, Reid JM, Goetz MP. Evaluation of CYP2D6 enzyme activity using a ¹³C-dextromethorphan breath test in women receiving adjuvant tamoxifen. *Pharmacogenet Genomics*, 2015, 25, 157-63.

Sausville LN, Gangadhariah MH, Chiusa M, Mei S, Wei S, Zent R, Luther JM, Shuey MM, Capdevila JH, Falck JR, Guengerich FP, Williams SM, Pozzi A. The Cytochrome P450 Slow Metabolizers CYP2C9*2 and CYP2C9*3 Directly Regulate Tumorigenesis via Reduced Epoxyeicosatrienoic Acid Production. *Cancer Res*, 2018, 78, 4865-4877.

Scott SA, Tan Q, Baber U, Yang Y, Martis S, Bander J, Kornreich R, Hulot JS, Desnick RJ. An allele-specific PCR system for rapid detection and discrimination of the CYP2C19*4A, *4B, and *17 alleles: implications for clopidogrel response testing. *J Mol Diagn*, 2013, 15, 783-789.

Soldin OP, Chung SH, Mattison DR. Sex differences in drug disposition. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011, članak br. 187103.

Stage TB, Graff M, Wong S, Rasmussen LL, Nielsen F, Pottegård A, Brøsen K, Kroetz DL, Khojasteh SC, Damkier P. Dicloxacillin induces CYP2C19, CYP2C9 and CYP3A4 in vivo and in vitro. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84, 510-519.

Stiborová M, Levová K, Bárta F, Shi Z, Frei E, Schmeiser HH, Nebert DW, Phillips DH, Arlt VM. Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol Sci*, 2012, 125, 345-358.

Streetman DS, Bertino JS, Jr, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, 2000, 10, 187-216.

Tai G, Dickmann LJ, Matovic N, DeVoss JJ, Gillam EM, Rettie AE. Re-engineering of CYP2C9 to probe acid-base substrate selectivity. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36, 1992-1997.

Tanaka M, Ohkubo T, Otani K, Suzuki A, Kaneko S, Sugawara K, Ryokawa Y, Hokusui H, Yamamori S, Ishizaki T. Metabolic disposition of pantoprazole, a proton pump inhibitor, in relation to S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype and genotype. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 62, 619-628.

Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W. Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther*, 1991, 49, 648-657.

Tang BK, Zhou Y, Kadar D, Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 117-124.

Tang C, Shou M, Rodrigues AD. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P40 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metab. Dispos*, 2000, 28, 567-572.

Tay-Sontheimer J, Shireman LM, Beyer RP, Senn T, Witten D, Pearce RE, Gaedigk A, Gana Fomban CL, Lutz JD, Isoherranen N, Thummel KE, Fiehn O, Leeder JS, Lin YS. Detection of an endogenous urinary biomarker associated with CYP2D6 activity using global metabolomics. *Pharmacogenomics*, 2014, 15, 1947-1962. Erratum in: *Pharmacogenomics*, 2015, 16, 913.

Thacker DL, Modak A, Flockhart DA, Desta Z. Is (+)-[13C]-pantoprazole better than (±)-[13C]-pantoprazole for the breath test to evaluate CYP2C19 enzyme activity?. *J Breath Res*, 2013, 7, članak br. 016001.

Tian DD, Natesan S, White JR Jr, Paine MF. Effects of Common CYP1A2 Genotypes and Other Key Factors on Intraindividual Variation in the Caffeine Metabolic Ratio: An Exploratory Analysis. *Clin Transl Sci*, 2019, 12, 39-46.

Tolonen A, Petsalo A, Turpeinen M, Uusitalo J, Pelkonen O. In vitro interaction cocktail assay for nine major cytochrome P450 enzymes with 13 probe reactions and a single LC/MSMS run: analytical validation and testing with monoclonal anti-CYP antibodies. *J Mass Spectrom*, 2007, 42, 960-966.

Tomalik-Scharte D, Maiter D, Kirchheiner J, Ivison HE, Fuhr U, Arlt W. Impaired hepatic drug and steroid metabolism in congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency. *Eur J Endocrinol*, 2010, 163, 919-924.

Tracy TS, Hutzler JM, Haining RL, Rettie AE, Hummel MA, Dickmann LJ. Polymorphic variants (CYP2C9*3 and CYP2C9*5) and the F114L active site mutation of CYP2C9: effect on atypical kinetic metabolism profiles. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 385-390.

Trenk D, Kristensen SD, Hochholzer W, Neumann FJ. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonists in clinical trials. *Thromb Haemost*, 2013, 109, 834-845.

Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, Boulenc X. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol*, 2009, 68, 928-935.

Ung YT, Ong CE, Pan Y. Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *High Throughput*, 2018, 7, 29.

Urry E, Jetter A, Landolt HP. Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13, 66.

Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20, 277-281.

Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D, Birkett DJ. Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers. *Clin Pharmacol Ther*, 1990, 47, 403-411.

Vogl S, Lutz RW, Schönfelder G, Lutz WK. CYP2C9 genotype vs. metabolic phenotype for individual drug dosing--a correlation analysis using flurbiprofen as probe drug. *PLoS One*, 2015, 10, članak br. e0120403.

Walsky RL, Obach RS. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(6), 647-660.

Wanwimolruk S, Prachayasittikul V. Variable inhibitory effect of herbal supplements of different brands on human P450 CYP1A2. *EXCLI J*, 2012, 11, 7-19.

Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 2003, 349, 529-357.

Wells PS, Holbrook AM, Crowther NR, Hirsh J. Interactions of warfarin with drugs and food. *Ann Intern Med*, 1994, 121, 676-683.

Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Eng J Med*, 2005, 352, 2211-2221.

Williamson KM, Patterson JH, McQueen RH, Adams KF, Pieper JA. Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 63, 316-323.

Wohlfarth A, Naue J, Lutz-Bonengel S, Dresen S, Auwärter V. Cocktail approach for in vivo phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: development of an effective sampling, extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping. *J Clin Pharmacol*, 2012, 52, 1200-1214.

Wu JJ, Ge GB, He YQ, Wang P, Dai ZR, Ning J, Hu LH, Yang L. Gomisin A is a Novel Isoform-Specific Probe for the Selective Sensing of Human Cytochrome P450 3A4 in Liver Microsomes and Living Cells. *AAPS J*, 2016, 18, 134-145.

Yamaori S, Okamoto Y, Yamamoto I, Watanabe K. Cannabidiol, a major phytocannabinoid, as a potent atypical inhibitor for CYP2D6. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39, 2049-2056.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004, 369, 23-37.

Zlokarnik G, Grootenhuis PD, Watson JB. High throughput P450 inhibition screens in early drug discovery. *Drug Discov Today*, 2005, 10, 1443-1450.

Zhang N, Liu J, Chen Z, Dou W. In vitro inhibitory effects of kaempferitrin on human liver cytochrome P450 enzymes. *Pharm Biol*, 2019, 57, 571-576.

Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab*, 2008, 9, 310-322.

7. SAŽETAK

Citokrom P450 (CYP) je superporodica enzima koja ima ključnu ulogu u metabolizmu lijekova i brojnih ksenobiotika uvođenjem hidrofilnih skupina u njihove molekulske strukture. Glavni CYP enzimi uključeni u metabolizam lijekova su CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 i CYP2C19. Genetski predodređene razlike ili utjecaj vanjskih čimbenika mogu uzrokovati promjenu enzimske aktivnosti citokroma P450, što može dovesti do različitih učinaka, uključujući neželjene i štetne reakcije lijekova ili gubitak terapijskog djelovanja. Ovaj rad daje pregled i usporedbu najčešće korištenih metoda za praćenje metaboličke aktivnosti humanih citokrom P450 enzima. Opisan je opći tijek postupaka analize, te prednosti i ograničenja metoda koje se temelje na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC), koja je najčešće spregnuta sa spektrometrijom masa (MS), a zatim i metoda koje se temelje na fluorescenciji, luminescenciji ili radioaktivnosti. Prikazana je njihova primjena u *in vitro* i u *in vivo* praćenju metaboličke aktivnosti humanih citokrom P450 enzima uz specifične marker supstrate ili inhibitore, koja su provedena u svrhu fenotipizacije radi optimizacije terapijskih ishoda, utvrđivanja odnosa fenotipa i genotipa, probira modulacijskih učinaka kandidata za nove lijekove, proučavanja inhibicijskog ili induktivnog djelovanja lijekova, ljekovitog bilja, sastojaka hrane i prehrambenih aditiva, te usporedbe postojećih i validacije novih pristupa.

7. SUMMARY

Cytochrome P450 (CYP) is a superfamily of enzymes that plays a key role in the metabolism of drugs and numerous xenobiotics by introducing hydrophilic groups into their molecular structures. The major CYP enzymes involved in drug metabolism are CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, and CYP2C19. Genetically determined differences or modulation of cytochrome P450 enzyme activity can lead to a variety of effects, including adverse drug reactions or loss of therapeutic effects. This paper provides an overview and comparison of the most commonly used methods for assessing the metabolic activity of cytochrome P450 enzymes. The general work flow of these methods is described, as well as the advantages and limitations of each method. These methods include high performance liquid chromatography (HPLC)-based methods, which are most often coupled with mass spectrometry (MS); fluorescence-based; luminescence-based; and radioactivity-based methods. Various studies where these methods have been applied for *in vitro* and *in vivo* evaluation of cytochrome P450 metabolic activity using specific markers are presented in this paper. Numerous activity measurements have been performed: for the purpose of phenotyping cytochrome P450 enzymes to optimize therapeutic outcomes; to determine the relationship between phenotype and genotype; for screening of modulatory effects of drug candidates and studying the inhibitory or inductive effects of drugs, herbs, food ingredients and additives; and also for comparisons of existing approaches and validation of new approaches for cytochrome P450 activity assessment.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ANALITIČKE METODE ZA PRAĆENJE METABOLIČKE AKTIVNOSTI HUMANIH CITOKROM P450 ENZIMA

Dominik Dautović

SAŽETAK

Citokrom P450 (CYP) je superporodica enzima koja ima ključnu ulogu u metabolizmu lijekova i brojnih ksenobiotika uvođenjem hidrofilnih skupina u njihove molekulske strukture. Glavni CYP enzimi uključeni u metabolizam lijekova su CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 i CYP2C19. Genetski predodređene razlike ili utjecaj vanjskih čimbenika mogu uzrokovati promjenu enzimske aktivnosti citokroma P450, što može dovesti do različitih učinaka, uključujući neželjene i štetne reakcije lijekova ili gubitak terapijskog djelovanja. Ovaj rad daje pregled i usporedbu najčešće korištenih metoda za praćenje metaboličke aktivnosti humanih citokrom P450 enzima. Opisan je opći tijek postupaka analize, te prednosti i ograničenja metoda koje se temelje na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC), koja je najčešće spregnuta sa spektrometrijom masa (MS), a zatim i metoda koje se temelje na fluorescenciji, luminescenciji ili radioaktivnosti. Prikazana je njihova primjena u *in vitro* i u *in vivo* praćenju metaboličke aktivnosti humanih citokrom P450 enzima uz specifične marker supstrate ili inhibitore, koja su provedena u svrhu fenotipizacije radi optimizacije terapijskih ishoda, utvrđivanja odnosa fenotipa i genotipa, probira modulacijskih učinaka kandidata za nove lijekove, proučavanja inhibicijskog ili induktivnog djelovanja lijekova, ljekovitog bilja, sastojaka hrane i prehrambenih aditiva, te usporedbe postojećih i validacije novih pristupa.

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

Rad sadrži: 79 stranica, 27 grafičkih prikaza, 18 tablica i 135 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citokrom P450, analiza, metode, metabolizam, inhibicija, indukcija

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

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

Dr. sc. Hrvoje Rimac, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Goran Benković, *viši stručni savjetnik, Agencija za lijekove i medicinske proizvode.*

Rad prihvaćen: Listopad, 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study program: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYTICAL METHODS FOR ASSESSING THE METABOLIC ACTIVITY OF HUMAN CYTOCHROME P450 ENZYMES

Dominik Dautović

SUMMARY

Cytochrome P450 (CYP) is a superfamily of enzymes that plays a key role in the metabolism of drugs and numerous xenobiotics by introducing hydrophilic groups into their molecular structures. The major CYP enzymes involved in drug metabolism are CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, and CYP2C19. Genetically determined differences or modulation of cytochrome P450 enzyme activity can lead to a variety of effects, including adverse drug reactions or loss of therapeutic effects. This paper provides an overview and comparison of the most commonly used methods for assessing the metabolic activity of cytochrome P450 enzymes. The general work flow of these methods is described, as well as the advantages and limitations of each method. These methods include high performance liquid chromatography (HPLC)-based methods, which are most often coupled with mass spectrometry (MS); fluorescence-based; luminescence-based; and radioactivity-based methods. Various studies where these methods have been applied for *in vitro* and *in vivo* evaluation of cytochrome P450 metabolic activity using specific markers are presented in this paper. Numerous activity measurements have been performed: for the purpose of phenotyping cytochrome P450 enzymes to optimize therapeutic outcomes; to determine the relationship between phenotype and genotype; for screening of modulatory effects of drug candidates and studying the inhibitory or inductive effects of drugs, herbs, food ingredients and additives; and also for comparisons of existing approaches and validation of new approaches for cytochrome P450 activity assessment.

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

Thesis includes: 79 pages, 27 figures, 18 tables and 135 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cytochrome P450, analysis, methods, metabolism, inhibition, induction

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

Reviewers: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Hrvoje Rimac, Ph.D., *Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Goran Benković, Ph.D., *Senior Expert Advisor*, Agency for Medicinal Products and Medical Devices.

The thesis was accepted: October, 2020.