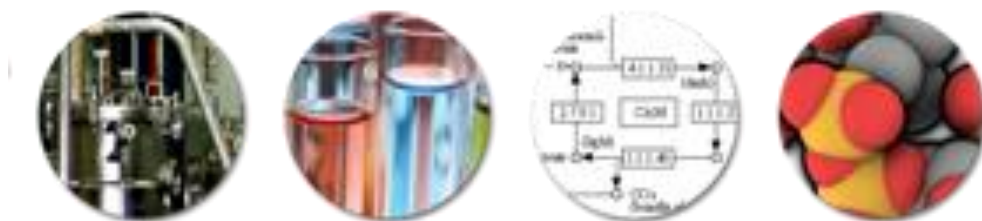


Емилија Јаневиќ-Ивановска; Даринка Ѓоргиева Ацкова

## АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ



Штип, 2015



Емилија Јаневиќ-Ивановска; Даринка Ѓоргиева Ацкова

АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МЕТАБОЛИТИ НА  
ЛЕКОВИ

**Автори:**

Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска; Асс. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

**АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ**

**Рецензенти:**

Проф. д-р Рубин Гулабоски; Проф. д-р Валентин Мирчески

**Лектор:**

Силвана Андонова Иванова

**Техничко уредување:**

Даринка Ѓоргиева Ацкова

**Издавач:**

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Тираж:**

Електронско издание

CIP - Каталогизација во публикација  
Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје  
615.015.4.074

ЈАНЕВИЌ-Ивановска, Емилија  
Аналитички методи за определување метаболити на лекови  
[Електронски извор] / Емилија Јаневиќ-Ивановска, Даринка Ѓоргиева  
Ацкова. - Текст, граф. прикази. - Штип : Универзитет "Гоце Делчев",  
Факултет за медицински науки, 2015  
Начин на пристап (URL): <https://e-lib.ugd.edu.mk/naslovna.php>. - Наслов  
преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 30.04.2015. -  
Библиографија: стр. 78

ISBN 978-608-244-197-9

1. Ѓоргиева Ацкова, Даринка [автор]. - I. Ивановска, Емилија  
Јаневиќ- види Јаневиќ-Ивановска, Емилија  
а) Метаболити на лекови - Хемиска анализа COBISS.MK-ID 98635786

# УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска;

Асс. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

## **АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ**

Штип, 2015

## СОДРЖИНА

1. УЛОГАТА НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ ВО ОТКРИВАЊЕТО И РАЗВОЈОТ НА НОВИ ЛЕКОВИ .....	7
2. УЛОГАТА НА ФИЗИЧКО-ХЕМИСКИТЕ СВОЈСТВА НА ЛЕКОВИТЕ ЗА НИВНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ .....	12
3. ПРОТЕИНСКО ВРЗУВАЊЕ НА ЛЕКОВИТЕ ВО ПЛАЗМАТА .....	25
4. ПРВА ФАЗА ОД МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ .....	36
5. ВТОРА ФАЗА ОД МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ.....	46
6. ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОЦИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗАМ НА ЛЕКОВИ .....	51
7. СПЕЦИФИЧНИ БИОАНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИТЕ И МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ: ИМУНОЛОШКИ ТЕСТОВИ.....	54
8. <i>IN VITRO</i> ТЕХНИКИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИТЕ И МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ.....	61
9. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА ПРОЦЕНКА НА МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ.....	74

## 1. УЛОГАТА НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ ВО ОТКРИВАЊЕТО И РАЗВОЈОТ НА НОВИ ЛЕКОВИ

### 1.1. Вовед

Една од значајните улоги на фармацевтската наука е истражувањето и развојот на нови лекови. Ова како цел не е едноставно, бидејќи само мал процент од синтетизираните хемиски соединенија може да станат лекови, додека повеќето соединенија се покажуваат како несоодветни во однос на нивната ефикасност, активност или токсичност. Сите фази на откривање и развој на лековите се долготрајни процеси кои можат да траат меѓу пет и десет години во просек, па и повеќе. Овде се вклучени истражувања од многу различни дисциплини, пред се врзани за идентификување целните болести, откривање соодветни хемиски компоненти кои имаат соодветни биолошки, хемиски и фармаколошко-токсиколошки својства. Кога потенцијалниот лек е избран за развој, се изведуваат сеопфатни студии за безбедност и предклинички и клинички студии кои се со цел да обезбедат доволно податоци за поднесување барање за регистрација на нов лек.

Особено важен во откривањето и развојот на лекови е придонесот на една дисциплина, која може да биде опишана како биоанализа, фармакокинетика и метаболизам на лекови - БФМЛ (Bioanalysis, Pharmacokinetics and Drug Metabolism - BPDМ). Иако се користат и други имиња да се опише оваа дисциплина, постои широк спектар на активности кои се насочени кон истите цели - да се разбере се она што се случува со лекот откако е аплициран и да се утврди какви се последици има познавањето на судбината на дозираниот лек во однос на предложената формулацијата на лекот или режимите на дозирање и безбедност.

Оваа дисциплина се состои од три главни области кои се тесно поврзани. Биоанализата е термин кој генерално се користи да се опише квантитативното определување на активното соединение (лекот) во биолошките течности првенствено крв, плазма, серум, урина или ткивни екстракти.

Фармакокинетиката е дисциплината која ги анализира овие податоци и го дефинира бројот на параметрите кои ги опишуваат апсорпцијата, дистрибуцијата, метаболизмот и екскрецијата (затоа често се користи кратенката АДМЕ), често продолжена како (Л)АДМЕ(Т) – либерација, ослободување на активната форма од дозираната форма на местото на апсорпција и тоскичноста која може да се јави како последица на добиените метаболити и начинот на екскреција. Можноста да се следи присуството на лекот во телото и да се определи неговата елиминација е критична за разбирањето на безбедноста, дозирањето и ефикасноста на кој било лек.

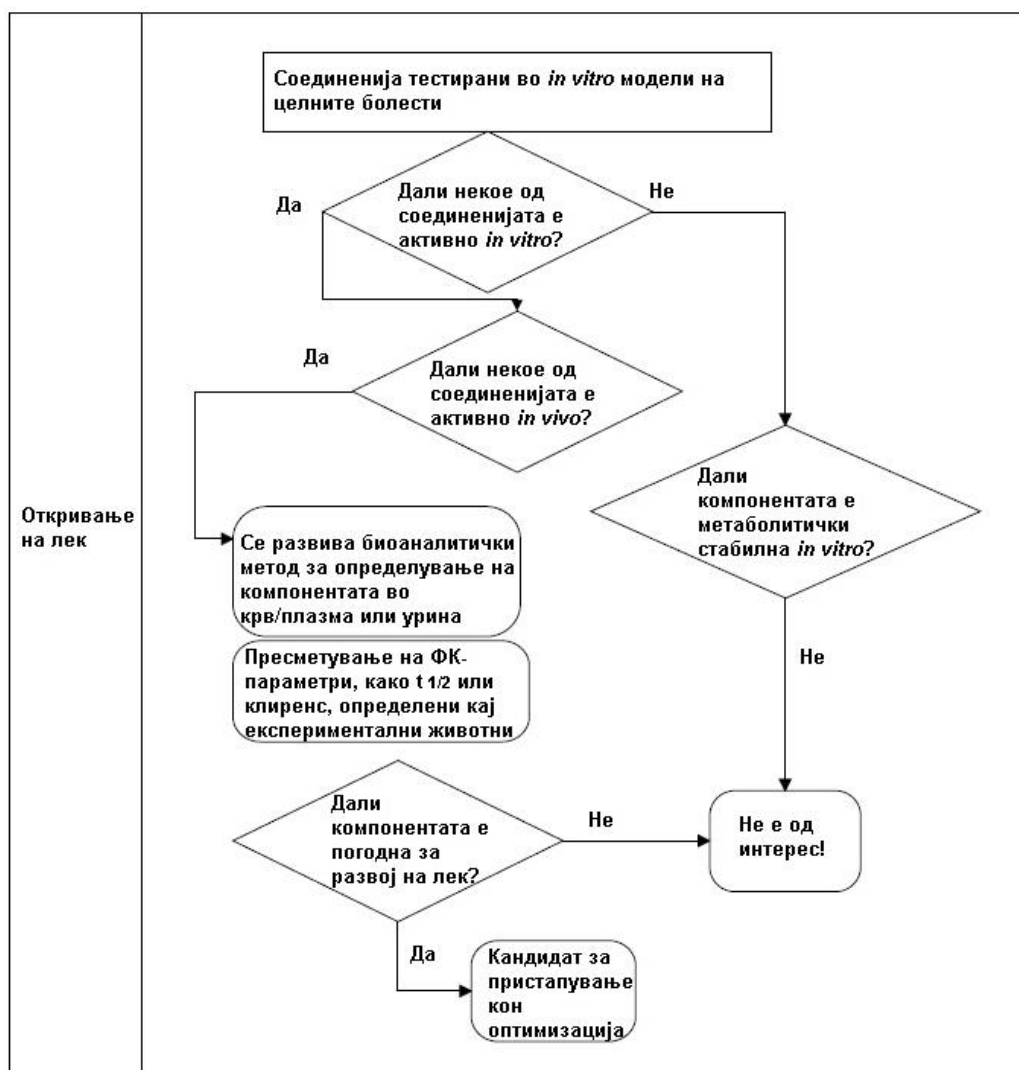
Метаболизмот на лекот е изучувањето на метаболитичките промени што лекот ги трпи. Може да се користи за да се откријат природата и патиштата на метаболизам на лекот и овие информации дозволуваат да се направат предвидувања во врска со потенцијалот за интеракции на лекот со коаплицирани лекови преку проучување на ензимите кои се вклучени во метаболизмот на лековите. Повеќе предвидувања за метаболизмот на потенцијалниот лек може да се направат со помош на базата на знаење за веќе постоечките лекови.

### 1.2. Улогата на БФМЛ во развојот на нови лекови

Улогата и техниките на БФМЛ кои се користат за поддршка на откритието и развојот на лекови се слични, но потребни се достапни информации за различни намени, па оттука и приоритетите и пристапите се разликуваат. Добиените податоци се користат за донесување одлуки и во двете фази, меѓутоа, природата на донесената одлука влијае на квалитетот и квантитетот на потребните податоци.

За откривање на нов лек, приоритет е да се испитаат голем број соединенија и да се утврди кои фармаколошки активни соединенија се најпогодни за развојот на истиот. Во практика, кога се добива соединение кое ја има потребната биолошка активност, се синтетизираат и се тестираат голем број аналози или хемиски слични соединенија за да се оптимизира склопот на карактеристики на компонентата (процесот е познат како водечка оптимизација). Слика 1.1 покажува илустрација на можно сценарио при откривањето на лек кој

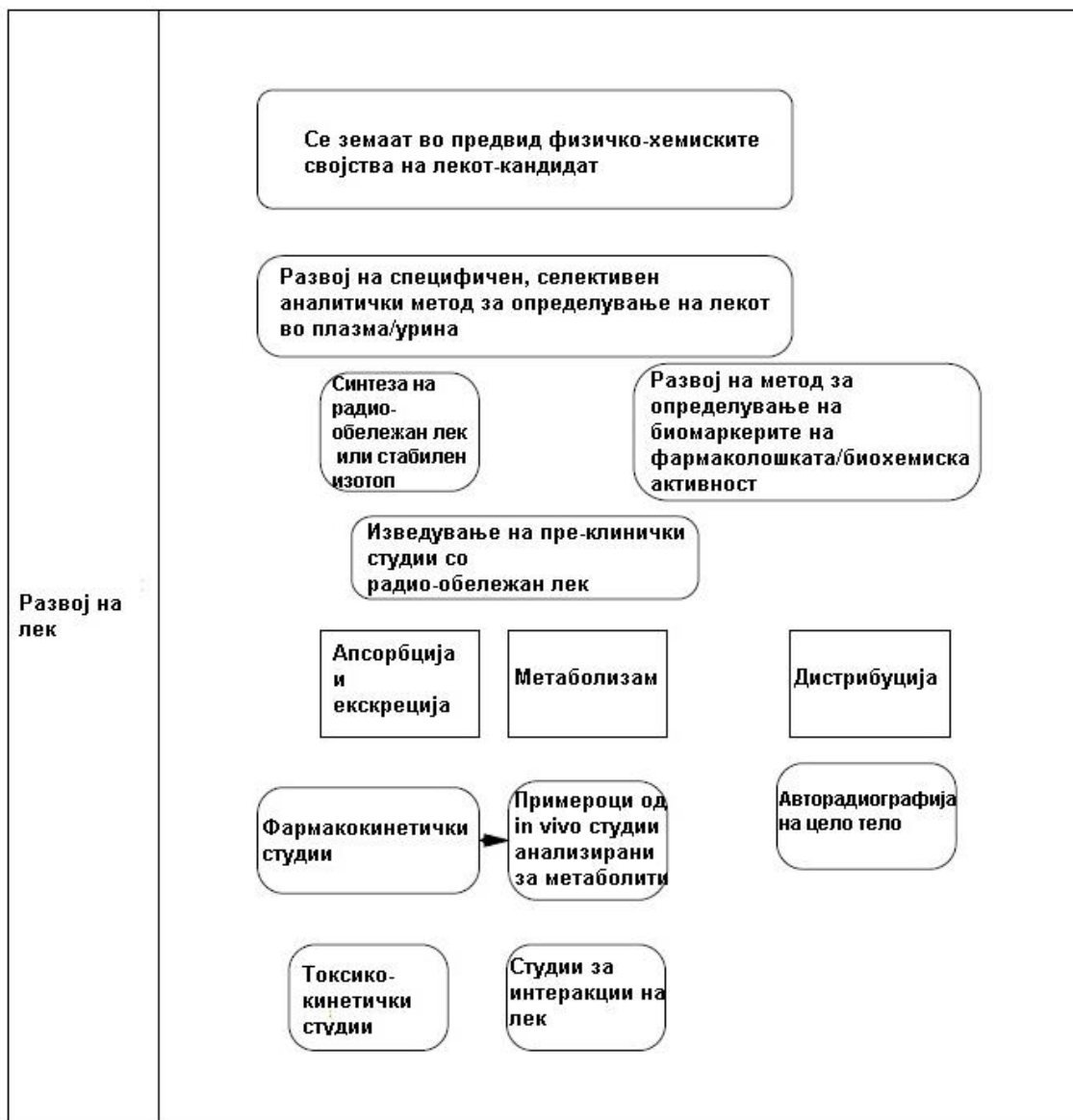
е активен во *in vitro* услови и подобрување на неговите карактеристики преку промена на хемиската структура оптимизирана за *in vivo* активност.



**Слика 1.1.** Процесен дијаграм кој ги прикажува основните чекори во откривањето на нови лекови

Во тек на развојот на нови лекови и испитувањето на активната компонента од избор се добиваат сите информации кои се однесуваат и на безбедноста на лекот и на дозата потребна за ефикасно дејство при употреба кај луѓето. Слика 1.2 ги прикажува студиите кои се спроведуваат за лекови кои се во процес на развој - точниот експериментален дизајн и приоритетите зависат од одредениот лек во развој.





Слика 1.2. Процесен дијаграм кој прикажува некои од чекорите во развојот на нови лекови.

Некои од важните особини кои треба да ги исполнува и кои се предмет на испитувањата на секое едно соединение-кандидат за нов лек се:

- **Физичко-хемиските својства:** влијаат врз апсорпцијата и метаболизмот на потенцијалниот. Тие, исто така се и предмет на интерес во развојот на аналитичките методи за испитување или за утврдување на соодветната формулација на лекот.
- **Чувствителни и специфични биоаналитички методи:** неопходни за да се овозможи следење на нивото на лековите во плазмата (системски циркулирачки нивоа) и урината (екскретитачки нивоа) при спроведувањето на клиничките студии. Овие методи исто така се користат и за следење на нивото на изложеност во предклиничките студии за безбедност на лекот. Иако аналитичките методологии што се користат во откривањето и развојот на лекови имаат потреба од различни нивоа на чувствителност и валидација, сепак основните аспекти остануваат исти. Биоаналитичкиот метод се состои од две главни компоненти:

1. Подготовка на примероците за анализа - екстракција на лекот од биолошката течност обично вклучувајќи чекор за концентрирање на примерокот со цел да се подобри осетливоста на методот, и

2. Детекција на анализот - обично по хроматографско раздвојување од други компоненти кои се присутни во биолошкиот екстракт. Техника од избор е масената спектрометрија. Во прилог на следењето на лековите постои и зголемена потреба (со откривањето на големиот број биохемиски активни соединенија) да се следат и родителските соединенија (пролекови) и биомаркерите. Техника од избор за анализа на повеќето ендогени соединенија и биомаркерите се имунолошките методи.

- **Дефинирање на фармакокинетските параметри:** Нивоата во плазмата на лековите обично се следат за да се овозможи точна пресметка на фармакокинетските параметри. Додека прелиминарните фармакокинетски податоци се добиваат при откривањето на лекот во предклиничките студии на различни животински видови, дефинитивната кинетика се добива со развојот на лекот преку спроведување експерименти со еднократна доза во предклиничките анимални студии и студии кај човечки субјекти. Овие податоци се од суштинско значење во дефинирањето на дозниот режим кај човекот и за обезбедувањето на максимален терапевтски бенефит.
- **Токсикокинетика:** За тестирање на безбедноста на лекот се користат примероци од плазма во текот на предклиничките анимални студии. Кинетиката добиена од овие податоци, често се нарекува „токсикокинетика“, бидејќи ја претставува изложеноста при повторена апликација на високи дози на лекот и овие податоци може да укажат на акумулација на лекот, инхибиција или индукција на метаболитичките механизми и слично. Во прилог на пресметката на вкупната изложеност на лекот во безбедносните студии од клучно значење е пресметка на границата на безбедност во клиничките студии како и екстраполацијата на податоците од различни студии со животни за добивање на параметрите важни кај луѓето.
- **Врска фармакокинетика-фармакодинамика:** Потребата да се следат нивоата и на лекот и на биомаркерите е важна и за процесите на откривање и за развојот на лековите. Приоритет за откритието на нов лек е да се обезбедат соодветни фармакокинетски особини на одобрениот лек и да се воспостави врска меѓу системските нивоа на лекот, фармакокинетиката (ФК) и фармакодинамиката (ФД) на лекот.
- **Испитување на протеинското врзување на лекови:** Фармаколошките и токсиколошките ефекти се производ на слободната форма на лекот во телото. Повеќето лекови во системската циркулација се, во поголема или помала мера, врзани со протеини (особено со серумските албумини).
- **Употреба на лекови обележани со радиоактивни изотопи:** Многу од студиите спроведени во фазата на развој на лекови вклучуваат употреба на лекови обележани со радиоактивни изотопи за добивање на податоците кои не се достапни во почетната фаза на откривање на лекот. Со ова се овозможува следење на апсорпцијата, дистрибуцијата, екскрецијата и метаболизмот на лекот во текот на предклиничките студии на животински модели, а онаму каде што е соодветно, и кај човекот во првата фаза на клиничките студии. Овие студии се од суштинско значење за утврдување на елиминацијата на целокупните компоненти на лекот, како и за ефикасно и детално следење на фармакокинетичките студии во фазата на дистрибуција која е битен параметар во пресметувањето на елиминацијата.

Почетните експерименти се познати и како „екскрециони рамнотежни студии“. Се изведуваат така што по апликацијата на лек обележан со радиоактивни изотопи, се собираат урина, фецес и издишан воздух во текот на 7-дневен период за да се измери процентот на елиминираната доза. Екскретите се користат да се испита радиоактивната форма и да се идентификуваат метаболитите на лекот.

Освен тоа, се користи и автордиографија на целото тело за следење на дистрибуцијата на радиоактивноста во органите и временскиот период на елиминација. Важно е да се идентификуваат метаболитите на лекот и да се покаже дали метаболитите кои биле

присутни во предклиничките анимални студии кои се користат во тестирањето на токсичност се истите како и оние што се детектирани и кај човекот.

Идентификацијата на метаболитите вклучува екстракција од биолошкиот материјал на лекот обележан со радиоактивен изотоп и употреба на спектрометриски метод за идентификација. Во последниве години, развојот на нуклеарната магнетна резонанца или NMR спектроскопијата поврзани со хроматографски системи и масени спектрометри направија револуција во можноста да се идентификуваат метаболитите на лекови без долготрајна екстракција и од многу помали количини материјал отколку претходно.

- **Ензими од Фаза I и Фаза II:** Главните правци на метаболизмот и ензимските системи кои се вклучени во нив се добро документирани иако ова е област во континуиран развој, особено ензимските системи од Фаза II на метаболизмот. Фаза I од метаболизмот примарно ги вклучува фазите на оксидација и хидролиза на базичната молекула, додека конјугацијата е главниот процес од Фаза II на метаболизмот. Во двата случаи, финален резултат е добивање молекула која ќе биде што повеќе поларна и на тој начин погодна за елиминација.
- ***In vitro* техники за испитување на метаболизмот:** Постојат многу *in vitro* техники кои се користат да се испита метаболизмот на соединенијата, секоја со определени предности и недостатоци. Овие *in vitro* техники заедно со алатките што ги овозможува молекуларната биологија дозволуваат да се идентификуваат ензимите вклучени во метаболизмот на лекот. Со оглед и на метаболизмот на коаплицирани лек, може да се направат претпоставки за потенцијалните лек-лек интеракции и да се намали потребата од спроведување скапи клинички студии.
- ***In vivo* техники за испитување на метаболизмот:** Многу хомологни соединенија може да покажат слични биолошки активности во текот на *in vitro* скринингот, но може да се однесуваат значително поинаку кога се администрираат *in vivo*. Биоаналитичките методи кои се користат во процесот на откривање лекови се дизајнирани да бидат повеќе генерички и погодни за следење голем број аналогни соединенија. Од методот не се бара висока чувствителност која се бара во развојот на лекови, бидејќи концентрациите на соединението коешто се употребува во фармаколошкиот скрининг и првичните *in vivo* тестирања се повисоки од оние кои се земаат предвид во клиничките студии кај луѓето. Во прилог на тоа оди и податокот дека фармакокинетските експерименти не се дизајнирани за да се добијат дефинитивни податоци туку за да се добијат компаративни податоци помеѓу серија на аналогни соединенија дозволувајќи тие да бидат искористени со друга цел, на пример, определување на плазмениот полуживот. Треба да бидат обработени само мал број примероци за да се добие оваа информација, а исто така и многу соединенија може да се коадминистрираат заедно со што ќе се намали бројот на експерименталните животни коишто би се користеле во овие студии. Квалитетот на информациите е на ниво соодветно за научна евалуација и одлучување. *In vivo* фармакокинетичките студии и *in vitro* метаболитичките студии се од суштинско значење во објаснувањето зошто некои компоненти се активни *in vitro* во фармаколошките модели, но, пак, не покажуваат или покажуваат многу сиромашна *in vivo* активност.

Проучувањето на метаболитичката судбина на лековите е од суштинско значење и важен дел од процесот на развој на лекови, истражувањето на патиштата за метаболизам на лекови, лек-лек интеракциите, лек-билки интеракциите, влијанието на генетскиот полиморфизам и други фактори кои влијаат на Фаза I и/или Фаза II од метаболизмот на лекот. За разјаснување на метаболизмот на лекови се применуваат различни *in vitro* методи (од субклеточно до ниво на органи) и *in vivo* студии. Анализата на метаболитите во сложени биолошки матрици е тешка задача, затоа се користат повеќе аналитички методи за идентификација и квантификација на метаболитите. Течната хроматографија поврзана со масена спектрометрија (LC-MS) е можеби најмоќната аналитичка алатка за скрининг и идентификација на метаболитите на лекови во биолошки матрици. Сепак, соодветната подготовка на примероците е клучен предуслов за успешна квантитативна и квалитативна биоанализа. Најчесто се користат различни пристапи за квантификација на метаболитите во биолошки примероци, почнувајќи од директна квантификација, индиректна квантификација преку родителски лек по хидролиза на метаболитите, па сè до квантификација со користење на меѓусебните врски меѓу лекот и неговите метаболити. Најчесто користен метод за квантификација е течната хроматографија во

комбинација со различни детектори како што се масен спектрометар или УВ детектор. LC-MS/MS методите се сметаат за најсоодветни за определувањето на лекови и нивните метаболити. Меѓутоа, во LC-MS/MS анализите, ефектот на матрицата и изборот на соодветни внатрешни стандарди се фактори на кои треба да се посвети поголемо внимание.

## **2. УЛОГАТА НА ФИЗИЧКО-ХЕМИСКИТЕ СВОЈСТВА НА ЛЕКОВИТЕ ЗА НИВНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ**

### **2.1. Вовед**

Со цел од лекот да се добие посакуваното фармаколошко дејство, прво мора да се постигне соодветната активност во доволно висока концентрација на местото на делување која ќе го поттикне бараниот одговор. Иако постигнатата концентрација на лекот на местото на делување е во функција на аплицираната доза, таа е последица и на тоа што се случува со лекот во на телото. Освен брзината и степенот со кој лекот се апсорбира од местото на неговата апликација, неговата дистрибуција во телото, неговата елиминација и неговата крајна екскреција од телото се, се важни фактори за неговата ефикасност.

Со проучување на фармакокинетиката на лекот, може да го идентификуваме процесот кој ја одредува неговата концентрација во телото. Фармакокинетската проценка, не е само важна за поддршка на безбедноста и проценка на ефикасноста за време на развојот на лекови, но има многу важна улога во откривањето лекови преку оптимизирање на кандидатите избрани за развој на лек.

Од големо значење за разбирањето на фармакокинетиката е и улогата на основните физичко-хемиски својства на молекулата со нејзините особини, во комбинација со природата на физиолошките процеси кои се одговорни за судбината на лекот во телото преку кои се утврдува фармакокинетскиот профил на лекот. Освен тоа, истите физичко-хемиски својства овозможуваат молекулата да се распредели во и надвор од липидните мембрани, а се важни и за нејзината способност во ин витро услови да комуницира со имобилизираната фаза при екстракција или во аналитичката хроматографска колона. Разбирањето на физичко-хемиските својства на лекот е, се разбира, непроценливо во одредувањето и оптимизирањето на аналитичките услови за испитување на лекот во биолошките течности, што е неопходен предуслов за добивање сигурни фармакокинетски податоци со висок квалитет.

### **2.2. Физичко-хемиска природа на лековите**

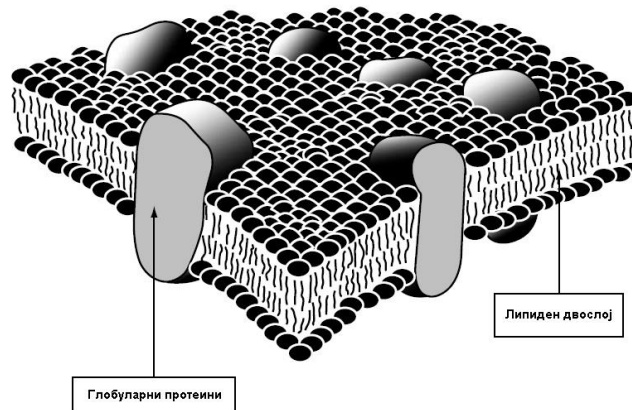
Постојат огромен број регистрирани лекови во сите земји и нивниот број секојдневно се зголемува. Иако имаат различни структури, заедничка карактеристика на овие соединенија е дека мнозинството се, без исклучок, органски молекули, каде молекулата е претежно резултат на едноставно ковалентно поврзување помеѓу јаглеродни и водородни атоми. Бидејќи рецепторите и мембраните со кои лековите комуницираат и самите се органски, тогаш ова не е изненадувачки. Исто така, бидејќи повеќето лекови се дизајнирани или да го имитираат или да го блокираат ефектот на природните молекули во телото, органската природа е предуслов за да бидат во можност да добијат пристап и да комуницираат со врзувачките места на ендогените соединенија.

Едноставните органски соединенија како што се јаглеводородите, кои по дефиниција содржат само јаглеродни и водородни атоми, се електронеутрални бидејќи валентните електрони кои ја формираат врската се подеднакво поделени помеѓу јаглеродот и водородните атоми. Спротивно на тоа, молекулите кои ги формираат специфичните рецептори содржат и хетероатоми како кислород, азот, сулфур или фосфор како дополнување на јаглеродот и водородот. Врските помеѓу хетероатомите и јаглеродот имаат нееднаква размена на електроните која се должи на различните електронегативности на елементите. Ваквите врски имаат ефект на размена и дистрибуција на електрони во рамките на молекулата, така што се создаваат области на позитивен и негативен полнеж, а со тоа се воведува и поларност во молекулата. Присуството на наелектризиранни групи нуди потенцијал за електростатска интеракција со молекули со спротивен електричен полнеж и овие интеракции се важни во контролирањето на поврзувањето на ендогените супстрати со рецепторите. Лековите, според

ова, исто така, имаат потреба од хетероатоми за да се поврзат конкретно со рецепторите и на тој начин ефикасноста на лекот се должи на рамнотежата помеѓу неговите својства на липофилност и бројот на јаглеродните и хетероатомите во рамките на молекулата, како и нивниот сооднос едни со други. И двете својства ќе имаат влијание врз распределбата на лекот и тоа истата ќе биде под влијание во голема мера на структурата на клеточната мембрана која е бариера за продор на егзогените супстрати.

### 2.3. Структура на клеточната мембрана и нејзино влијание врз распределбата на лекот

Сите живи клетки, било да се растителни или животински, се опкружени со клеточна мембрана, чија функција, освен одржување на интегритетот на самата клетка, е да се задржи компартиментализацијата потребна да им се овозможи на метаболичките процеси да се случуваат и да се одвиваат ефикасно во рамките на клетката. Клеточната мембрана затоа има регулаторна функција за контрола на навлегувањето на хранливи материи и регулаторни супстанции, додека овозможува и исфрлање на продуктите од метаболизмот надвор од клетката. Мембраната затоа е полупорозна и се состои од бимолекуларен слој со околу 8-9 nm дебелина, составен од фосфолипидни молекули како што се сфингомиелин и фосфатидилхолин. Молекулите се усогласени така што поларните алкохоли или холинските групи формираат еден континуиран слој и на внатрешната и на надворешната површина на мембраната, додека хидрофобните синџири на масните киселини се ориентирани кон внатре за да се формираат есенцијалните липофилни јадра. Оваа двослојна конфигурација, илустрирана на слика 2.1, им овозможува на индивидуалните липидни молекули да се движат странично низ мембраната, а исто така овозможува и нејзина флуидност.



Слика 2.1. Флуиден мозаичен модел на биолошките мембрани.

Оваа конфигурација има уште и способност за создавање липидна бариера која е високонепропустлива за јоните и повеќето поларни молекули, а дозволува само слободен транспорт на лекови кои се во можност да се растворат во липидите и да се движат во и низ мембраната. Меѓутоа, постојат и глобуларни протеини вградени во мембраната, од кои некои се протегаат и низ сите слоеви на мембраната. Овие протеини содржат хетероатоми, кои придонесуваат за формирање пори или канали, преку кои може да поминуваат малите растворливи во вода молекули, како етанол и кватернерни амониумови соли, или, пак, јоните како што се натриумови или хлорни. Сепак, за поголемите молекули вклучувајќи ги овде и повеќето лекови, клеточната мембрана делува како бариера за дистрибуција во рамките на телото и диктира физичко-хемиски карактеристики потребни за навлегувањето на лекот, односно соодветен степен на липофилност.

### 2.4. Распределба на лекот преку мембраните

Со цел лекот да биде дистрибуиран до своето целно место, тој мора да премине барем една, а вообичаено и повеќе од една мембрана.

Бидејќи за поголемиот дел од молекулите на лекови, преминувањето на мембраната се случува врз основа на едноставна дифузија, и со оглед на, во голема мера, липофилната природа на мембраната, примарна детерминанта за стапката на апсорпција е својството на липофилност на лекот. Лекот мора да помине и низ водена и низ липидна средина додека ја преминува мембраната, а со тоа определувањето на релативниот афинитет на молекулата на лекот кон двете фази е корисно како предзнак на веројатноста за тоа дали тој ќе се апсорбира или ќе ја премине крвно-мозочната бариера.

Распределбата на лекот меѓу две фази (во испитувањата најчесто тоа е вода и октанол како органска фаза), при константна температура за да се добие коефициентот на распределба (партициониот коефициент),  $P$  или  $\log P$  како што најчесто се изразува, докажано е дека може да биде корисен индикатор за мембранскиот транспорт. Ова е претставено со дијаграм на слика 2.2 и равенка 2.1.



Слика 2.2. Дијаграм на распределбата на лекови.

$$\text{Коефициент на распределба } (P) = c(\text{органска фаза}) / c(\text{водена фаза}) \quad (2.1)$$

Коефициентот на распределба традиционално е утврден со користење техника со одделителна инка и мешање. Овој метод вклучува лек кој се промешува во одделителна инка која содржи вода и органска фаза која не се меша со неа како што е  $n$ -октанол или хлороформ при постојана температура за фиксен период на време пред анализа на концентрацијата на лекот во двете фази. Определувањето на  $\log P$  со класичната техника е процедура која трае прилично долго време и има ниска продуктивност. Затоа се развиени повеќе брзи техники врз основа на хроматографија за кои се покажало дека се во соодветство со вредностите добиени со класичната метода. Полезноста на коефициентот на распределба на лекот во предвидувањето на неговата способност да ја помине биолошката мембрана е докажана со почетокот на пионерската работа направена од Schanker (1964), кој ја истражувал апсорпцијата на структурно поврзани серија барбитурати од дебелото црево на стаорец како што е прикажано во табела 2.1.

Табела 2.1. Врска помеѓу липофилноста и апсорпцијата на серија барбитурати од дебелото црево на стаорец.

Барбитурати	$P$ (хлороформ/вода)	Процент на апсорпција
Барбитон	0,7	12
Фенобарбитон	4,8	20
Циклобарбитон	13,9	24
Пентобарбитон	28,8	30
Секобарбитон	50,7	40

Споредбата на липофилноста на молекулите со нивното преминување во склопот на дебелото црево покажува дека пермеабилноста на мембраната за секој пример од серијата е пропорционална на нивните коефициенти на распределба. Исто така, значаен е и фактот дека за разлика од лековите кои дифундираат преку каналите за вода во мембраната, каде што важен фактор е големината на молекулата, постои мало значење на овој фактор за транспортот низ дебелото црево. Како општо правило важи, колку поголем коефициент на распределба, толку полесен транспорт на лекот низ мембраната.

Но, сепак, користењето на ова правило треба да биде со резерва, зашто над одредена липофилност, се појавуваат проблеми како на пример слабата растворливост во водената фаза што доведува и до пад во пропустливоста на мембраната.

Како што е дефинирано погоре, коефициентот на распределба е соодносот на концентрацијата на лекот меѓу две течни фази за истите молекулски групи и се применува само на соединенија кои не се јонизирани. Ова е малку поедноставено приближување кон ситуацијата во *in vivo* услови бидејќи таму каде нема униформирана рН вредност во телото, ефектите од јонизацијата може да имаат големо влијание врз распределбата на лекот.

#### 2.4.1. Експериментално определување на коефициентот на распределба

Постојат три начини на определување на коефициентот на распределба во лабораториски услови. Метод на *одделителна инка*, *тенкослојна хроматографија (TLC)* и *метод со примена на високоефикасна течна хроматографија под висок притисок (HPLC)*.

##### 2.4.1.1. Метод на одделителна инка

Со методот на одделителна инка, лекот чијшто  $P$  се определува се додава во одделителната инка која содржи смеша од две фази кои меѓусебно не се мешаат, иако тоа може да се направи и со употреба на епрувета за центрифугирање (и при тоа потребен е помал волумен од примерокот). Вообичаена комбинација на немешливите течности е 1-октанол и пуфер со рН 7,4. Октанолот се применува за определување на коефициентот на распределба бидејќи тој е најдобра симулација на биолошките услови *in vivo*. Ова веројатно е така бидејќи осумте јаглеродни атоми се особено *хидрофобни*, додека едната хидроксилна група е *хидрофилна*, па заедно даваат најблиска симулација на рамнотежата која е карактеристична за мембраните на човековите клетки. Водениот пуфер со рН 7,4 ги претставува водените простори во телото (пр. крвната плазма).

Двете фази се мешаат со цел да се добие пуферски-заситен октанол во горната фаза и октанол-заситен пуфер во долниот дел. Штом еднаш ќе се разделат двете фази (ова може да потрае одреден временски период) се додава лекот и одделителната инка се меша механички, најмалку еден час. Двете фази се оставаат да се одделат и потоа се определува концентрацијата на лекот во водената фаза. Ова може да се изведе со титрација доколку лекот е доволно кисел или базен или почесто, се определува спектрофотометриски. Концентрацијата во октанолската фаза се пресметува со одземање на концентрацијата на лекот во водениот пуфер од вкупната количина на лек. Овој метод функционира перфектно добро доколку имаме на располагање доволно количество лек и доколку лекот содржи хромофор кој овозможува спектрофотометриско определување во водената фаза.

Она што е значајно да се забележи за екстракцијата од овој тип не е волуменот на органската фаза туку бројот на изведените екстракции. Пет екстракции со по 10 mL органска фаза ќе екстрахираат повеќе супстанца отколку една екстракција со 50 mL, иако вкупниот волумен на органскиот растворувач е ист. Слично, 10 екстракции со по 5 mL ќе бидат уште поефикасни. Овој ефект (кој е општ за сите екстракции) е реален. Равенката која се користи за пресметување на ефикасноста на повеќекратната екстракција наспроти единечната екстракција е следната:

$$W_n = W [A / (PS + A)]^n$$

Каде што:

- $W_n$  е маса на лек која останува во водената фаза после  $n$  екстракции,
- $W$  е почетна маса на лек во водената фаза,
- $A$  е волумен на водената фаза,
- $S$  е волумен на растворувачот (или органската фаза),
- $P$  е коефициент на распределба и
- $n$  е бројот на екстракции.

### 2.4.1.2. Тенкослојна хроматографија (TLC)

Кај оваа техника  $R_f$  вредноста на лекот се поврзува математички со коефициентот на распределба. Плочата со тенок слој се прекрива со органска фаза (најчесто парафин или октанол) и се остава да се исуши. Примерокот се аплицира и истата се остава да се развие. Мобилната фаза која се користи е или вода или смеша на вода со мешливи органски растворувачи (како ацетон) за да се подобри растворливоста на лекот. По развивање на хроматограмот, се забележуваат дамки (со визуелизација со ултравиолетова лампа доколку лекот содржи хромофор, или јодни пари доколку не содржи хромофор) и се пресметува  $R_f$  за секоја од позициите.  $R_f$  вредноста се поврзува со коефициентот на распределба преку следнава равенка:

$$P = k(1/R_f) - 1$$

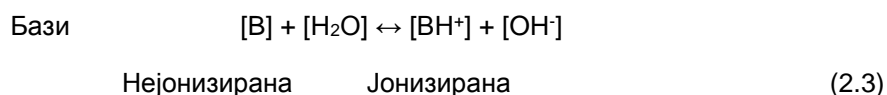
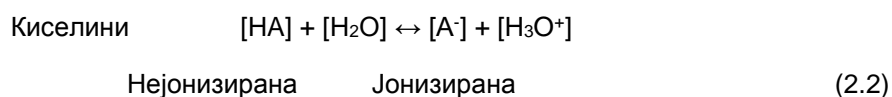
каде  $k$  е константа за дадениот систем, која се определува преку испитување на многу стандардни супстанции со познат  $P$  во системот. Предноста на примената на оваа техника во определувањето на  $P$  е тоа што истовремено може да се испитаат многу супстанции, а од друга страна, може да претставува недостаток изнаоѓањето на соодветен стандард за дадениот систем.

### 2.4.1.3. Високоефикасна течна хроматографија под висок притисок (HPLC)

Овој аналитички метод се темели на некои хемиски принципи кои се значајни за определувањето со TLC, освен тоа ефикасноста (но исто и трошокот) на техниката значително се зголемуваат. Наместо  $R_f$  вредноста, се мери ретенционото време на лекот и се поврзува со  $P$  со примена на равенка која е слична со равенката која се применува кај TLC. Ретенционото време, како што кажува и самото име, е времето потребно примерокот да се елуира од HPLC колоната. Треба да се внимава при користењето на оваа техника лекот кој се употребува да содржи хромофор, бидејќи само тогаш може да се користи UV детекција. Во случај на лекови без хромофори се применуваат други како, детектор со рефракторен индекс (RI) или електрохемиски детектор (ECD). Предност на овој метод е тоа што е потребно многу мал волумен од примерокот и тој не мора да биде 100 % чист.

## 2.5. Јонизација на лекови

Како што е и претходно споменато, повеќето лекови содржат хетероатоми неопходни за интеракција со рецепторите на нивното место на делување. Овие супституенти воведуваат поларност во молекулата, исто така, даваат можности лекот да дејствува како киселина, база или дури и цвтерјон. Киселините може едноставно да се дефинираат како протон донори, а базите како протон акцептори, затоа лековите со киселински или базични функции може да постојат и во нејонизирана и во јонизирана форма како што е претставено и со равенките 2.2 и 2.3.



Според дефиницијата на Bronsted-Lowry, киселина е супстанција која во водени раствори јонизира и донира протони:





- HA претставува киселина која оддава протон,
- H<sub>2</sub>O го прифаќа оддадениот протон, претставува база,
- H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> претставува конјугирана киселина на базата и
- A<sup>-</sup> претставува анјон на киселината, односно нејзина конјугирана база.

Рамнотежната констата за оваа реакција е *K<sub>a</sub>*-киселинска константа на дисоцијација, која математички се претставува како:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (2.5)$$

Според Bronsted-Lowry, базата се дефинира како акцептор на протони. Фармацевтската наука најмногу го разгледува однесувањето на лековитите супстанции во водени системи, во кои еден лек ќе се однесува како база само доколку во себе содржи азотен атом со неспарени електрони способни да реагираат со протоните донирани од киселината. Основна класа на соединенија кои делуваат на ваков начин се амините. Однесувањето на еден амин во воден раствор е претставено со следната равенка:



- R<sub>3</sub>N аминот кој го прифаќа оддадениот протон, претставува база,
- H<sub>2</sub>O претставува киселина која оддава протон,
- R<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> претставува конјугирана киселина на базата и
- OH<sup>-</sup> претставува анјон на киселината, односно нејзина конјугирана база.

Од равенката (2.5) може да се забележи дека *K<sub>a</sub>* претставува едноставен однос, што значи дека колку е поголема нејзината вредност, толку е појака киселината. Сепак, јачината на најголемиот број киселини се претставува со *pK<sub>a</sub>*, каде што

$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

Бидејќи *pK<sub>a</sub>* е негативен логаритам од *K<sub>a</sub>*, колку е помала вредноста на *pK<sub>a</sub>*, толку е појака киселината.

**Една супстанца е појака киселина доколку нејзината *pK<sub>a</sub>* вредност е пониска, односно супстанцијата е појака база доколку нејзината *pK<sub>a</sub>* е повисока.**

Основно правило во определувањето на јачината на една киселина или база е:

*pK<sub>a</sub>* < 2: јака киселина, нема базни особини во вода

*pK<sub>a</sub>* 4-6: слаба киселина, многу слаба конјугирана база

*pK<sub>a</sub>* 8-10: многу слаба киселина, слаба конјугирана база

*pK<sub>a</sub>* >12: нема кисели особини во вода, јака конјугирана база

***K<sub>a</sub>* и *pK<sub>a</sub>* ја покажуваат способноста на супстанцијата да јонизира, а не да ослободува хидрониум јони.**

**pH ја покажува концентрацијата на хидрониум јоните во раствор во кој знаеме дека супстанцата јонизирала и на тој начин ни овозможува да одредиме дали станува збор за киселина или база.**

**pH на растворот зависи од *pK<sub>a</sub>*.**

Табела 2.2. *Ka* и *pKa* вредности на некои кисели и базни лековити супстанции.

	<i>Ka</i>	<i>pKa</i>
<b>Кисели лекови</b> $HA + H_2O = H_3O^+ + A^-$		
Пеницилин V	$2,0 \times 10^{-3}$	2,7
Ацетилсалицилна киселина	$3,3 \times 10^{-4}$	3,5
Аскорбинска киселина	$5,0 \times 10^{-5}$	4,3
Фенобарбитал	$3,9 \times 10^{-8}$	7,4
Фенитоин	$7,9 \times 10^{-9}$	8,1
Борна киселина	$5,8 \times 10^{-10}$	9,2
Зидовудин	$2,0 \times 10^{-10}$	9,7
<b>Базни лекови</b> $A + H_2O = HA^+ + OH^-$		
Кофеин	$2,5 \times 10^{-4}$	3,6
Залцитабин	$6,3 \times 10^{-5}$	4,2
Теофилин	$3,4 \times 10^{-6}$	5,2
Морфин	$7,4 \times 10^{-7}$	7,9
Еритромицин	$2,0 \times 10^{-9}$	8,8
Амфетамин	$1,6 \times 10^{-10}$	9,8

Јонизираните молекули поседуваат електростатски полнеж и претпочитаат да се асоцираат со слични молекули од средината што ги опкружува, односно преферираат повеќе водена отколку органска средина и се раствораат првенствено во вода. Спротивно на тоа, нејонизираните молекули немаат нето полнеж или поларност и на тој начин преферираат да се раствораат во липиди односно се липофилни. Повеќето лекови се или слаби киселини или слаби бази и на тој начин ќе бидат делумно јонизирани во водената средина каква што е крвта. Законот на масена акција се применува и во случајот на слаби киселини, но ја фаворизира јонизацијата на слабите бази. При кисело pH затоа, слабите киселини ќе бидат нејонизирани и ќе преферираат растворање во липидна фаза, додека за слабите бази, ќе се применува обратната ситуација и бидејќи се јонизирани при кисела pH вредност, тие ќе преферираат растворање во водена фаза.

Степенот на јонизирање на лекот, според тоа, е многу важна детерминанта на неговата способност да ја премине мембраната бидејќи ја диктира количината на лекот што е нејонизирана, а со тоа и липидно растворлива. Исто така, и pH вредноста на околната средина игра клучна улога во утврдување на способноста на лекот да дифундира во и низ липидните мембрани.

Степенот до кој лекот е јонизиран при некоја дадена pH вредност е во функција на привидната константа на дисоцијација *Ka* која, како и концентрацијата на водородните јони, се изразува како негативна логаритамска функција  $-\log Ka$  или *pKa*. Силните киселини имаат ниски *pKa* вредности, а силните бази имаат високи *pKa* вредности. *pKa* вредности на избрани кисели и базични лекови се прикажани на слика 2.3 за да се илустрира опсегот на вредности кои обично ги имаат.

*pKa* вредноста на одреден лек може да се добие со изразување на pH како резултат на додавање натриум хидроксид наспроти еквивалент на  $OH^-$  додадени да се добие титрациона крива, при што вредностите за голем број слаби киселини (ацетат, фосфат и амониум) се прикажани на слика 2.4.

Може да се види дека обликот на кривата е истиот и за киселините и базите, а главната разлика е вертикалната промена во pH скалата. Во еквивалентната точка на титрацијата, бројот на наелектризирани и молекулите без полнеж е еднаков и pH вредноста при која ова се случува е еднаква на *pKa*.

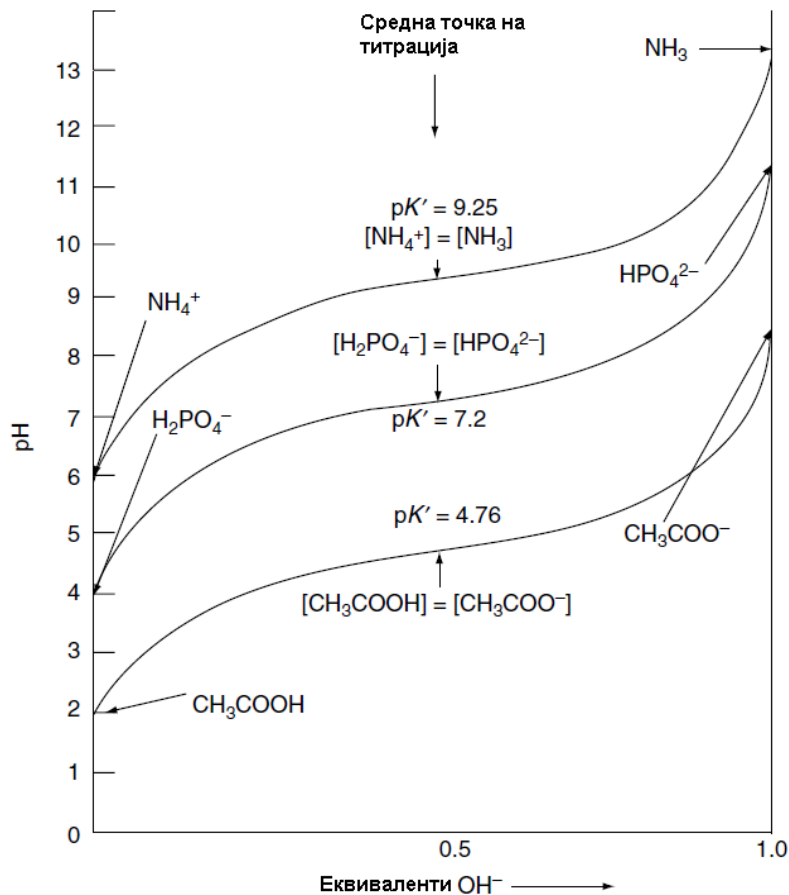
Исто така може да се види и дека за киселина (слика 2.4), при pH вредности две единици под нејзината *pKa* вредност, лекот е речиси целосно во нејонизирана форма (> 99 %),

додека при рН вредност две единици над нејзината  $pK_a$  вредност лекот е речиси целосно во јонизирана форма.

Обратната ситуација важи за базите како амонијак на пример, каде што тие се речиси целосно јонизирани при рН вредност две единици под нивната  $pK_a$  и целосно нејонизирани при рН вредност две единици над нивната  $pK_a$ . Ако ја знаеме  $pK_a$  на лекот и рН на средината, можеме да го предвидиме најверојатниот степен на јонизирање на лекот и со тоа и потенцијалот за неговото преминување низ мембраните и апсорбирањето.



Слика 2.3.  $pK_a$  вредности на киселите и базичните лекови кои варираат во широки граници; амфотерните лековите се означени со (\*).



**Слика 2.4.** Крива на ацидо-базна титрација на некои киселини која ги покажува главните јонски видови во почетната, еквивалентната и завршната точка на титрацијата.

Обликот на титрационата крива може да се опише математички за секое посебно соединение со помош на Henderson-Hasselbalch-овата равенка која го поврзува степенот на јонизирација на лекот со pH вредноста и неговата  $pK_a$  како што е прикажано во равенките 2.7 и 2.8.

$$\text{За киселини} \quad pK_a - pH = \log \frac{[\text{нејонизирана}]}{[\text{јонизирана}]} \quad (2.7)$$

$$\text{За бази} \quad pK_a - pH = \log \frac{[\text{јонизирана}]}{[\text{нејонизирана}]} \quad (2.8)$$

Така може да се види дека распределбата на лековите помеѓу органскиот и водениот медиум е во функција не само на коефициентот на распределба на молекулата, туку и на степенот на јонизација на молекулата. Распределбата на јонизираните лекови е затоа покомплесна отколку ситуацијата претставена на слика 2.2 и е функција на коефициентот на распределба и константата на дисоцијација.

Така, колку е поголем степенот на јонизација на молекулата, толку е помало рапределувањето во и низ липидните мембрани. Коефициентот на распределба,  $\log P$ , на тој начин може да се прилагоди за степенот на јонизација на соединението за да даде повеќе точен дескриптор на однесувањето на јонизираните и нејонизираните лекови.

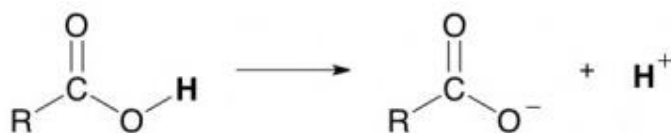
Можно е да се пресмета степенот на јонизација на даден лек и, според тоа, неговиот веројатен капацитет да ја премине мембраната и да се апсорбира во дадено место во телото, ако се познати  $pK_a$  на лекот и pH на ткивото.

**Единствениот сигурен начин да се потврди дали лекот се однесува како база или како киселина е да се познаваат функционалните групи кои ја дефинираат киселоста или базноста на молекулите.**

### 2.5.1. Примери за функционални групи кои ја дефинираат киселоста/базичноста на молекулите на лековите

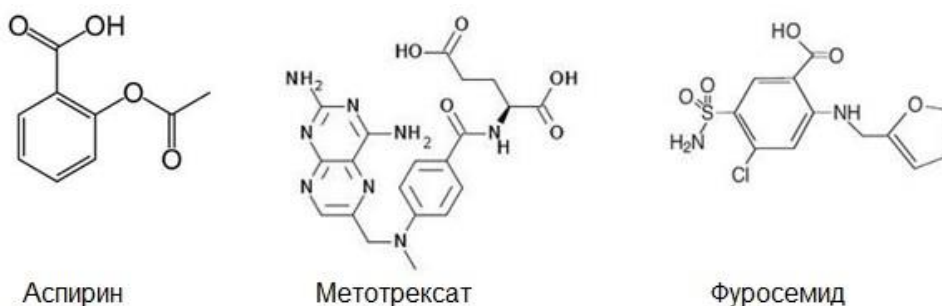
- Карбоксилна група

Најчеста функционална група која ја дефинира киселоста на молекулите на лековите е карбоксилната група чија јонизација е претставена на сликата 2.5:



**Слика 2.5.** Хемиска реакција на органските киселини до генерирање слободен протон.

Голем број на најчесто употребуваните лекови претставуваат деривати на карбоксилната киселина. Тука се вбројуваат аспирин ( $pK_a$  3,5), метотрексат ( $pK_a$  3,5; 4,8; 5,6) и диуретикот фуросемид ( $pK_a$  3,9) чии структурни формули се дадени подолу (слика 2.6).



Аспирин

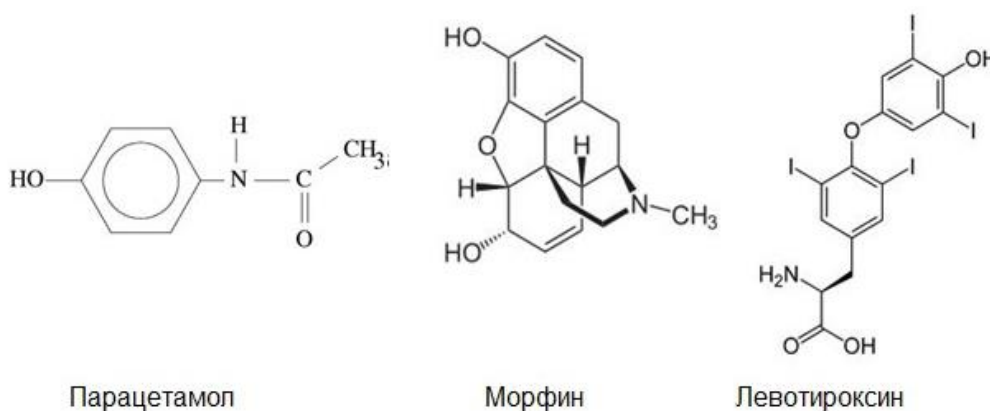
Метотрексат

Фуросемид

**Слика 2.6.** Структурни формули на аспирин, метотрексат и фуросемид.

- Фенолна група

Друга најчеста кисело-функционална група која се среќава во молекулите на лековите е фенолната група или хидроксибензенот. Фенолите се слаби киселини кои ослободуваат протони формирајќи феноксиден анјон. Најкарактеристични лекови кои поседуваат фенолна функционална група се парацетамол ( $pK_a = 9,5$ ), морфин ( $pK_a = 9,9$ ) и левотироксин ( $pK_a = 10$ ) чии структурни формули се дадени подолу (слика 2.7).



Парацетамол

Морфин

Левотироксин

**Слика 2.7.** Структурни формули на некои лекови со фенолна функционална група.

## 2.6. pH во телото и како влијае на апсорпцијата и дистрибуцијата на лекови

Од претходните делови за липофилност и јонизација очигледно е дека, додека растворливоста и брзината на растворливост се повисоки кога лекот е во јонизирана форма, само нејонизираните липофилни лекови може да дифундираат низ клеточните мембрани. Така, pH вредноста на двете страни на мембрана значително ќе влијае на дистрибуцијата на јонизираната форма на лековите во клетките. Ако се земе предвид пероралниот пат на администрација, таму каде што се важни киселите услови во желудникот и алкалните услови во интестинумот, станува очигледно колку големи може да се овие разлики во pH вредноста помеѓу различни органи и ткива во организмот.

### 2.6.1. Апсорпција од желудник

pH на гастричните сокови во желудникот е многу кисело со вредност од приближно 1, додека цревното pH е речиси неутрално во опсег околу 6-7. pH вредноста во плазмата е 7,4 а со тоа големата разлика во pH вредноста помеѓу плазмата и гастроинтестиналниот тракт во голема мера одредува дали слабо јонизирана компонента ќе се апсорбира во плазмата или не. Алтернативно, ова исто така ќе определи дали лекот може да се излачува од плазмата назад во желудникот или цревата, или не.

За слабите киселини, како аспирирот, кој има  $pK_a$  од 3,5, може да се пресмета како тој ќе се дистрибуира низ гастричната мукоза помеѓу плазмата ( $pH = 7,4$ ) и желудочната киселина ( $pH = 1$ ) употребувајќи ја Henderson-Hasselbalch-овата равенка за киселини (равенката 2.7).

$$pK_a - pH = \log \text{нејонизирана/јонизирана} \quad (2.9)$$

која после реаранжман дава,

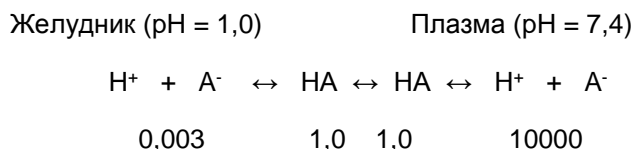
$$pH - pK_a = \log \text{јонизирана/нејонизирана} \quad (2.10)$$

И затоа,

$$\text{јонизирана/нејонизирана} = \text{antilog } pH - pK_a \quad (2.11)$$

Така, за аспирирот, вредностите се  $pH - pK_a = 7,4 - 3,5 = 4$  во плазмата и  $1 - 3,5 = -2,5$  во желудникот. Така, во плазмата при рамнотежа,  $\log \frac{[\text{јонизиран}]}{[\text{нејонизиран}]} = 4$  и  $\frac{[\text{јонизиран}]}{[\text{нејонизиран}]}$  е antilog на оваа вредност, односно 10000.

Во желудникот, сепак,  $\log \frac{[\text{јонизиран}]}{[\text{нејонизиран}]} = -2,5$  и соодносот  $\frac{[\text{јонизиран}]}{[\text{нејонизиран}]} = 0,003$ . Бидејќи за слабите киселини тоа е киселинскиот дел кој е нејонизиран и на тој начин слободен да се дистрибуира до рамнотежната состојба, дистрибуцијата ќе биде како што следува (слика 2.8):



**Слика 2.8.** Дистрибуција на јонизирана и нејонизирана форма на лек.

Може да се види дека во киселата средина на желудникот, аспирирот е > 99 % во нејонизирана форма и, според тоа, може брзо да се апсорбира од желудникот. Имајќи на ум дека во плазмата, сепак, случајот е обратен, па затоа > 99 % од лекот е во јонизирана форма. Ова очигледно има импликации за способноста на лекот да се дистрибуира понатаму од плазмата во ткивата.

Во случај на базичен лек како што прокаинот ( $pK_a = 9,0$ ), на пример, ќе се применува обратната ситуација од онаа која важи за киселите лекови. Во киселите услови на желудникот, лекот ќе постои речиси исклучиво во јонизирана форма со помалку од една молекула во десет милиони која би била нејонизирана. Така, поголемиот дел од слабо базичните лекови ќе се

јонизираат во желудникот, а со тоа и слабо ќе се апсорбираат. Во скоро неутралната средина на тенкото црево, сепак, јонизацијата на слабо базичните лекови ќе биде потисната и на тој начин базичните лекови имаат тенденција брзо да се апсорбираат во тенкото црево.

### 2.6.2. Дистрибуција во ткивата

По апсорбцијата во циркулацијата, лековите се дистрибуираат низ телесните ткива и течности. Моделот на дистрибуција на даден лек ќе биде диктиран од страна на неговата растворливост во липиди, во прилог на неговата способност да се поврзе за плазмените протеини и другите ткивни протеини. pH на плазмата (7,4) е побазична од pH на ткивата (7,0) и затоа може да влијае на дистрибуцијата на лековите помеѓу двете. Киселите лекови како што е аспирирот, еднаш апсорбиран во крвотокот, има тенденција да постои во голема мера во јонизирана форма и затоа не се дистрибуира надвор од плазмата кон ткивата. За контраст, слабо базичните лекови се присутни барем делумно во нејонизирана форма, која може да дифундира надвор од плазмата во ткивата. Поради разликата на pH вредностите помеѓу ткивата и плазмата, рамнотежата во ткивото се поместува назад кон јонизирана форма со тенденција лекот да се задржи во ткивото. Следствено на тоа, рамнотежата во плазма е управувана понатаму кон нејонизирана форма која се бори со концентрацискиот градиент на дифузијата во ткивата. Така, за разлика од киселините, базите имаат тенденција да бидат широко дистрибуирани во ткивата и ова ја објаснува карактеристичната разлика во дистрибуцијата гледана помеѓу киселините и базите при вршење квантитативни автордиографски студии на цело тело.

Во прилог на одредување на веројатноста за дистрибуција, липофилноста на лекот може, исто така, значително да влијае на неговото потенцијално место на акумулација. Бидејќи приближно 15 % од телесната тежина кај индивидуите со нормална телесна тежина отпаѓаат на мастите (овој процент може да се зголеми и до 50 % кај поединците со зголемена телесна тежина), масното ткиво може да дејствува како депо или објект за бавно ослободување на лековите со голема липофилност.

### 2.6.3. Дистрибуција преку крвно-мозочна бариера

За лековите кои имаат ефекти врз централниот нервен систем, постои дополнителна бариера за нивната дистрибуција до местото на делување, имено, постоењето на крвно-мозочната бариера. Ендотелните клетки на мозочните капилари имаат континуирани тесни меѓуклеточни врски и се тесно поврзани со астроцитите така што ендотелните празнини кои се забележуваат кај другите органи овде недостигаат. Крвно-мозочната бариера со тоа претставува липидна бариера која игра важна улога во одвојување на ткивата на мозокот од црвените крвни клетки, тромбоцитите и егзогените и ендогените компоненти присутни во системската циркулација. Иако крвно-мозочната бариера делува како бариера за големите молекули, како што се протеините, и генерално, ја исклучува или дозволува само бавната пенетрација на повеќето поларни соединенија, сепак високолипофилните соединенија можат, со различни ограничувања, брзо да ја преминат оваа бариера со процесот на пасивна дифузија. Така, лековите како дијазепам и мидазолам кои брзо се појавуваат во цереброспиналната течност (ЦСТ) ( $t_{1/2}$  влез <1 минута), се претпоставува дека ја преминале крвно-мозочната бариера. Некои поларни раствори може да ја преминат крвно-мозочната бариера со помош на активен транспорт, но ваква тенденција повеќе отколку лековите имаат ендогените соединенија, како што се шеќери, хормони, големи неутрални и базични аминокиселини, нуклеозиди и карбоксилни киселини.

### 2.7. Врзување на лековите со крвните клетки и плазмените протеини и нивни ефекти врз дистрибуција на лекот

Добро е познато дека лековите може да се врзат реверзибилно со црвените крвни клетки и плазмените протеини како што се серумскиот албумин,  $\alpha_1$ -киселиот гликопротеин и липопротеините. Структурата и физичко-хемиските својства на лекот ќе го детерминираат ова поврзување, при што киселите лекови имаат тенденција да се врзат со албумините додека базичните лекови (како што се  $\beta$ -блокаторите на пример) имаат тенденција да се врзат со  $\alpha_1$ -киселиот гликопротеин. Бидејќи само слободниот лек е во состојба да ја премине мембраната и да комуницира со рецепторите, дистрибуцијата и, во крајна линија, ефикасноста на лекот се под влијание на неговото врзување со протеините кои се составни компоненти на крвта.

## 2.8. Бубрежна елиминација на лекови

Екскрецијата од организмот преку урината е главен пат на елиминација за многу лекови. Лековите кои не се испарливи имаат ниска молекулска маса ( $< 500$ ), добро се раствораат или бавно се метаболизираат, ќе бидат отстранети од телото со бубрежна екскреција. Бубрежната екскреција е всушност мултифакториелен процес и излучувањето на лекот преку бубрезите вклучува комбинација од три процеси, имено, гломеруларна филтрација, тубуларна секреција и тубуларна реапсорбција.

Гломеруларната филтрација е еднонасочен процес кој се случува кај повеќето соединенија со ниска молекулска маса ( $< 500$ ) без оглед на нивниот степен на јонизација. Лековите кои се протеински врзани нема да се филтрираат во гломерулите и на тој начин, гломеруларната филтрација на лековите е директно поврзана со слободната фракција на лекот во плазмата. Како слободната концентрација на лекот во плазмата се зголемува, така и гломеруларната филтрација пропорционално се зголемува.

За разлика од гломеруларната филтрација, активната бубрежна секреција, како што сугерира името, е активен процес кој вклучува систем со посредство на носачи. Затоа што системот го транспортира лекот спротивно на концентрацискиот градиент, потребна е енергија за негово функционирање. Постојат системи за секретирање на киселини (анјони) и бази (катјони) од плазмата до луменот на проксималните тубули. Во повеќето случаи процесот не е поврзан со врзувањето со плазмените протеини поради брзата дисоцијација на комплексот лек-протеин.

Пеницилините, на пример, кои се високо врзани за протеините, имаат краток елиминациски полуживот кој се должи на нивната брза елиминација со процес на активна секреција. За разлика од гломеруларната филтрација, бидејќи овде има вклучен транспортен систем и носачи, може да се случи конкуренција помеѓу лековите за носачите што доведува до инхибиција на тубуларната секреција на лекот кој има помал афинитет за носачот. Инхибицијата на тубуларната секреција на антибиотиците од страна на урикозуричниот агенс пробенецид е добро позната и тој се користи како средство за намалување на брзата елиминација на пеницилините, а со тоа и зголемување на времетраењето на нивното дејство.

По филтрацијата на слободниот лек во гломерулите и излучувањето на лекот во проксималните тубули, лековите може да бидат предмет и на тубуларна реапсорбција. Реапсорбцијата генерално е пасивен дифузиски процес кој се јавува како последица на големиот концентрациски градиент кој постои помеѓу лекот во луменот на тубулите и слободниот лек во плазмата како резултат на високоефикасната реапсорбција на вода. Во согласност со функцијата на тубуларните мембрани, реапсорбцијата/транспортот на липиднорастворливите лекови е примарна и лековите кои имаат слаба липофилност или се јонизирани обично повторно не се апсорбираат. Реапсорбцијата се одвива во дисталниот дел на тубулите каде што нејонизираните молекули може да поминат низ мембраната во циркуларчката плазма.

Во ситуација слична на онаа за цревната апсорбција,  $pK_a$  на лекот и  $pH$  на течноста во дисталните тубули, односно урината ја диктираат стапката и степенот на реапсорбција. Додека  $pK_a$  на лекот е константна,  $pH$  на урината може да варира од 4 до 8 во зависност од начинот на исхрана, конкурентната елиминација на лекови (на пример, антацидите) и патофизиолошките промени кои се резултат на ацидоза и/или алкалоза. Киселоста на урината ја олеснува реапсорбцијата на слабите киселини, а истовремено ја намалува реапсорбцијата на слабите бази. Со алкализирање на урината се постигнува спротивен ефект врз слабите киселини, се зголемува нивната јонизација така што тие не можат повторно да се апсорбираат и на тој начин се елиминираат. Силните киселини или базите, како што е во случајот на цревната апсорбција, се целосно јонизирани во текот на целиот спектар на уринарната  $pH$  вредност и се подложени на слаба реапсорбција. Врз основа на различното однесување на различните лекови и ефектите на  $pH$ , липофилноста на соединенијата како што е опишано со нивниот  $\log D$ , е важна за бубрежната тубуларна мембрана. Така, според општото правило реапсорбцијата на лекот ќе биде комплетна при вредности за  $\log D$  над нула, додека тубуларната реапсорбција ќе биде занемарлива за оние вредности кои се под нула. Така, ако  $\log D$  на лекот е позната вредност заедно со неговата  $pK_a$ , ќе биде можно да се утврдат промените во  $pH$  вредноста на урината кои треба да обезбедат секреција на лекот каде што е потребна детоксикација, како во



случаите на случајно предозирање. Во такви околности рН вредноста на урината може да се направи да биде повеќе базична со интравенска администрација на бикарбонати ако токсичниот лек е киселина, или да се закисели со користење на аскорбинска киселина каде што е соодветно, за да се осигура дека лекот останува во својата јонизирана форма и со тоа е безбедно неговото присуство во урината.

### 3. ПРОТЕИНСКО ВРЗУВАЊЕ НА ЛЕКОВИТЕ ВО ПЛАЗМАТА

#### 3.1. Вовед

Откако ќе се внесе во организмот лекот се распределува, реверзибилно или иреверзибилно, во еден или повеќе волумени или простори со кинетика од прв ред. За разлика од дистрибуцијата, која го опфаќа реверзибилниот премин на лековите од и кон различни делови на телото, диспозицијата на лековите ги опфаќа сите процеси и фактори кои се поврзани со лекот од моментот кога лекот ќе стигне во циркулацијата па до моментот кога лекот или еден или повеќе негови метаболити го напуштаат организмот преку урина, фецес, пот или издишување (експирација). Оттука, факторите кои влијаат на распределбата, метаболизмот и/или излучувањето на лекот и/или неговите метаболити се означени како фактори на диспозиција на лекот. Сепак, спротивно на ова, денес е прифатено и дека диспозицијата го преставува сè она што му се случува на лекот од моментот на неговото внесување во организмот, па до почетокот на неговата елиминација, односно дека диспозицијата ги опфаќа и ослободувањето на лековитата супстанција, ресорпцијата и дистрибуцијата.

Од физиолошки аспект, простор (компаратмент) претставува секое ткиво или збир на ткива со еднакви својства на распределба, одделни органи или телесни течности, додека, пак, од фармакокинетска гледна точка, просторот се дефинира како кинетичко подрачје на влез и излез од организмот кое се карактеризира со определен волумен (одредена зафатнина) и брзина на распределба.

Од фармакокинетски аспект, значајни се следните три простори во човечкиот организам:

- интраваскуларниот простор (крвотокот),
- интерстицијалниот простор (меѓуклеточниот) и
- интрацелуларниот простор (клеточниот).

И покрај тоа што овие простори претставуваат анатомски и морфолошки целини, меѓу нив постои континуирана размена на течности и растворени супстанции. Брзината на размена на лековите помеѓу два раствори зависи од многу фактори од кои најважни се *pKa* на лекот, рН на просторот, коефициентот на распределба на лекот, степенот на врзување на лекот за макромолекулите (најчесто (глико)протеините), транспортниот механизам и брзината на проток на крвта.

Најголемиот дел од лековите во крвта може да бидат:

- Растворени во плазмената течност
- Локализирани во крвните клетки
- Врзани за плазмените протеини

Растворливоста во плазмата е многу мала за голем број важни лекови. Пенетрацијата, пак, во крвните клетки е директно дефинирана од липосолубилноста на лекот или од концентрацијата на нејонизираниот облик на лекот, додека врзувањето на лековите за плазмените протеини претставува, иако исклучително важен, сè уште недоволно проучен процес.

Протеинското врзување најчесто се дефинира како реверзибилна асоцијација на лекот со протеините од крвта, или поточно од плазмата. Кога лекот се администрира интравенски или стигнува во крвната циркулацијата по апсорпција, се врзува со достапните протеини на два различни начина: со адсорпција на површината на протеините или, поретко, со ковалентно врзување со активните хемиски групи на протеинот. Кога поврзувањето е реверзибилно, постои динамичка дистрибуција со трансфер помеѓу протеините и плазмената вода. При рамнотежната состојба одреден дел од вкупниот лек се врзува за плазмените протеини. Сите фактори кои ја модифицираат природата на врзувачките интеракции (промена на рН

вредноста, јонска сила, протеинска терциерна структура, температура) и присуството на други конкурентни лиганди може да го менуваат степенот на врзување. Испитувањето на врзувањето за протеините на новите хемиски структури е важна активност во процесот на развојот на лекови поради неговата улога во одредувањето на излачувањето и дистрибуционите параметри.

### 3.2. Рамнотежа на протеинско врзување

Интеракцијата на лековите со протеините може да се третира како рамнотежна, со почитување на законот на масена акција и кинетика. Затоа може да се опише со реверзибилната равенка:



каде што  $[D]$ ,  $[P]$  и  $[DP]$  се моларни концентрации на слободниот (неврзаниот) лек, слободните (незафатените) места за врзување на протеините и комплексот лек-протеин, односно,  $k_{on}$  и  $k_{off}$  се константите за асоцијационите и обратно, дисоцијационите реакции, соодветно. Рамнотежната асоцијациона константа ( $K_a$ , моларна единица<sup>-1</sup>) за оваа реакција се дефинира како:

$$K_a = k_{on}/k_{off} = [DP]/[D][P] \quad (3.2)$$

Оваа константа го обезбедува индексот на афинитет помеѓу лекот и врзувачките места. Вкупната концентрација на врзувачки места е збир на слободните  $[P]$  и зафатените врзувачки места  $[DP]$ : оваа вкупна концентрација на места се означува како *капацитетна константа* ( $N$ ) и има единица „бр. на места/L“. Бидејќи даден протеин може да има неколку класи на независни врзувачки места, капацитетната константа претставува производ на „бројот на места/молекули на протеин“ и моларната концентрација на протеинот. Комбинирањето на сите овие равенки и со оглед на сите класи на врзувачки места, концентрацијата на врзаниот лек  $[DP]$  во протеинскиот раствор може да се изрази како:

$$[DP] = \sum N_{toti} [D]/K_{di} + [D] \quad (3.3)$$

каде што „ $i$ “ се однесува на бројот на различни класи на врзувачки места.

### 3.3. Детерминанти на слободната (неврзана) фракција

Равенката 3.3 може да биде реаранжирана, така што слободната (неврзаната) плазмена фракција ( $f_u$ ) од лекот да се претстави како:

$$f_u = [D]/[DP] = K_d + [D]/N_{tot} + [D] + K_d \quad (3.4)$$

Затоа, за лек кој се врзува за една класа на врзувачки места, врзаниот дел на лекот зависи од рамнотежната концентрација на слободниот лек, дисоцијационата константа и протеинската концентрација. Нормално, врзаниот дел останува константен во широк концентрациски спектар, вклучувајќи го и терапевтскиот опсег. Сепак, за некои лекови (на пр. валпроична киселина, салицилна киселина и некои НСАИЛ), протеините изгледа имаат многу ограничен капацитет за врзување, на што укажува зголемувањето на концентрацијата на неврзаниот лек кога вкупната концентрација на лекот се зголемува (концентрација-зависно врзување). Плазмените протеини генерално имаат висок капацитет за врзување и се способни да „извлечат“ одредени молекули на лекови од воден раствор или суспензија. Ова може да се должи на големиот број врзувачки места на секоја протеинска молекула и/или високиот врзувачки афинитет. Специфични врзувачки места (висока  $K_a$  вредност, низок врзувачки капацитет) доминираат при ниски концентрации на лек, додека неспецифичните врзувачки места (различни лекови се врзуваат за исти врзувачки места на површината на протеинот) имаат ниска  $K_a$  вредност, висок врзувачки капацитет и доминираат кај повисоки концентрации. Можноста за кооперативно врзување исто така постои бидејќи афинитетот на лекот се зголемува како што тој повеќе се врзува со протеините.

### 3.4. Карактеристични врзувачки протеини во плазмата

Човечката плазма содржи околу 100 протеини од кои 13 се присутни во концентрација поголема од 1 g/L. Меѓу овие вторите, шест се во можност да се врзат со лекови: човечки серумски албумин (HSA),  $\alpha$ 1-кисел гликопротеин (AAG), липопротеини (VLDL, LDL, HDL) и имуноглобулини G (IgG) (табела 3.1). Сепак, албуминот е далеку најважен за врзувањето со плазмените протеини, бидејќи тој претставува 60 % од вкупните плазмени протеини. Албуминот главно е вклучен во врзувањето на повеќето анјонски лекови и многу ендогени анјони. Многу катјонски и неутрални лекови, пак, значително се врзуваат со AAG и/или липопротеините (табела 3.2).

Различни состојби на болест може да го менуваат степенот на врзување на лековите за плазмените протеини. Модификацијата може да се должи и при серија физиолошки (бременост, пол, пушење, дебелина, нутриционен статус, операции, екстреми на возраст) и патолошки состојби (бубрежни и црнодробни болести, инфаркт, рак, повреди, дијабетес, болести на тироидната жлезда, цистична фиброза, инфламаторен артритис, хиперлипидотеинија).

Табела 3.1. Карактеристики на врзувачките плазмени протеини за лекови

Карактеристики	Албумин	AAG	Липопротеини
Молекулска маса (Da)	66300	40000	200000-1000000
Нормална серумска концентрација (mg/100 mL)	3500-5500	55-140	VLDL: <40 HDL: >35 LDL: 70-205
Полуживот (денови)	19	5,5	до 6
Дистрибуција	40% интраваскуларно 60% екстраваскуларно	/	/

Табела 3.2. Доминантни врзувачки протеини за некои лекови врзани со > 70 % од плазмените протеини

Албумин	Албумин и AAG	Албумин и липопротеини	Албумин, AAG и липопротеини
Цефтриаксон (К)	Алпренолол (Б)	Циклоспорин (Н) <sup>б</sup>	Амитриптилин (Б)
Клиндамицин (К)	Карбамазепин (Н)	Пробукол (Н) <sup>б</sup>	Бупивикаин (Б)
Клофибрат (К)	Дизопирамид (Б) <sup>б</sup>		Хлорпромазин (Б)
Дексаметазон (Н)	Еритромицин (Б)		Дилтиазем (Б)
Дијазепам (Б)	Лидокаин (Б)		Имипрамин (Б)
Диазоксид (К)	Меперидин (Б)		Нортриптилин (Б)
Диклоксацилин (К)	Метадон (Б)		Перазин (Б)
Дигитоксин (Н)	Верапамил (Б)		Пропранолол (Б)
Етопозид (Н)			Хинидин (Б)
Ибупрофен (К)			
Индометацин (К)			
Нафцилин (К)			
Напроксен (К)			
Оксацилин (К)			
Фенилбутазон (К)			
Фенитоин (К)			
Пробенецид (К)			
Салицилна киселина (К)			
Сулфисоксазол (К)			
Тенипозид (Н)			
Тиопентал (К)			
Толбутамид (К)			
Валпроична киселина (К)			
Варфарин (К)			

<sup>а</sup>К = киселина; Б = база; Н = неутрална молекула; <sup>б</sup>Албуминот е најмалку значаен врзувачки протеин.

### 3.4.1. Човечки серумски албумин (Human serum albumin, HSA)

Албуминот претставува единечна пептидна верига составена од околу 580 аминокиселински остатоци од 20 различни аминокиселини и има молекулска маса од 67 500 Da. Основната физиолошка улога на албуминот е одржувањето на колоидниот осмотски притисок во васкуларниот систем и транспорт на масните киселини и билирубинот. Тој не е ограничен во плазмата, туку постојано се филтрира со бавна стапка во интерстицијалната течност. Исто така, присутен е и во цереброспиналната течност (табела 3.3). Албумин-врзаните лекови затоа се наоѓаат не само во плазмата, но, исто така, и во интерстицијалната течност, која содржи 60 % од албуминот во телото. Различните аминокиселини и нивната меѓусебна положба во молекулата на протеините го дефинираат врзувањето на лековите. Базните групи на аминокиселините аргинин, хистидин и лизин се одговорни за врзување на киселите лекови, додека пак киселите групи на аспаргинската, глутаминската киселина и тирозинот за врзување на алкалните лекови. Лековите со албуминот се врзуваат, реверзибилно, со помош на van der Waals-ови сили, водородни и јонски врски, и иако поретко ирреверзибилно со помош на ковалентни врски. Сепак, ковалентното врзување може да вклучува различни видови врски, што резултира со создавање стабилни, но сè уште реверзибилни лек-протеин комплекси.

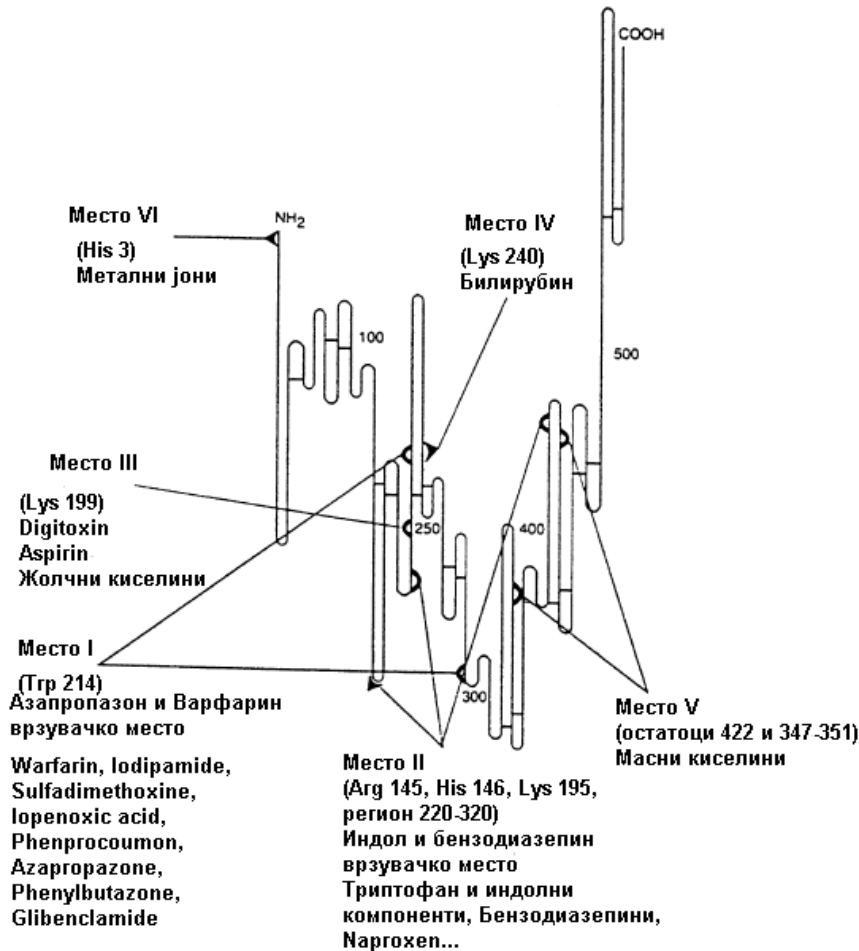
Дефинирани се две основни области со врзувачки места на албуминот за лекови со „висок афинитет“. Овие места се означени како *варфаринско место* (место I) и *бензодиазепинско место* (место II). И двете места во реалноста се делат и со други лекови и ендогени соединенија. Неколку лекови (на пр. напроксен, толбутамид, индометацин) се врзуваат и на двете места. Со помош на метод со флуоресцентни маркери биле откриени и дополнителни врзувачки места и нивните локации (слика 3.1 и 3.2). Киселите лекови потентно се врзуваат за албуминот (1-2 молекули на една молекула албумин), додека, пак, базните позитивно наелектризирани лекови слабо се врзуваат за албуминот. Албуминот има тенденција да покажува низок афинитет и висок капацитет за овие базични лекови и варијација во концентрациите на албумин, на пример, не резултира со значителни промени во нивното врзувањето за плазмените протеини.

**Табела 3.3.** Нормална содржина на албумин во некои телесни течности

	Плазма	Трансудати	Плеврална течност	Перикардијална течност	Перитонеална течност	Цереброспинална течност
<b>Албумин (g/L)</b>	40	20	9	20	9	0,2



**Слика 3.1.** Локација на врзувачките места I и II кај човечкиот серумски албумин.



**Слика 3.2.** Детална локација на врзувачките места кај човечкиот серумски албумин.

Нормалните вредности на албуминот кај возрасни (> 3 год.) се 3,5 - 5 g/dL. Кај деца (< 3 год.) нормалниот концентрациски ранг е поширок од 2,9 - 5,5 g/dL.

Ниска содржина на албумин (хипоалбуминемија) може да биде предизвикана од црнодробни болести, нефротски синдром, изгореници, ентеропатија со протеинска загуба, малапсорпција, малнутриција, во повисоките месеци од бременоста, генетски варијации и малигнитет.

Висока содржина на албумин (хипералбуминемија) скоро секогаш е предизвикана од дехидратација. Во некои случаи на дефицит на ретинол, нивоата на албумин може да бидат покачени до високи-нормални вредности (на пр. 4,9 g/dL).

### 3.4.2. $\alpha$ 1-кисел гликопротеин (AAG)

AAG (орозомукоид) е гликопротеин со пониска молекулска маса од албуминот и се карактеризира со висока содржина на јаглехидрати. Тој е мономер од 181 аминокиселина и 40 % од глицидни (шеќерни) остатоци. Врзувањето на лековите за AAG веројатно вклучува повеќе хидрофобни отколку електростатски сили. AAG е присутен во плазмата во концентрации кои нормално се 100 пати пониски отколку за албуминот. Спротивно на хомогеноста на албуминот, вообичаено се среќаваат полиморфни форми на AAG. Овие варијанти може да бидат селективни и поседуваат различни врзувачки капацитети за лековите. Врзувачките места за лекот се верува дека се наоѓаат на полипептидната верига и можат да бидат споделени и од страна на киселините и базите. Иако AAG е познат како еден од главните врзувачки протеини за многу базични лекови, исто така, врзува и некои кисели и неутрални лекови, но во помала мера. Варфаринот, на пример, може да се натпреварува со лекови кои се врзуваат за AAG.

Во принцип, AAG е наведен како „ниско капацитетен, високо афинитетен“ протеин, додека албуминот е „високо капацитетен, ниско афинитетен“ протеин. Плазмената концентрација на AAG е многу подложна на состојбите на болести и стрес. Зголемено ниво на

AAG се забележува при различни состојби на воспаление или повреда, затоа зголемување на AAG-врзувачкиот капацитет може да се забележи кај овие пациенти во споредба со здрави доброволци.

### 3.4.3. Липопотеини

Липопотеините се исклучително хетерогена група на протеини кои имаат широк спектар на молекулска маса и липидна содржина. Нивните терциерни и кватернерни структури не се целосно разјаснети, но се знае дека поларни протеини и липиди го опкружуваат хидрофобниот центар составен од неполарни липиди. Трите најважни групи се: липопотеини со многу ниска густина (VLDL), липопотеини со ниска густина (LDL) и липопотеини со висока густина (HDL) (табела 3.4). Нивните концентрации може опширно да варираат во нормалната популација. Тие вршат транспорт на масните киселини, триглицериди, фосфолипиди и холестерол и исто така може да бидат одговорни за врзување на одредени лекови како што се хлорпромазин, имипрамин, пробукол, циклоспорин, тетрациклини и никардипин. Сепак, скоро сите видови лекови се способни за врзување со изолирани липопотеини, под услов да покажуваат одреден степен на липофилност. За лековите кои се врзуваат со липопотеините се смета дека всушност се распределени во липидното јадро на протеинот, наместо да се асоцираат со специфично место. Заради оваа причина, не е веројатно да се случи конкуренција помеѓу лековите за одредени места и не се очекува концентрација-зависно врзување.

Табела 3.4. Карактеристики на плазмените липопотеини

Карактеристики	VLDL	LDL	HDL
Молекулска маса	$10^7$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
Протеини (%)	10	20	50
Холестерол (%)	20	48	10
Фосфолипиди (%)	20	24	22
Триглицериди (%)	50	8	18
Концентрација на гладно (g/L)	1,2	55	32,5
Плазмена количина (%)	12,5	55	32,5

### 3.5. Важност на протеинското врзување во развојот на лекови

Врзувањето со плазмените протеини може да биде важно во одредувањето на дистрибуцијата на лекот, метаболизмот и елиминацијата. Општо е прифатено дека само неврзан/слободен лек може да дифундира низ мембранските бариери и да интерреагира со метаболните ензими. Интеракцијата на слободниот лек со ткивата, исто така, може да влијае на неговата дистрибуција. Детерминантите на врзување во ткивата изложени на лекот се истите како и оние за плазмата: протеинска концентрација, афинитет кон протеините, концентрација на слободниот лек која е на располагање. Меѓутоа, целокупното врзување во ткивата во телото (слободниот/неврзан дел,  $f_{u,t}$ ) е тешко да се измери, иако поновите инструментални техники (т.е. микродијализа) може да помогнат во остварувањето на оваа цел. Фармакокинетските параметри, кои се детерминанти на плазмениот профил концентрација на лек-време, се рамнотежниот волумен на дистрибуција ( $V_{ss}$ ), клиренс (CL) и полуживот на елиминација ( $t_{1/2}$ ).

### 3.6. Техники на определување на протеинското врзување: краток преглед на најпопуларните техники вклучувајќи ги предностите и недостатоците

Определувањето во *in vitro* услови на лек врзан за плазмените протеини се користи за да се пресметаат фармакокинетските параметри и да се прават предвидувања за фармакокинетското однесување на лекот. Главниот проблем при екстраполацијата од *in vitro* во *in vivo* услови е можноста вредностите да бидат погрешни поради артефакти од постапката. Предностите и недостатоците на трите најчесто употребувани методи за испитување на врзувањето со плазмените протеини се дискутирани подолу. Овие техники се корисни и во студии каде што еден протеин се користи со цел да се утврдат главните придонесувачки протеини, кинетиката на врзување и видот на врзувачките места и за испитување на

врзувањето на лекот со тивните хомогенати. Мора да се нагласи дека многу често вредностите добиени со користење различни техники може да бидат значително различни поради различни технички аспекти, а мора да се земат предвид и самите карактеристики на лекот.

### 3.6.1. Рамнотежна дијализа

Рамнотежната дијализа е широко користен метод за изучување на лиганд-протеинските интеракции. Како типичен пример на рамнотежна дијализа, растворот на високомолекуларно соединение (протеин) кој содржи лиганд (лек) е одвоен со полупорозна мембрана (дијализна мембрана) со пори со позната големина од пуферскиот раствор. Откако рамнотежата е постигната, концентрацијата на слободниот лиганд е еднаква на двете страни на мембраната. Според законот на Fick, стапката на дифузија на лигандот зависи од површината, дебелината на мембраната, концентрацискиот опсег, волуменот и коефициентот на дифузија. Последниот е функција и на молекулската маса, температурата и карактеристиката на лигандот. Плазмата и пуферот се ставаат во нивните резервоари разделени со дијализната мембрана. Системот потоа се инкубира на определена температура и се остава да се постигне рамнотежата. Потоа, се отстранува течноста од секој резервоар и се анализира концентрацијата на лекот.

Постдијализната концентрација на лекот во пуферскиот резервоар ( $C_u$ ) ќе биде во рамнотежа со слободната концентрација на лекот во резервоарот со плазма така што процентот на врзување ќе биде како што следува:

$$\% \text{ врзан лек} = \frac{C_t - C_u}{C_t} \times 100$$

каде што  $C_t$  е концентрација на лекот во резервоарот на плазма по дијализа. Постојат бројни променливи кои мора да се контролираат во експериментот со рамнотежната дијализа со цел да се добијат точни резултати: инкубационата температура и времето за инкубација, неспецифичните врзувања за апаратот или мембраната, растворливоста на лекот во пуферот, радиохемиската чистота на лекот, pH при кое се врши инкубацијата, волуменот и сл.

Рамнотежната дијализа е всушност специфична апликација на дијализата која е важна во испитувањето на врзувањето на мали молекули и јони со протеини. Оваа техника се користи за испитување на:

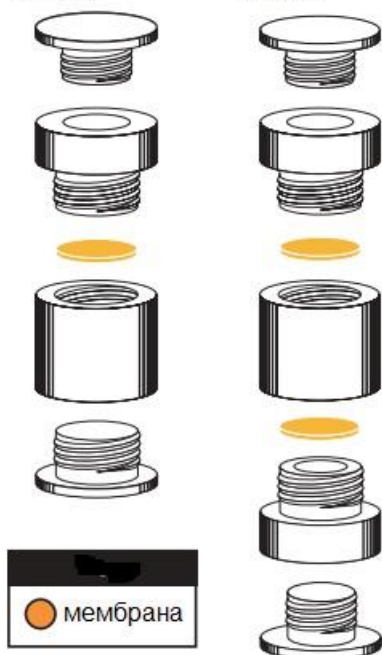
- Протин-лек врзување
- Тестови за врзување со рецептори
- Тестови за врзување со лиганди
- Протеин-протеин интеракции
- Протеин-ДНК интеракции
- Серумско протеинско врзување

Подолу (слика 3.3) се прикажани неколку видови апаратура за рамнотежна дијализа:

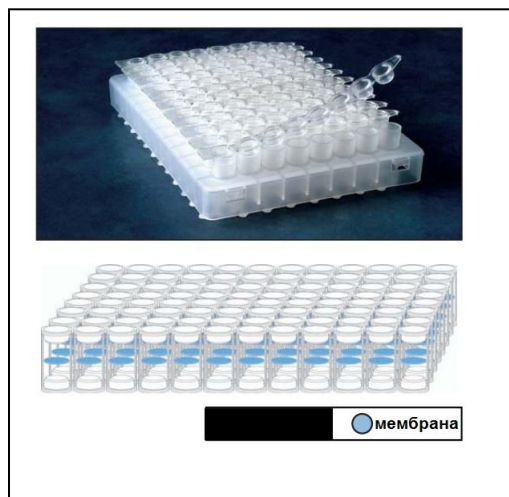


Систем со две комори

Систем со три комори



За примероци од 25  $\mu\text{L}$  до 500  $\mu\text{L}$



За примероци од 50  $\mu\text{L}$  до 200  $\mu\text{L}$



За примероци од 25  $\mu\text{L}$  до 75  $\mu\text{L}$

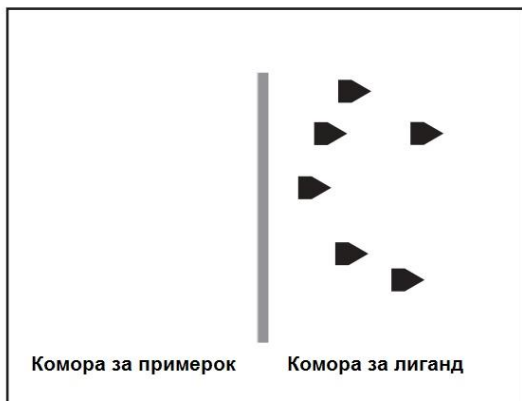
Слика 3.3. Примери за апаратура и прибор за рамнотежна дијализа.

### 3.6.1.1. Протокол на работа

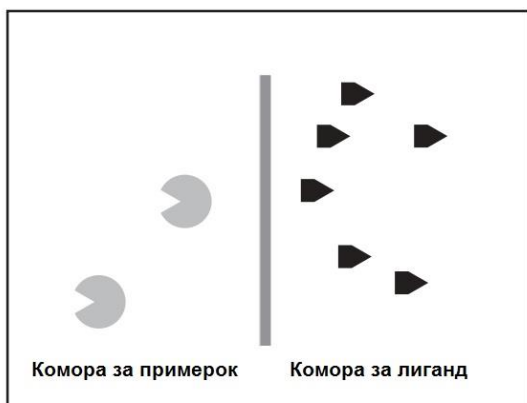


Во стандардниот тест за рамнотежна дијализа се почнува со две комори разделени со дијализна мембрана. Големината на порите на мембраната е така избрана, да ја задржува протеинската компонента на примерокот (елементот кој ќе се врзе со лигандот).





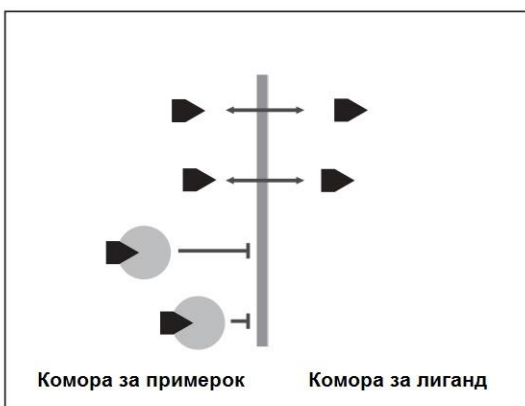
Позната концентрација и волумен од лигандот се поставува во една од коморите. Молекулите на лигандот се доволно мали за да поминуваат слободно низ мембраните.



Протеински раствор со позната концентрација (плазмени протеини, рецептори и сл.) се поставува во втората комора во еквивалентен волумен на оној поставен во првата комора.



Како што лигандот дифундира низ мембраната дел од него ќе се врзе со протеините, а дел ќе остане слободен во растворот. Колку е повисок афинитетот, толку повисока концентрација од лигандот ќе се врзе со протеинот.



Дифузијата на лигандот низ мембраната и врзувањето со протеините продолжува додека да се достигне рамнотежна состојба. При рамнотежа, концентрацијата на слободниот лиганд во растворот е еднаква и во двете комори. Во комората со протеини, сепак вкупната концентрација на лигандот ќе биде повисока поради врзаната фракција на лигандот.

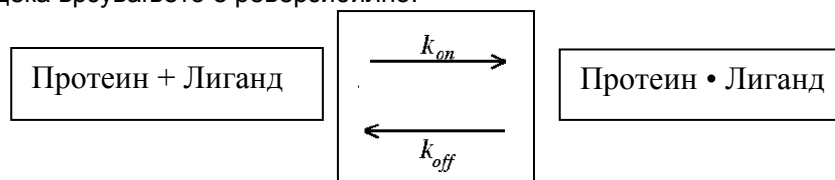
Определената концентрација на слободниот лиганд во комората за лиганд потоа може да се користи за определување на врзувачките карактеристики на испитуваниот примерок.

### 3.6.1.2. Анализа на примерокот

Рамнотежната дијализа може да се користи во најразлични експерименти при што се определува рамнотежното врзување на различни концентрации протеини и лиганди. Врската помеѓу врзувањето и концентрацијата на лигандот потоа се користи за определување на бројот на врзувачки места ( $B_{max}$ ) и афинитетот на лигандот ( $K_d$ ).

Анализа на податоците од врзување на лигандот

Анализата се темели на едноставен модел, моделот за законот за дејство на масите, кој претпоставува дека врзувањето е реверзибилно.



Константата на асоцијација е:

$$[\text{Лиганд}] \cdot [\text{Протеин}] \cdot k_{on}$$

Константата на асоцијација ( $k_{on}$ ) се изразува во единица  $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Штом ќе се поврзат, лигандот и протеинот остануваат врзани определен период од време, можноста за дисоцијација е неизвесна. Протеинот „не знае“ колку долго ќе остане врзан со лигандот. Константата на дисоцијација е:

$$[\text{Лиганд} \cdot \text{Протеин}] \cdot k_{off}$$

Константата на дисоцијација ( $k_{off}$ ) се изразува во единица  $\text{min}^{-1}$ . По дисоцијацијата, лигандот и протеинот се непроменети, како што биле пред поврзувањето. Рамнотежата се постигнува кога брзината со која новиот лиганд-протеин комплекс се формира (асоцира) е еднаква на брзината со која лиганд-протеин комплексот дисоцира. Во рамнотежната состојба важи:

$$[\text{Лиганд}] \cdot [\text{Протеин}] \cdot k_{on} = [\text{Лиганд} \cdot \text{Протеин}] \cdot k_{off}$$

Ако равенката се реаранжира, може да се дефинира дисоцијационата константа  $k_d$ , која е еднаква на  $k_{off}/k_{on}$  (во ензимската кинетика ова всушност е Михаелис-Ментеновата константа).

$$[\text{Лиганд}] \cdot [\text{Протеин}] / [\text{Лиганд} \cdot \text{Протеин}] = k_{off} / k_{on} = k_d$$

Значењето на  $k_d$  е лесно да се разбере. Ако  $[\text{Лиганд}]$  е еднаква на  $k_d$  во равенката, тогаш  $[\text{Протеин}] / [\text{Лиганд} \cdot \text{Протеин}] = 1$ , и  $[\text{Протеин}] = [\text{Лиганд} \cdot \text{Протеин}]$ . Бидејќи сите места на протеините се или слободни или врзани со лигандот, ова значи дека половината од протеините се слободни, а половината врзани со лигандот. Со други зборови, кога концентрацијата на лигандот е еднаква на  $k_d$ , половината од протеините ќе бидат зафатени во рамнотежната состојба. Ако протеинот има висок афинитет за лигандот,  $k_d$  ќе има ниска вредност бидејќи потребна е ниска концентрација од лигандот за да се врзе со половина од протеините.

Не треба да се мешаат  $k_d$  и рамнотежната дисоцијациона константа со  $k_{off}$ , константата на дисоцијација. Тие две се различни, имаат дури и различни мерни единици (табела 3.5).

**Табела 3.5.** Мерни единици на константите од интерес за протеинското врзување

Константа	Име	Единица
$k_{on}$	Константа на асоцијација	$M^{-1} \text{ min}^{-1}$
$k_{off}$	Константа на дисоцијација	$\text{min}^{-1}$
$k_d$	Рамнотежна дисоцијациона константа	M

Процентуалната зафатеност на врзувачките места на протеинот (или фракцијата на рецептори врзани со лигандот) може да се пресметува по формулата:

$$\text{Врзана фракција} = \frac{[\text{Лиганд}]}{[\text{Лиганд}] + K_d}$$

Односно, при различни концентрации на лиганд присутна е процентуалната зависност прикажана во табела 3.6.

**Табела 3.6.** Врска меѓу концентрација на лигандот и зафатеност на врзувачките места (во проценти)

[Лиганд]	Зафатена фракција
0	0
$1 \cdot K_d$	50 %
$4 \cdot K_d$	80 %
$9 \cdot K_d$	90 %
$99 \cdot K_d$	99 %

### 3.6.2. Ультрафилтрација

Овој метод за сепарација на врзаниот лек од слободниот лек е многу популарен поради достапноста на голем број комерцијални уреди за филтрација кои се едноставни за користење (Amicon®, Millipore®, BioRad®). Ультрафилтрацијата (слика 3.4) главно се користи под негативен притисок со центрифугирање на 1000-2000 вртежи за 15-30 минути. Принципот на оваа сепарациона постапка е што инкубацијата помеѓу лекот и протеините се прекинува со пропуштање на инкубатот преку ультрафилтрациона мембрана со определена големина на порите, при што само слободниот лек минува низ филтерот. Слободната концентрација ќе биде константна во ултрафилтратот и остатокот. Сепак, слободната концентрација останува константна во текот на филтрацијата под услов филтрираниот волумен да не надминува 40 % од вкупниот почетен волумен. Процентот на врзан лек се пресметува од формулата:

$$\% \text{ неврзан лек} = C_u / C_t \times 100$$

каде  $C_u$  е концентрација на лекот во ултрафилтратот (неврзан) и  $C_t$  е вкупната концентрација на лекот пред експериментот. Како и за рамнотежната дијализа, и кај оваа техника неспецифичното врзување може да биде високо. Сепак, релативно ниската цена, леснотијата и брзината на анализата придонесуваат за нејзината широка употреба.



**Слика 3.4.** Принцип на ультрафилтрација.

### 3.6.3. Ултрацентрифугирање

Со оваа техника, лек-протеинскиот комплекс формиран за време на инкубација се определува со таложење (пелетирање) на комплексот со користење на центрифугирање со голема брзина, оставајќи го слободниот лек во супернатантот. Времето и брзината на центрифугирање се одржуваат постојани сè додека се заврши целиот процес на таложење. По центрифугирање, обично на 10000 вртежи за неколку часа, се зема аликуот од супернатантот за определување на слободната концентрација на лекот. Процентот на неврзан лек се пресметува од:

$$\% \text{ неврзан лек} = C_u/C_t \times 100$$

каде  $C_u$  е концентрацијата на лекот во супернатантот (неврзан) и  $C_t$  е вкупната концентрација пред експериментот. Применливоста на оваа техника е ограничена со серија на фактори: скапата опрема, ниската обработка на примероци, ограничен волумен за слободна анализа, физички феномени (седиментација, обратна дифузија, врзување со липопротеините).

## 4. ПРВА ФАЗА ОД МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ

Основна цел кога организмот е изложен на потенцијален ксенобиотик е да го отстрани од телото што е можно побрзо. Додека ова е разумна стратегија од гледна точка за опстанокот на организмот, таа претставува главна пречка за производството на ефикасен лек. Терминот ензими за метаболизирање на лековите може да биде еден вид поедноставување, бидејќи тие често се вклучени главно и во метаболизмот на ендогените соединенија. Освен тоа, интерференцијата на овие ендогени патишта за метаболизирање и молекулите на лековите може да резултира со несакани ефекти кои може и да не бидат лесни за идентификување од основните физичко-хемиски и фармаколошки својства на молекулата. Метаболизмот на лекови може да биде поделен на две области, Фаза I и Фаза II.

Фазата I од метаболизмот вклучува голем број реакции како што се оксидација, хидролиза и редукција. Овие реакции често се нарекуваат и функционализирачки реакции, бидејќи генерално доведуваат до воведување или откривање клучни функционални групи во молекулата (на пример  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , итн.) кои можат да го олеснат отстранувањето на ксенобиотикот од телото, било непосредно или преку конјугација со поларните кофактори на Фаза II-метаболизирачките системи. Табела 4.1 ги прикажува главните класи на ензимите од Фаза I кои се вклучени во метаболизмот на лековите.

**Табела 4.1.** Тип на реакции катализирани од ензимите на Фаза I

Ензим	Реакција
Цитохром P450 (CYP)	Оксидација, редукција
Моноамино оксидази (MAO)	Оксидација
Флавин-монооксигенази (FMO)	Оксидација
Алкохол дехидрогеназа	Оксидација
Алдехид дехидрогеназа	Оксидација (редукција)
Ксантин оксидази	Оксидација
Епоксид хидролаза	Хидролиза
Карбоксилестерази	Хидролиза
Пептидази	Хидролиза
Карбонил редуктаза	Редукција

### 4.1. Хидролиза

Главните хидролитички ензими се карбоксилестеразите, холинестеразите и параоксоназите (за кои името лактонази е посеопфатно), но во никој случај не значи дека тие се единствените хидролитички ензими вклучени во метаболизмот на ксенобиотици. Првите две класи на хидролитички ензими, карбоксилестеразите и холинестеразите, се познати како серин-естерази бидејќи нивниот каталитички дел од молекулата содржи нуклеофилни остатоци

на серин кои учествуваат во хидролизата на различни ксенобиотски или ендобиотски супстрати. Врз основа на големиот број потенцијални серин хидролази, не е изненадувачки што и други ензими различни од карбоксилестерази, холинестерази и параоксонази, можат да земат учество во метаболизмот на ксенобиотиците. За алдехид дехидрогеназите, карбоанхидразите, карбоксипептидазите, липазите, протеазите, па дури и за албуминот е покажано дека имаат хидролитичка (естеразна) активност кон некои ксенобиотици. Хидролизата на ксенобиотиците преку карбоксилестерази и други хидролитички ензими не секогаш е процес на детоксикација. Постојат случаи во кои карбоксилестеразите може да ги конвертираат ксенобиотиците до токсични туморогени метаболити (на пример, метаболизам на винил ацетат до ацеталдехид).

#### **4.1.1. Карбоксилестерази (CE)**

Карбоксилестеразите го сочинуваат семејството на ензими кои се способни да хидролизираат различни лекови и други ксенобиотици кои содржат киселински, амидни или тиоестерни функционални групи. Некои карбоксилестерази играат важна улога во детоксикацијата на органофосфорните соединенија (ОФС) и оваа активност најчесто се користи за да се класифицираат овие ензими; А-естеразите се во можност да ги хидролизираат ОФС, В-естеразите се инхибираат од ОФС и С-естеразите не реагираат со ОФС. Хидролизата на ксенобиотичките естри и амиди кај човекот е во голема мера катализирана од само две карбоксилестерази hCE1 и hCE2.

Во прилог на хидролизирањето на ксенобиотиците, карбоксилестеразите хидролизираат и различни ендогени соединенија, како што се палмитоил-СоА, моноацилглицерол, диацилглицерол, ретинил естер, тромбоцит-активирачки фактор и други естрифицирани липиди.

#### **4.1.2. Холинестерази (AChE и BChE)**

Ацетилхолинестеразата (AChE) и бутирилхолинестеразата (BChE, исто така позната како псеудохолинестераза) се слични ензими. Како што кажуваат имињата, AChE и BChE имаат висока активност кон ацетилхолин и бутирилхолин, соодветно. BChE исто така може да ги хидролизира хлоропропан, кокаин, метилпреднизолон ацетат, хероин, мивакуриум, прокаин, сукцинилхолин, тетракаин и други лекови.

Обата ензими се наоѓаат во шест различни форми со различна растворливост: G1, G2, G4, A4, A8 и A12. Сите овие форми се експресираат во мускулите. Во случајот на AChE, главна форма во мозокот е тетрамерот G4, но главна форма во ентероцитите е димерот G2. Кај обете, AChE и BChE, естерското место (кое го содржи активниот дел од серинскиот остаток) е прикачено за анјонско (негативно наелектризирано) место кое стапува во интеракција со позитивно наелектризираниот азот на ацетилхолинот и бутирилхолинот. Генетски варијанти на AChE што сериозно ја нарушуваат активноста не се откриени, што е важен факт со оглед на клучната улога која AChE ја има во прекинување на невротрансмисијата преку ацетилхолин. Карбоксилестеразите во крвта и ткивата играат важна улога во лимитирање на количеството на органофосфорни соединенија кои доспеваат до AChE во мозокот, чијашто инхибиција е всушност механизмот на токсичност на органофосфорните пестициди (и карбаматни инсектициди).

#### **4.1.3. Параоксонази (Лактонази)**

Параоксоназите ја катализираат хидролизата на широк спектар на органофосфати, органофосфити, естри на ароматични карбоксилни киселини, циклични карбонати и лактони. Тие се калциум-зависни ензими кои содржат критична сулфхидрилна (-SH) група. Луѓето експресираат три типа параоксонази означени како hPON1, hPON2, и hPON3. Сепак, сите три ензими можат да ја катализираат хидролизата и на различни лактони, и од таа причина за нивно означување се употребува и името „лактонази“.

#### **4.1.4. Пептидази**

Со напредокот на рекомбинантната ДНК технологија, интензивно се испитуваат за употреба како терапевтски агенси бројни човечки пептиди и во моментов клинички се користат

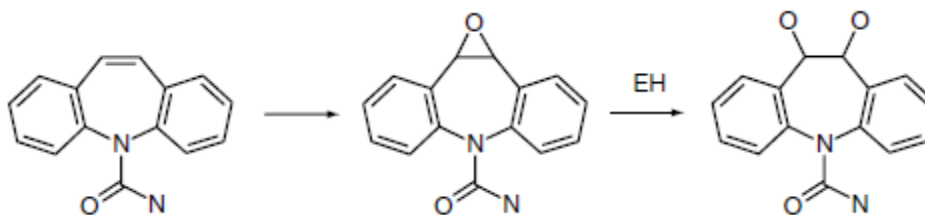
повеќе рекомбинантни пептидни хормони, фактори на раст, цитокини, растворливи рецептори и хуманизирани моноклонални антитела.

Пептидите се хидролизирани во крвта и ткивата од различни пептидази, вклучувајќи ги аминопептидазите и карбоксипептидазите (кои ги хидролизирани аминокиселините на N- и C-краевите, соодветно) и ендопептидазите (кои ги расцепуваат пептидите на специфични делови). Пептидазите ја раскинуваат амидната врска помеѓу соседните аминокиселини, па оттука, тие функционираат како амидази. Како и во случајот на карбоксилестеразите, активното место на пептидазите содржи или серински или цистеински остаток.

#### 4.1.5. Епоксид хидролази (EH)

Епоксид хидролазите ја катализираат конверзијата на епоксидните и аренските оксиди до диоли преку адиција на вода. Овие потенцијално токсични електрофилни епоксиди често се формираат како резултат на оксидација на алкени и ароматични јаглеводороди од страна на CYP ензимите. EH играат значајна улога во детоксикацијата на електрофилните епоксиди кои инаку можат да се врзат за протеините и нуклеинските киселини и да предизвикаат клеточна токсичност и генетски мутации. Поради ова, EH се сметаат главно за група ензими која врши детоксикација.

Хидролизата на епоксидите од страна на EH се остварува со одделување на протон од молекулата на вода за да се формира нуклеофилен хидроксиден јон кој тогаш напаѓа еден од јаглеродните атоми на епоксидот. Супстрати за EH се на пример, епоксидните метаболити на карбамазепин и некои полициклични ароматични јаглеводороди. Главниот метаболит на карбамазепин е епоксид, кој е толку стабилен што карбамазепин 10,11-епоксид е главен циркуирачки метаболит кај пациенти третирани со овој антиепилептичен лек. Метаболизмот на карбамазепин катализиран од EH е илустриран на слика 4.1.



Слика 4.1. Метаболизам на карбамазепин катализиран од страна на епоксид хидролази.

Иако EH игра главна улога во детоксикацијата на неколку бензо[а]пирен оксиди, како што е 4,5-оксидот, таа сепак има улога и во конвертирање на бензо[а]пирен до неговиот терминален тумороген метаболит, бензо[а]пирен-7,8-дихидродиол-9,10-епоксид.

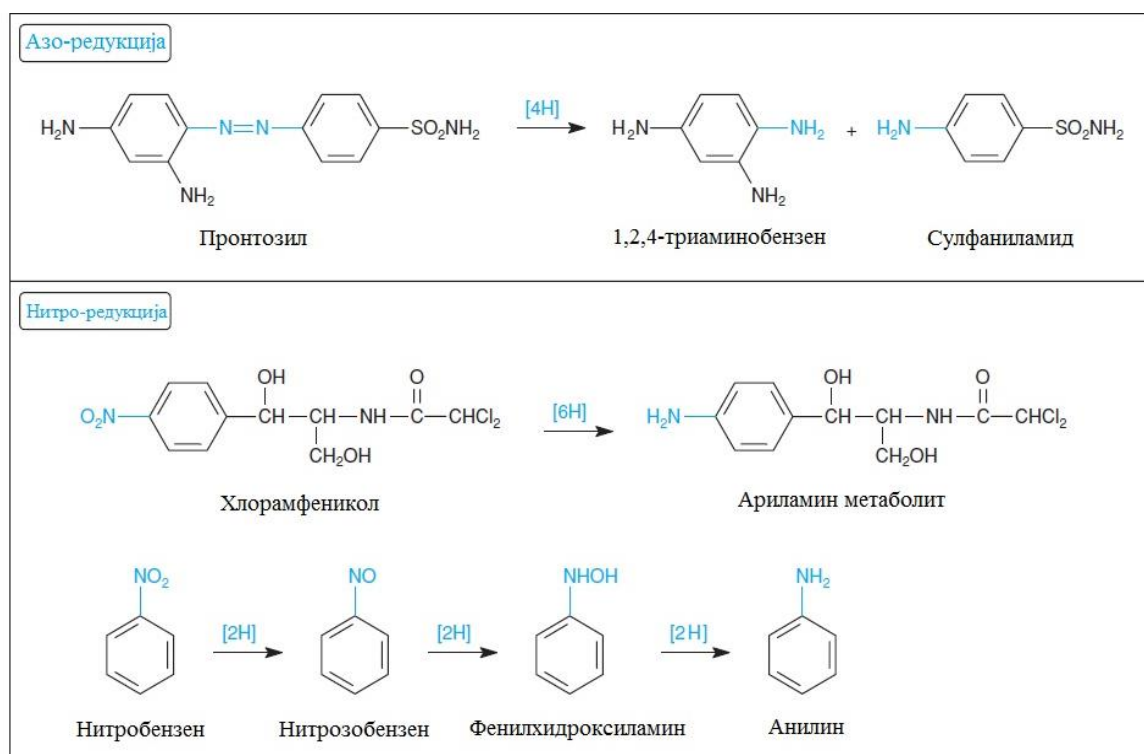
## 4.2. Редуција

Одредени ксенобиотици кои содржат алдехидна, кетонска, алкенска, дисулфидна, сулфоксидна, хинон, N-оксид, хидроksamска киселина, амиодоксим, изоксазол, азо- или нитро-група честопати се редуцираат *in vivo*, иако понекогаш е тешко да се утврди дали реакцијата се одвива ензимски или неензимски преку интеракција со редуциони агенси (како што се редуцираните форми на глутатион, FAD, FMN, и NAD[P]). Некои од овие функционални групи можат да бидат или редуцирани или оксидирани. На пример, алдехидите (R-CHO), можат да бидат редуцирани до алкохоли (R-CH<sub>2</sub>OH) или оксидирани до карбоксилни киселини (R-COOH), додека сулфоксидите (R<sub>1</sub>-SO-R<sub>2</sub>) можат да бидат редуцирани до сулфид (R<sub>1</sub>-S-R<sub>2</sub>) или оксидирани до сулфон (R<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-R<sub>2</sub>). Исто така, некои ензими, како алкохол дехидрогеназа, алдехид оксидаза, и цитохром P450 можат да катализираат и редуциони и оксидациони реакции во зависност од супстратот или условите.

### 4.2.1. Азо- и нитро-редуција

Пронтозил и хлорамфеникол се примери за лекови кои подлежат на азо- и нитро-редуција, соодветно, како што е покажано на слика 4.2. Во текот на азо-редуцијата, N=N двојната врска последователно се редуцира и раскинува за да се продуцираат два примарни

амини, реакција која има потреба од четири редуцирачки еквиваленти. Нитро-редукцијата има потреба од шест редуцирачки еквиваленти, кои се конзумираат во три последователни реакции, како што е случај со конверзијата на нитробензен до анилин (слика 4.2).

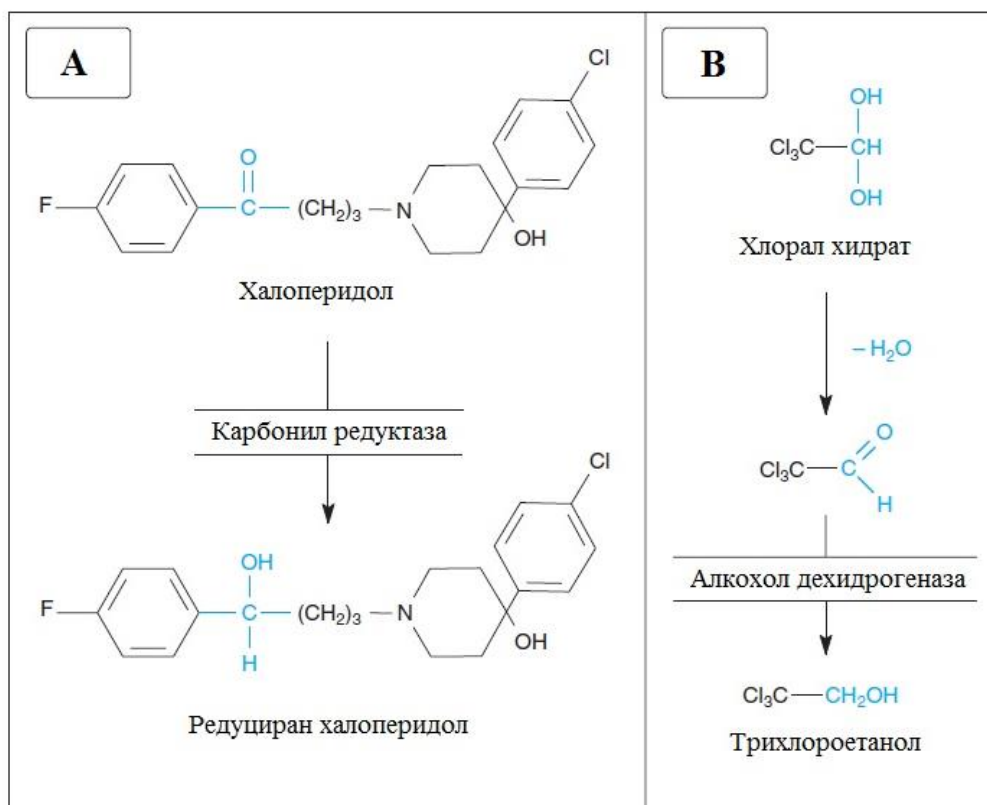


**Слика 4.2.** Примери за лекови кои подлежат на азо-редукција (пронтозил) и нитро-редукција (хлорамфеникол и нитробензен).

#### 4.2.2. Карбонилна редуција

Различни ксенобиотици содржат карбонилна функционална група ( $R-CHO$  и  $R_1-CO-R_2$ ) која подлежи на редуција *in vivo* (слика 4.3). Редуцијата на алдехидите до примарни алкохоли и редуцијата на кетоните до секундарни алкохоли кај цицачите генерално се катализира преку NAD(P)H-зависни редуктази кои припаѓаат кон една од двете суперфамилии, алдо-кето редуктази (AKR) и дехидрогенази/редуктази.

Во одредени случаи, редуцијата на алдехидите до алкохоли може да биде катализирана и преку алкохол дехидрогеназата (како што е покажано на слика 4.3). Алкохол дехидрогеназите припаѓаат на суперфамилијата дехидрогенази/редуктази и се опишани подоцна во делот за оксидативни реакции.



**Слика 4.3.** Редукција на ксенобиотици преку карбонил редуктаза (A) и алкохол дехидрогеназа (B).

#### 4.2.3. Редукција на хинони (NQO1 и NQO2)

Хиноните можат да бидат редуцирани до хидрохинони преку два тесно поврзани, цитозолни флавопротеини, имено, NQO1 и NQO2. Првиот ензим, NAD(P)H-хинон оксидоредуктаза-1, е исто така познат како DT-дијафорида. Вториот ензим, NAD(P)H-хинон оксидоредуктаза-2, е исто познат како NRH-хинон оксидоредуктаза бидејќи тој го преферира невообичаениот донор на електрони дихидроникотинамид рибозид (NMR) повеќе отколку NAD(P)H.

Формирањето на хидрохинон вклучува двоелектронска редукција на хинонот со NQO1. Двоелектронската редукција на хиноните е нетоксична реакција (која не е поврзана со формирањето на семихинони и оксидативен стрес) во случај ако добиениот хидрохинон е доволно стабилен. Сепак, постојат ксенобиотици кои содржат хинон во својата структура и кои, и покрај подложувањето на двоелектронска редукција преку NQO1, продуцираат семихинонски слободни радикали, оксидативен стрес, оштетување на ДНК и цитотоксичност.

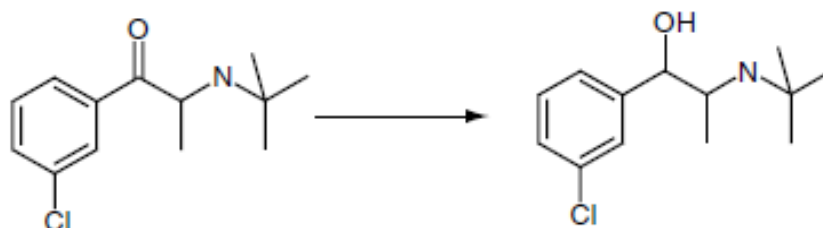
Меѓу индукторите кои очигледно го зголемуваат нивото на NQO1 се сулфорафан, состојка од брокула која може да биде одговорна за антиканцерогените ефекти на ова зелјесто растение. Изотиоцијанатите (кои се исто така присутни во висока концентрација во зелјестите зеленчуци), веројатно, ги покажуваат своите хемопревентивни ефекти во голема мера токму преку индукција на детоксицирачките ензими, имено, глутатион трансфераза (GSTA1), микрозомална епоксид хидролаза, алдо-кето редуктаза (AKR7A, исто така позната како афлатоксин алдехид редуктаза), NAD(P)H-хинон оксидоредуктаза (NQO1, исто така познат како DT-дијафорида), глутамат-цистеин лигаза (GCL) како и на гените вклучени во апоптозата.

#### 4.2.4. Карбонил редуктази

Карбонил редуктазите се ензими кои ги редуцираат алдехидите и кетоните до примарни и секундарни алкохоли. Овие ензими имаат потреба од NADPH како кофактор за разлика од ADH и ALDH. Типични лекови-супстрати се кетоните многу почесто од алдехидите, бидејќи многу малку терапевтски агенси содржат алдехидна група поради нејзината реактивна



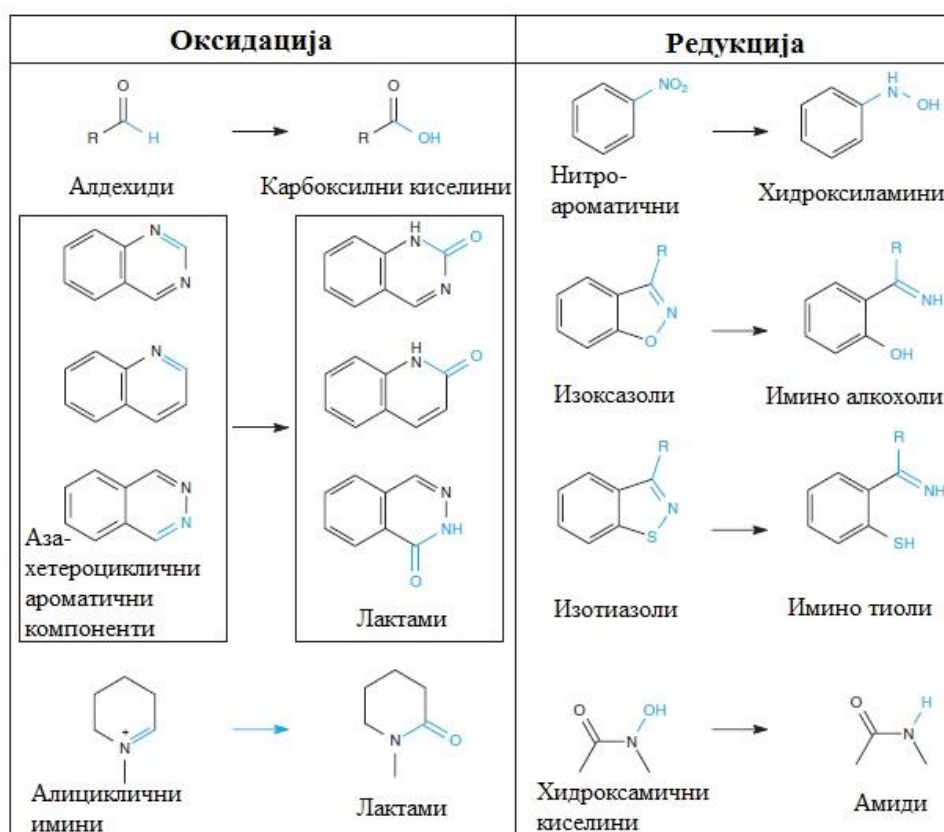
природа. Голем број терапевтски агенси како халоперидол, даунорубицин, варфарин и нафимидон се подложени на метаболизам катализиран од страна на овие ензими. Лекот бупроприон се редуцира исто така од оваа класа на ензими (слика 4.4).



Слика 4.4. Метаболизам на бупроприон од страна на карбонил редуктаза.

#### 4.2.5. Алдехид оксидаза – Редуктивни реакции

Алдехид оксидазата е цитозолен молибдо-ензим кој ја катализира оксидацијата на некои ксенобиотици и редукцијата на други. Типовите на оксидативни и редукциони реакции катализирани преку алдехид оксидаза се покажани на слика 4.5.

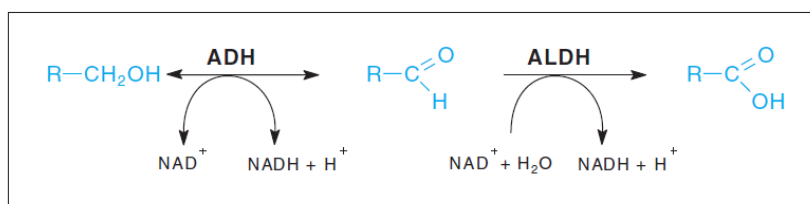


Слика 4.5. Примери за реакции на оксидација и редукција катализирани од алдехид оксидаза.

#### 4.3. Оксидација

Алкохолите, алдехидите и кетоните се оксидираат од страна на бројни ензими, вклучувајќи ги: алкохол дехидрогеназа, алдехид дехидрогеназа, ензими кои содржат молибден – алдехид оксидаза и ксантин дехидрогеназа/оксидаза, MAO, како и цитохром P450. На пример,

нижите алкохоли (како метанол и етанол) се оксидираат до алдехиди (имено, формалдехид и ацеталдехид) преку алкохол дехидрогеназата (слика 4.6).



**Слика 4.6.** Оксидација на алкохоли до алдехиди и карбоксилни киселини преку алкохол (ADH) дехидрогеназа и алдехид дехидрогеназа (ALDH).

#### 4.3.1. Алкохол дехидрогеназа (ADH) и алдехид дехидрогеназа (ALDH)

ADH и ALDH се цитозолни ензими кои содржат цинк во својата молекула и ги конвертираат алкохолите до алдехиди (со дејство на ADH) и алдехидните производи последователно до карбоксилни киселини (со ALDH) (слика 4.6). И ADH и ALDH се наоѓаат главно во црниот дроб, но, исто така, се наоѓаат и во бубрезите, белите дробови и гастроинтестиналниот тракт и имаат потреба од присуство на NAD<sup>+</sup> како кофактор.

ADH и ALDH не се широко вклучени во метаболизмот на лекови иако антивирусниот агенс абакавир е пример на соединение кое се метаболизира преку овие ензими.

Кај луѓето постојат повеќе изоформи на ADH кодирани од страна на седум различни ADH гени. Една форма на атипична ADH е распространета меѓу Јапонците (85 % од населението), што резултира со невообичаено брза конверзија на етанолот до ацеталдехид. Сепак, ензимот ALDH одговорен за понатамошната оксидација на ацеталдехидот до оцетна киселина е, исто така, атипичен кај околу 50 % од Јапонците кои се сиромашни метаболизатори на ацеталдехид, па така несаканите ефекти од ацеталдехид (црвенило, гадење) ја објаснуваат добропознатата нетолеранција на алкохол кај Јапонците.

#### 4.3.2. Молибден хидроксилази (молибдозими)

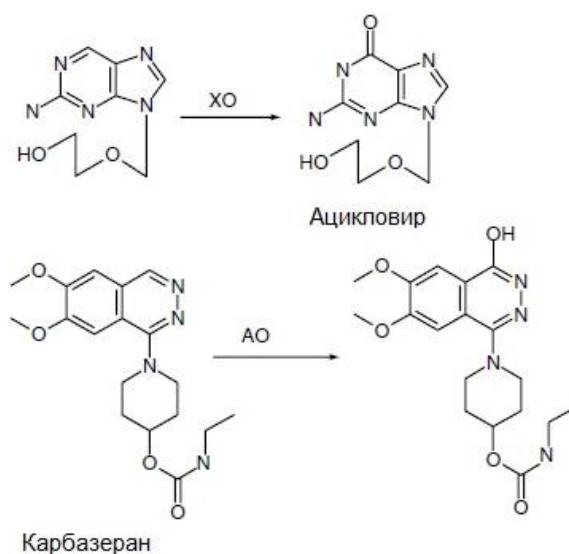
Постојат две главни молибден хидроксилази или молибдозими кои учествуваат во биотрансформацијата на ксенобиотиците: алдехид оксидаза и ксантин оксидаза (исто позната како ксантин оксидоредуктаза). Како што кажува името, алдехид оксидазата може да конвертира одредени алдехиди до соодветни карбоксилни киселини, особина која ја има и ксантин оксидазата, но со помала активност. Одредени ароматични алдехиди, како тамоксифен алдехидот и бензалдехидот, се добри супстрати за овие ензими, додека алифатичните алдехиди се лоши супстрати.

##### 4.3.2.1. Ксантин оксидаза (Xanthine oxidase, XO)

XO во физиолошки услови катализира секвенцијална оксидација на хипоксантинон до ксантин и мочна киселина. Монометилираните ксантини, исто така, може да бидат супстрати на овој ензим и се оксидираат до соодветните деривати на мочна киселина, додека диметилксантините (теофилин, теобромин) и 1,3,7-триметилксантинот (кофеин) се оксидираат преку CYP. Класичен инхибитор на ксантин оксидазата е алопуринол, лек кој се користи за лекување на гихт, заболување кое се должи на зголемена продукција на мочна киселина, што резултира со формирање и натрупување кристални депозити на слабо растворливи киселини во зглобовите. Алопуринолот го инхибира формирањето на мочна киселина, што го прави ефикасен лек во третманот на гихт. Про-лекот, 6-деоксиацикловир, ефикасно се конвертира во антивирусниот агенс ацикловир под дејството на ксантин оксидазата (слика 4.7).

#### 4.3.2.2. Алдехид оксидаза – Оксидациски реакции

Многу од карактеристиките на ксантин оксидазата се однесуваат и на алдехид оксидазата, вклучувајќи субклеточна локација (цитозол), ензимска структура и состав на кофактор, механизам на катализа, склоност кон оксидирање на јаглеродни атоми кои се во близина на азотни атоми во азотни хетероцикли и склоност кон оксидација првенствено на ароматичните алдехиди пред алифатичните алдехиди. Овој ензим функционира како вистинска оксидаза, што значи дека прво се редуцира и потоа повторно реоксидаира со молекуларниот кислород. Сепак, кислородниот атом вграден во структурата на метаболитите потекнува од водата (не е молекуларен кислород). Супстратите и за овој ензим се обично ароматични азакхетероциклични соединенија како супституирани пириколи, пиридини, пиримидини, пурини, птеридини и иминиум јони. Неколку лекови се оксидираат или секвенцијално или истовремено преку цитохром P450 и алдехид оксидаза, вклучувајќи ги хинидин, азапентин, циклофосфамид, карбазепам и пролинтан. Други лекови кои се оксидираат само со алдехид оксидазата се бромонидин, циталопрам, проприоналдеhid, O<sup>6</sup>-бензилгванин, 6-меркаптопурин, хинин, пиразинамид, метотрексат, ванилин, изованилин и фамцикловир. Фталазините како што е карбазеран исто така се оксидираат од алдехид оксидазата (слика 4.7).

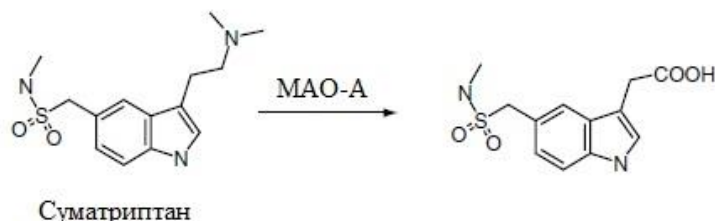


Слика 4.7. Примери за реакции катализирани од ксантин оксидаза и алдехид оксидаза.

#### 4.3.3. Моноамино оксидази (MAO)

Моноамино оксидаза (MAO), диамино оксидаза (DAO) и полиамино оксидаза (PAO) се ензими вклучени во оксидативната деаминација на примарни, секундарни и терциерни амини. Многу од ксенобиотиците се супстрати за овие ензими, особено за MAO. Со оксидативната деаминација на примарните амини се продуцира амонијак и алдехид, додека оксидативната деаминација на секундарните амини продуцира примарен амин и алдехид. Алдехидите формирани со MAO обично понатаму се оксидираат со други ензими до соодветни карбоксилни киселини. Супстратите на MAO се подложуваат на оксидативна деаминација но, за разлика од CYP, кислородот кој се вградува во метаболитот почесто потекнува од водата. MAO ензимите се присутни кај човекот во две изоформи, MAO-A и MAO-B. Ензимот е лоциран во митохондриите и присутен во голем број ткива како што се црниот дроб, бубрезите, цревата и мозокот. Повеќето ткива ги содржат обете форми на ензимот.

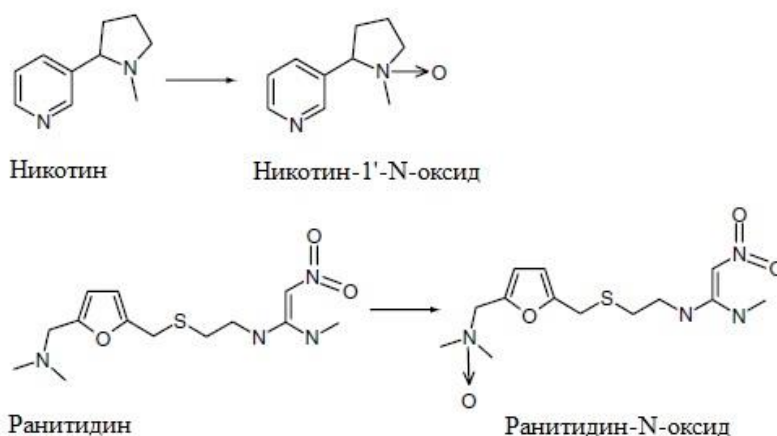
MAO-A првенствено ги оксидира милацемид (деалкилиран метаболит на пропранолол), примаквин, халоперидол, доксиламин,  $\beta$ -фенилетиламин, тирамин, катехоламини (допамин, норепинефрин, епинефрин), триптофанските деривати (триптамин, серотонин) и аналозите на триптофан познати како триптани кои ги вклучуваат лековите против мигрена (5-HT<sub>1B/1D</sub> рецепторни агонисти) суматриптан (слика 4.8), золмитриптан и ризатриптан. Поновите соединенија од оваа класа триптани се супституирани на  $\alpha$ -јаглеродниот атом, што ги прави отпорни на метаболички напад од страна на MAO-A. Супстрати на MAO-B се арилалкиламините како фенилетиламин и бензиламин.



Слика 4.8. Метаболизам на суматриптан катализиран од страна на MAO-A.

#### 4.3.4. Флавин монооксигенази (FMO)

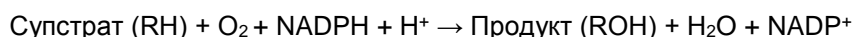
FMO се фамилија на микрозомални ензими кои ги дополнуваат CYP и тие обично вршат оксидација со нуклеофилен напад на хетероатомите како N, S и P (CYP супстратите обично се метаболизираат преку електрофилен напад на јаглеродните атоми). Сепак, и CYP и FMO имаат потреба од ист кофактор, NADPH и молекуларен кислород, иако механизмот на реакцијата е многу различен. FMO се ензимска суперфамилија која се состои од пет изоформи FMO1-FMO5. Амфетамин, бензидамин, хлорпромазин, клозапин, гванитидин, имипрамин, метамфетамин, оланзапин и тамоксифен, се примери за лекови кои содржат азот и кои се N-оксидаат преку FMO (и/или CYP во повеќето случаи). FMO исто така оксидира неколку ксенобиотици кои содржат сулфур (како што се тиоли, тиоетери, тиони и тиокарбамати). Во супстратите за FMO3 се вклучуваат и никотин и H<sub>2</sub>-антагонистот ранитидин (слика 4.9).



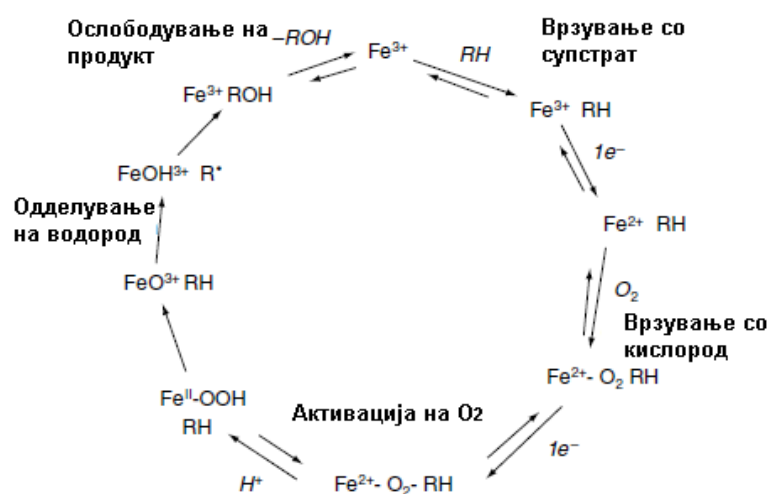
Слика 4.9. Примери за метаболизам со учество на FMO.

#### 4.3.5. Цитохром P450

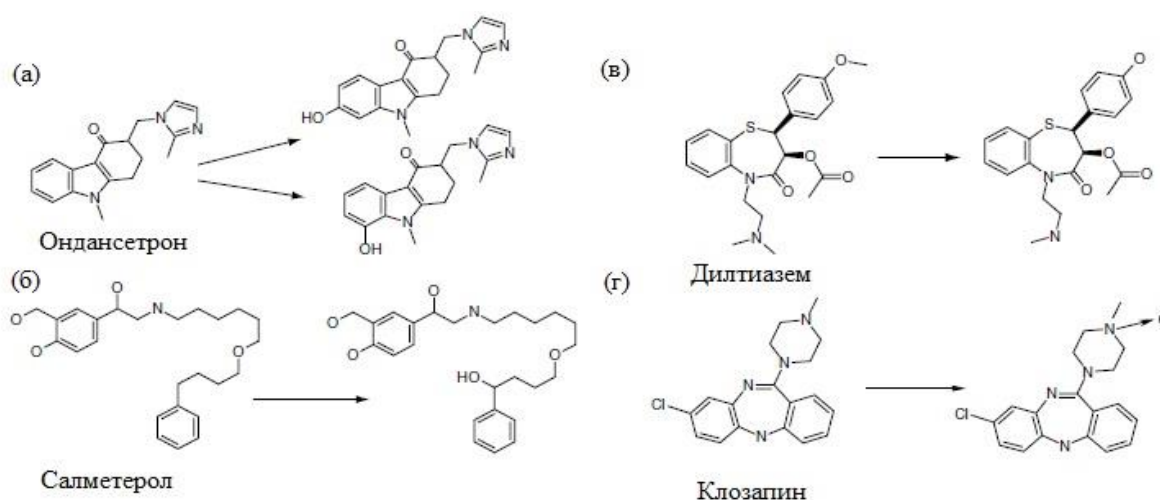
Цитохром P450 (CYP) е суперфамилија на ензими кои играат важна улога во метаболизмот на многу лекови и други ксенобиотици. Сите CYP ензими се протеини кои содржат хем. Железото од хемот во цитохром P450 е обично во фери (Fe<sup>3+</sup>) состојба. Од сите ксенобиотик-метаболизирачки ензими, CYP ензимскиот систем е на првото место во однос на каталитичката разновидност и директниот број ксенобиотици кои ги детоксицира или активира до реактивни интермедиери. Голем број канцерогени се метаболизираат исто преку CYP и најчесто овие метаболити се крајните канцерогени компоненти. Се проценува дека над 50% од најчесто препишуваните лекови се метаболизираат пред сè од CYP. Во прилог на нивната улога во метаболизмот на лековите, CYP имаат важни ендогени функции како синтеза и регулирање на стероидните хормони, жолчните киселини, липосолубилните витамини како витамин A и D, масните киселини и еикосаноидите како простагландини, тромбоксан, простаглицлин и леукотриени. Основната реакција катализирана преку CYP ензимите е монооксигенација при која еден атом на кислород се инкорпорира во супстратот, означен RH, а другиот се редуцира до вода со редуцирачки еквиваленти добиени од NADPH, како што следи:



Каталитичкиот циклус на цитохром P450 е прикажан на слика 4.10. Со овој механизам на дејство, CYP катализира неколку типови оксидациони реакции. Примери за дел од овие реакции се прикажани на слика 4.11. Со овој механизам, CYP се способни да извршуваат различни хидроксилации, деалкилации и хетероатомни оксидации.



Слика 4.10. Каталитички циклус на цитохром P450.



Слика 4.11. Примери за реакции катализирани од CYP: (а) ароматична хидроксилација; (б) алифатична хидроксилација; (в) N-,O-деалкилација; (г) N-оксидација.

За да се класифицира CYP суперфамилијата, развиена е системска номенклатура. Базирана е на аминокиселинската секвенца на секоја изоформа наместо на одредена реакција или супстрати на поединечните CYP претставници. Изоформите со повеќе од 40% хомологност на секвенцата се доделени на истата генска фамилија (на пр. CYP1, CYP2, CYP3, итн.). Изоформите од истата генска фамилија со повеќе од околу 60% хомологност се класифицираат и понатаму и припаѓаат на иста подфамилија (на пр. CYP2A, CYP2B, итн.). На секој член на подфамилијата потоа му се доделува број за означување на поединечната изоформа, на пример, CYP2A1, CYP2A2, итн.

Агенсите од животната средина како лекови, други ксенобиотици или определени болести, може да предизвикаат (вообичаено) минливо слабеење на CYP активноста, или преку превенција на генската експресија или со инхибиција на последователно експресираниите протеини. Инхибицијата на CYP активноста од страна на молекулите на лековите е област од интензивен интерес за научниците кои го проучуваат метаболизмот. Настанувањето на

несакани лек-лек интеракции и/или нарушување на ендогените биохемиски патишта како резултат на CYP инхибицијата може сериозно да ја компромитира или дури и да ја спречи клиничката одржливост на лекот-кандидат. Постојат неколку добро документирани примери за ова, вклучувајќи ја овде интеракцијата меѓу антихистамините (терфенадин) и антифунгалните лекови (кетоконазол), каде инхибицијата на CYP3A4-медирираниот метаболизам на терфенадин од страна на кетоконазолот резултира со срцева токсичност и во некои случаи, смрт кај пациенти кои ги земале двата лека истовремено.

Спротивно на ова, индуцирањето на CYP активност, исто така, може да доведе до варијабилност во диспозицијата на лековите. Присуството на повеќе копии на еден CYP ген може да доведе до повисоки конститутивни нивоа на активните ензими за разлика од лицата кои поседуваат само една копија од генот. Почесто, некои CYP изоформи може да бидат индуцирани од изложеност на различни ксенобиотици, како што се лекови, компоненти од храната или чад од цигари (табела 4.2).

**Табела 4.2.** Индуктори на човековите црnodробни CYP изоформи

CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2E1	CYP3A4
Мешунки	Рифампицин	Рифампицин	Етанол Изонијазид	Рифампицин
Зеленчук				Дексаметазон
$\beta$ -Нафтофлавон				Карбамазепин
Омепразол				Фенобарбитал
Чад од цигари				Фенитоин
3-метил-Холантрен				Тролеандомицин
				Троглитазон

## 5. ВТОРА ФАЗА ОД МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИ

### 5.1. Вовед

Иако оксидацијата од Фаза I се смета како најважниот ограничувачки процес за метаболитичката трансформација, постојат голем број фармацевтски агенси, кои пред сè, се метаболизираат од страна на ензимите од Фаза II, како на пример, НСАИЛ, трицикличните антидепресиви,  $\beta_2$ -агонистите и некои анти-ХИВ лекови. Постојат различни конјугациски ензимски системи од Фаза II кои ги напаѓаат функционалните групи (како што се -ОН, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH), кои се или природно присутни на целните молекули или генерирани од страна на оксидативниот метаболизам од Фаза I. Додека метаболитичките реакции од Фаза II обично генерираат хидрофилни метаболити кои лесно се излачуваат во урината или во жолчката, треба да се забележи дека ваквиот метаболизам, исто така, може да доведе и до формирање реактивни, потенцијално токсични метаболити кои можат да се врзат ковалентно со ткивните макромолекули. Истите ензими од Фаза II кои се вклучени во метаболизмот на ксенобиотиците често метаболизираат и голем број ендогени супстрати (како што се билирубин, стероиди и биогени амини). Табела 5.1 ги прикажува ензимите кои учествуваат во Фаза II. Реакциите од Фаза II обично резултираат со генерирање повеќе поларни, полесно екскретибилни соединенија кои се во голема мера ослободени од значајна фармаколошка или токсиколошка активност.

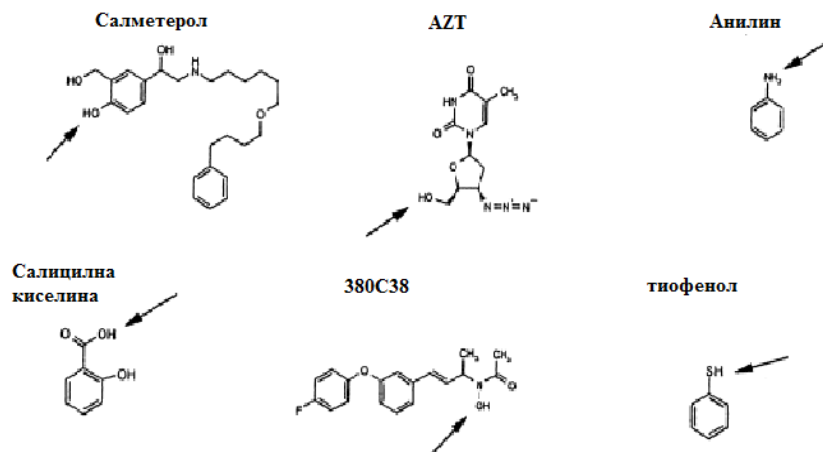
**Табела 5.1.** Ензими од Фаза II и нивни реакции со функционални групи

Ензим	Реакција	Функционална група
UDP-глукуронозилтрансфераза	Глукуронидација	-ОН, -COOH, -NH, -NOH, -NH <sub>2</sub> , -SH, N во прстен;
UDP-глюкозилтрансфераза	Глукозидација	-ОН, -COOH, -SH
Сулфотрансфераза	Сулфатирање	-ОН, -NH, -NOH, -NH <sub>2</sub>
Метилтрансфераза	Метилација	-ОН, -NH <sub>2</sub>
Ацетилтрансфераза	Ацетитирање	-ОН, -NH <sub>2</sub> , -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
Конјугација со аминокиселини	Конјугација	-COOH
Глутатион-S-трансфераза	Конјугација со глутатион	Епоксиди, органски халиди

## 5.2. Глукуронидација

Глукуронидацијата е главната патека на Фаза II од метаболизмот и вклучува трансфер на D-глукуронска киселина на акцепторниот супстрат. Ваквите конјугациони реакции се катализирани од страна на семејството на ензими наречени уридин дифосфат (UDP) - глукуронозилтрансферази или UGT. За глукуронидација задолжителен е косупстрат уридин-5'-дифосфо- $\alpha$ -D-глукуронска киселина (UDPGA) која се синтетизира од глюкоза-1-фосфат и уридин трифосфат (UTP) во двофазна реакција. Повеќето UGT се способни за глукуронидација на широк спектар на ксенобиотици, но покажуваат поголема специфичност за ендогени соединенија (на пример, естрогени, андрогени, билирубин), кои обично реагираат со само една специфична форма на UGT.

Некои примери за глукуронидација на ксенобиотици, се прикажани на слика 5.1.



Слика 5.1. Глукуронидација на некои ксенобиотици.

Голем број ензими од Фаза II постојат во повеќе форми што предизвикува клинички релевантни генетски полиморфизми. Овде се вклучува и UGT-глукуронозилтрансферазата. Генската UGT суперфамилија кај цицачите содржи четири фамилии, UGT1, UGT2, UGT3 и UGT8. UGT1A1, ензимот одговорен за конјугација на билирубин и одредени ксенобиотици, е предмет на интериндивидуални варијации. Со помош на DNA клонирање идентификувани се триесет и една алелни варијанти кои се вклучени во појавата на нарушувања на конјугацијата на билирубинот познати како Crigler-Najar и Gilberts синдроми.

Конјугираните метаболити произведени од конјугациони реакции на Фаза II не секогаш резултираат со намалување на активноста. Вакви ситуации во кои конјугати доведуваат до реактивни, потенцијално токсични метаболити се опишани особено за глукуронидите и сулфонатите.

Голем број соединенија кои содржат карбоксилни групи се подложни на конјугација катализирана од UGT, што доведува до формирање на ацилглукурониди. За голем број од овие ацилглукурониди е покажано дека ирверзибилно се врзуваат со протеините и предизвикуваат токсични ефекти. Голем број агенси (особено Рифампицин и антиепилептичните лекови) се познати како индуктори на UGT изоензимите како и на CYP изоензимите (особено CYP3A4). Оралните контрацептивни препарати се, исто така, познати индуктори на UGT изоензимите.

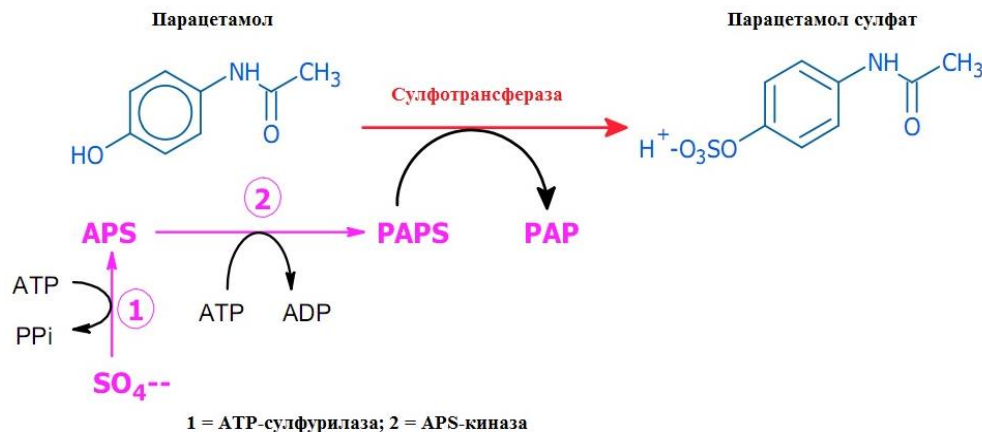
## 5.3. Сулфатирање

Конјугацијата со сулфонатна група ( $\text{SO}_3^-$ ) е една од главните патеки на Фаза II од метаболизмот на лекови и се врши од страна на семејство на ензими наречени сулфотрансферази (SULT). Процесот на сулфатирање генерално продуцира естри на сулфурната киселина, кои се многу добро растворливи во вода. Овие ензими играат фундаментална улога во метаболизмот и екскрецијата и на ендогените соединенија и на ксенобиотите. Исто така, определени соединенија (*проканцерогени*) со сулфатирање се конвертираат во силно реактивни интермедиери кои може да делуваат како хемиски канцерогени и мутагени преку ковалентно врзување со ДНК.

Сулфотрансферазите катализираат трансфер на наелектризирана сулфонатна група ( $\text{SO}_3^-$ ) од кофакторот PAPS. Во сите случаи, реакцијата на конјугација вклучува нуклеофилен



напад од кислородниот или азотниот атом врз електрофилниот сулфурен атом на PAPS, преку кинење на фосфосулфатната врска. PAPS е универзална сулфодонорна молекула неопходна за одвивање на сите реакции на сулфатирање и може да се синтетизира во сите ткива кај цицачите. Кофакторот PAPS се синтетизира од ATP и неоргански сулфат ( $\text{SO}_4^-$ ) во два чекори со последователно делување на два ензима, ATP-сулфурилаза и аденозин-5'-фосфосулфат киназа (APS-киназа). Пример на сулфатирање на ацетаминофен (парацетамол) е прикажан на слика 5.2.



Слика 5.2. Сулфатирање на парацетамол.

Кратенката SULT се користи за означување на сите цитозолни сулфотрансферазни ензими. Фамилијата на сулфотрансферазите (SULT1, SULT2 итн.) вклучува протеини со идентичност од 40 % или повеќе на аминокиселинската секвенца, додека подфамилиите имаат над 60 % идентичност меѓусебе. Фамилиите се означени со арапски броеви, подфамилиите со големи букви, и индивидуалната изоформа со друг арапски број, на пример, SULT1A1. Кај луѓето, се идентификувани 11 различни изоформи на SULT ензимите. Различните SULT изоформи кај човекот покажуваат различни уникатни супстратни специфичности. За семејството на SULT1 изоформите се смета дека се главните форми кои се вклучени во метаболизмот на лековите, меѓу кои SULT1A1 изоформата е најважна и покажува широка разновидност во однос на својот капацитет. Изоформите од семејството SULT1 се познати како фенолни SULT, бидејќи се карактеризираат со способноста да катализираат сулфатирање на фенолни молекули како што се ацетаминофен, миноксидил или 17 $\alpha$ -етинил естрадиол. Конјугацијата на лековите и други ксенобиотици се смета првенствено како чекор на детоксикација, но често може да води и кон производство на хемиски реактивни метаболити, каде сулфонатот повлекува електрон и може да дојде до хетеролитичко расцепување, што доведува до формирање електрофилен катјон.

Може да се направи генетска поврзаност со асоцирањето на познатите човекови SULT полиморфизми со појавата на рак за кои се смета дека потекнуваат од извори (хемикалии) од животната средина. Меѓу добропроучените е генетскиот полиморфизам на најзастапената изоформа кај возрасен човек во хепарот т.е. за SULT1A1 каде е честа појавата на единичен нуклеотиден полиморфизам што резултира со варијации во активноста и стабилноста на ензимот. Оваа мутација е присутна кај околу 25-36 % од припадниците на белата раса. Неколку научни студии демонстрираат дека SULT1A1 полиморфизмот може да има улога во развојот на различни видови рак како рак на бел дроб, уротелијален карцином и менингијални мозочни тумори. При изложување на определени лекови (како што се мефенамична киселина, салицилна киселина, кломифен, даназол) може да се случи инхибиција на SULT ензимите. Ваква инхибиција може да настане и под дејство на хемикалии од околината (хидроксилирани полихлорирани бифенили (PCB), хидроксилирани полициклични ароматични јаглеводороди (PAH), пентахлорофенол) или супстанции кои се внесуваат со исхраната (катехини, фитоестрогени и флавоноиди). Несакани ефекти врз здравјето на луѓето можат да бидат токму последица од инхибицијата на SULT-ензимите. На пример, во ваков случај може да настане прекин на лачењето на тироидните хормони, како што се случува при изложување на организмот на хидроксилирани PCB.



## 5.4. Метилација

Метилацијата е мала патека на метаболизмот на ксенобиотици иако таа е суштински чекор во метаболизмот на некои ендогени соединенија, како што се катехолите, катехоламините, хистамин и N-ацетилсеротонин. Метилацијата се разликува од другите реакции во Фаза II бидејќи обично со извесни исклучоци (никотин), резултира во намалување на растворливоста на ксенобиотиците во вода.

Кофактор за метилација е S-аденозилметионин (SAM). Метил-групата врзана за сулфурниот јон во SAM се префрла на акцепторниот супстрат со нуклеофилен напад од електрон-богатите хетероатоми (O, N или S). Постојат повеќе типови метилтрансферази (MT). Кај луѓето се експресираат три вида N-метилтрансфераза, една катехол O-метилтрансфераза (COMT), една фенол O-метилтрансфераза (POMT), една тиопурин S-метилтрансфераза (TPMT) и тиол метилтрансфераза (TMT).

Метилацијата на феноли и катехоли е катализирана од два различни ензими познати како фенол O-метилтрансфераза (POMT) и катехол O-метилтрансфераза (COMT). Супстрати за COMT се невротрансмитерите како адреналин, норадреналин и допамин и катехолните лекови како L-допа и Изопреналин. Познати се и неколку COMT инхибитори. COMT инхибитори, исто така, се пронајдени и во зелениот чај (на пример, флавоноидот кверцетин). COMT инхибиторите како што се ентакапон и толкапон, ја заштитуваат L-DOPA од дејството на COMT и со тоа го пролонгираат ефектот на ова соединение. Затоа овие инхибитори се користат како придружни лекови при терапијата со L-DOPA.

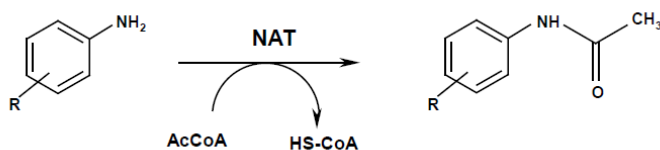
Опишани се три N-метилтрансферази кај луѓето, вклучувајќи фенилетаноламин N-метилтрансфераза (PNMT) што ја катализира N-метилацијата на невротрансмитерот норепинефрин во епинефрин, потоа хистамин N-метилтрансфераза (HNMT) што специфично го метилира имидазолниот прстен на хистамин и сродните соединенија и никотинамид N-метилтрансфераза (NNMT) којашто ги метилира соединенијата што содржат пиридински прстен (како што е никотинамид) или, пак, индолен прстен (како што се триптофан и серотонин).

Кај луѓето, S-метилацијата е важна патека во биотрансформацијата на ксенобиотици кои содржат сулфхидрилни компоненти (вклучувајќи ги антихипертензивниот лек каптоприл, антиревматоидниот агенс d-пенициламин, антинеопластичните и имуносупресивните лекови 6-меркаптопурин, 6-тиогванин и азатиоприн, метаболитите на лекот за одвикнување од алкохол дисулфирам и деацетилираниот метаболит на диуретикот спиронолактон) и се катализира од два ензима, тиопурин метилтрансфераза (TPMT) и тиол метилтрансфераза (TMT). TPMT е цитоплазматичен ензим со афинитет првенствено за ароматични хетероциклични соединенија како 6-меркаптопурин и азатиоприн. TMT е микрозомален ензим со афинитет за алифатични сулфхидрилни соединенија (како што е каптоприл). Кај пациенти канцер-болни со генетски детерминирана ниска или интермедиерна TPMT активност постои висок ризик од несакани ефекти и токсичност кога се третираат со стандардни дози на тиопурини, додека кај пациенти со висока TPMT активност постои низок ризик од токсичност, но, пак, со стандардната доза не може да се постигне оптималната концентрација на лекот во крвта со што постои ризик од релапс на болеста.

## 5.5. Ацетитирање

Ацетитирањето е главниот пат на метаболизирање за ксенобиотиците кои содржат ароматичен амин (R-NH<sub>2</sub>) или хидразинска група (R-NH-NH<sub>2</sub>), при што тие се конвертираат во ароматични амиди (R-NH-COCH<sub>3</sub>) и хидразици (R-NH-NH-COCH<sub>3</sub>), соодветно. N-ацетитирањето на ксенобиотиците се катализира од страна на цитоплазматичните ензими N-ацетилтрансферази (NAT) и бара присуство на кофактор ацетил-коензим A (ацетил-CoA)

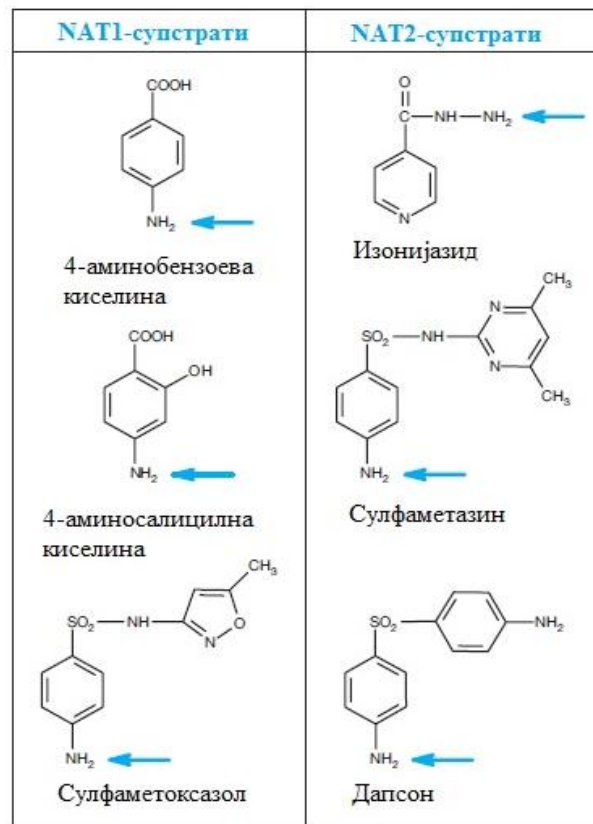
Пример за N-ацетитирање на ксенобиотици катализирано од страна на NAT ензимите е прикажан на слика 5.3.



Слика 5.3. Ацетитирање на ариламины од страна на NAT.

Meѓy сите човекови лек-метаболизирачки ензими NAT покажуваат највисок степен на полиморфизам. Карактеризацијата на фенотипот ацетилатори кај луѓето е една од првите наследни особини што се идентификувани. Постојат два функционални NAT гена кај луѓето, NAT1 и NAT2, лоцирани на краткото рамо на хромозом 8. Секвенцата на овие два гена покажува 85 % хомологност и тие кодираат два ензима со различна супстратна специфичност. Карактеризирани се околу 25 алелни варијанти на NAT1 и NAT2, и кај лицата кај кои ацетирањето на лекови е компромитирано, потребни се хомозиготни генотипови за најмалку две варијантни алели за да пациентот биде предиспониран кон забавен метаболизам на лекови. Полиморфизмот во NAT2 генот и неговата поврзаност со бавното ацетирање на изонијазид е еден од првите целосно карактеризирани генотипови за кои е покажано дека влијаат на метаболизмот на лекови. Иако се идентификувани мутации и во NAT1 генот скоро во еднаков број како во генот NAT2, фреквенцијата на „бавните“ ацетилатори се припишува главно на полиморфизам во генот NAT2.

Структурите на специфични супстрати-лекови кои се предмет на ацетирање се прикажани на слика 5.4.

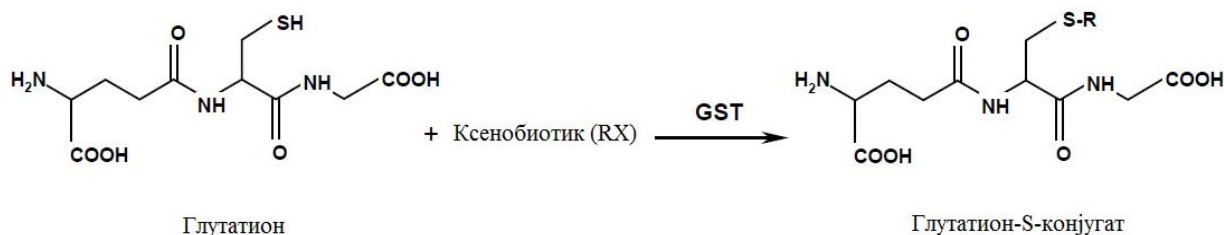


Слика 5.4. Примери за супстрати за N-ацетилтрансферазите кај човекот.

## 5.6. Конјугација со глутатион

Глутатион S-трансферазите (GST) се едни од главните детоксификациски ензими од Фаза II вклучени во метаболизмот на ксенобиотиците, а имаат и важна улога во заштита на клетката од оксидативниот стрес. Главната ендогена функција на GST е токму одбрана од реактивните и токсични електрофили како ROS (супероксиден радикал и водороден пероксид) кои настануваат при физиолошките метаболички процеси (многу од овие ROS се формираат при оксидативните реакции катализирани од CYP и други оксидази). GST како дел од одбранбениот механизам против реактивните кислородни радикали го редуцираат формирањето на хидропероксиди на масни киселини, фосфолипиди, холестерол и редокс циклусот на некои соединенија кои содржат хинон. Косупстрат во реакциите катализирани од GST е глутатионот. Глутатионот е трипептид составен од глицин, цистеин и  $\gamma$ -глутаминска киселина. Глутатионот постои во клетките во оксидирана (GSSG) или редуцирана форма

(GSH), и односот на GSH:GSSG е од клучно значење за одржувањето на клеточната средина во редуцирана состојба. При формирањето конјугати со глутатион, реакцијата генерира тиеетерна врска меѓу лекот или ксенобиотикот со цистеинскиот остаток на трипептидот (слика 5.5).



**Слика 5.5.** Конјугација на глутатион со електрофилен јаглероден атом.

Супстратите за GST имаат три заеднички карактеристики, тие се хидрофобни, содржат електрофилен атом и реагираат хемиски со глутатионот до даден степен. Супстратите за GST може да се класифицираат во две групи, оние кои се доволно електрофилни за директна конјугација и оние кои се подложни на биотрансформација до електрофилен метаболит пред конјугацијата. Глутатионските конјугати може да се екскретираат непроменети во жолчката или може да се трансформираат да меркаптурни киселини во бубрезите и да се излучуваат во урината. Познати се голем број инхибитори на GST, како на пример, синтетски и природни феноли, хинони или деривати на витамин C, потоа допамин,  $\alpha$ -метилдопа и др.

Експериментално во човечки клеточни култури е покажано индукторното дејство на екстракт од *Ginkgo biloba*, а дополнително се откриени и други видови храна со индукторно дејство како зелјестиот зеленчук (брокула, зелка, карфиол) и сокот од грејпфрут.

## 6. ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОЦИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗАМ НА ЛЕКОВИ

### 6.1. Вовед

Квантитативното определување на лекот и неговите метаболити во биолошките матрици (биоанализа) вклучува голем број чекори од собирање на примерокот до издавање на финалниот извештај со резултатите. Помеѓу нив има редица чекори кои обично вклучуваат складирање на примерокот, подготовка на примерокот за анализа, сепарација, идентификација и квантификација на аналитите. Подготовката на примерокот пред хроматографската сепарација има три главни цели: растворување на аналитот во соодветен растворувач, отстранување на што е можно повеќе интерферирачки компоненти и прекоцентрација на аналитот. Рутински се користат голем број техники како што се протеинска преципитација, течно-течна екстракција (ТТЕ) и екстракција од цврста фаза (Solid Phase Extraction, SPE).

### 6.2. Техники за подготовка на примероци

#### 6.2.1. Протеинска преципитација

За протеинската преципитација (отстранување на протеините со денатурација и нивна преципитација) се користат киселини или органски растворувачи кои се мешаат со вода. Киселините, како што се трихлороцетна киселина и перхлорна киселина, се многу ефикасни за преципитирање на протеините. Протеините, кои се во катјонска форма при ниска рН вредност, формираат нерастворливи соли со киселините. 5-20 % раствор на овие киселини генерално е доволен и најдобрите резултати може да се постигнат со користење реагенси кои се изладени на ниска температура. Органските растворувачи, како метанол, ацетонитрил, ацетон и етанол, иако имаат релативно ниска ефикасност во отстранувањето на плазмените протеини, широко се користат во биоанализата поради нивната компатибилност со мобилните фази кај течната хроматографија под висок притисок (HPLC). Овие органски растворувачи кои ја намалуваат растворливоста на протеините и ги таложат од нивните растворувачи имаат ефикасност која е обратнопропорционална со нивната поларност.

### 6.2.2. Течно-течна екстракција

Течно-течната екстракција (ТТЕ) е директна екстракција од биолошкиот материјал со растворувач кој не се меша со вода. Анализот се изолира со распределба меѓу органската и водената фаза. Односот на дистрибуцијата е под влијание на голем број фактори: избор на растворувачот за извлекување, pH на водената фаза и соодносот на волумените на органската и водената фаза. Анализот привилегирано се дистрибуира во органската фаза при избраните услови. Иако голем број фактори влијаат врз изборот на растворувач, најважниот фактор е релативната липофилност или хидрофобноста на анализот. Анализот мора да биде растворлив во избраниот растворувач. Растворувачот треба, исто така, да има ниска точка на вриење за да се олесни отстранувањето на крајот на екстракцијата и ниска вискозност за да се олесни мешањето со матрицата на примерокот. Општо земено, селективноста се подобрува со изборот на најмалку поларниот растворувач во кој анализот е растворлив.

Процесот на екстракција може да се контролира со варијации на pH вредноста или јонизациската состојба (јонизираниите соединенија помалку ефикасно се распределуваат во органската фаза). Промената на pH вредноста ја оневозможува реверзноста на процесот, а наелектризираниот анализ повторно се реекстрахира во водената фаза за понатамошно прочистување. Употребата на контролирано pH овозможува фракционирање на примерокот во вид на кисела, неутрална или базична компонента. Потребна е голема површина на растворот за да се обезбеди брзо постигнување на рамнотежа. Ова се постигнува со темелно мешање на растворот со користење механички мешалки, рачно мешање или пак вортекс мешалки.

Постојат неколку недостатоци на ТТЕ меѓу кои фактот дека техниката не е применлива за сите соединенија. Високо поларните молекули може да бидат многу тешки за работа, иако употребата на јон-селективни реагенси може да ја прошират употребата на ТТЕ и на молекулите од овој тип. Друг голем проблем е формирањето на емулзии. Може да биде тешко тие да се разбијат дури и со користење центрифугирање или сонификација (со ултразвучна бања) и може да се предизвика губење на анализот од оклузијата во рамките на емулзијата. Користењето на помалку ригорозно мешање или поголеми количини на растворувачот за екстракција може да помогне да се намали проблемот со формирањето на емулзиите.

За да се надминат многу од ограничувањата на ТТЕ може да се користат колони за еднократна употреба кои содржат дијатомејска земја како адсорбент. Разредениот примерок се истура врз колоната и се одржува во вид на многу тенок филм. Потоа растворувачот за екстракција се пропушта низ колоната. Големата површина на примерокот овозможува многу ефикасна екстракција.

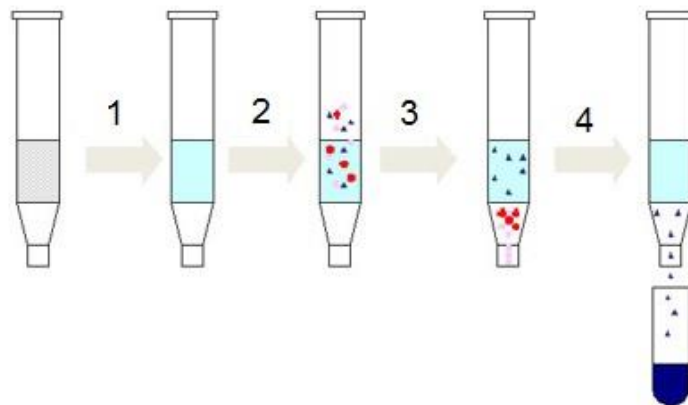
### 6.2.3. Екстракција од цврста фаза

Главните механизми на сепарација и изолација кои се користат во екстракцијата од цврста фаза (SPE), обратно-фазна, нормално фазна и со јонска размена, се исти како и оние што се користат во HPLC. Иако механизмите на одвојување за двете техники се исти, динамиката на секоја техника е многу различна. Кај HPLC соединенијата се сепарираат во систем на мобилна фаза кој постојано тече, додека SPE е серија на дискретни чекори. Во SPE анализот се задржува на цврстата фаза додека примерокот поминува преку неа, што е проследено со елуција на анализот со соодветен растворувач. SPE може да се смета како едноставен тип на хроматографија.

Типичниот SPE сорбент се состои од силика честички (40-60  $\mu\text{m}$ ) кои се врзани на јаглеводороден носач (цврста фаза). Ова поврзување се постигнува со реакција на хлоросилан со хидроксилната група на силика гелот до формирање на силициум-кислород-силициум врски. Првично монофункционално врзаната фаза била најпопуларниот реверзнофазен сорбент со 4, 8 или 18 јаглеродни атоми во прилог (C4, C8 и C18). Потоа биле развиени и други реверзнофазни сорбенти како што се C2, циклохексил и фенил. Генерално се користи три-јаглероден синџир за да се поврзат двете циклохексилни и фенилни групи. Нормалнофазните и јонскоразменувачките сорбенти, исто така, имаат три-јаглеродно поврзување. Степенот на јаглеродната содржина варира од 5 до 19 % од вкупната тежина во зависност од должината на јаглеводородниот синџир. Колку е поголема јаглеродната содржина поголем е и капацитетот, па затоа C18 сорбентите имаат најголем капацитет изразен во милиграми на анализ адсорбиран по грам на сорбент. Капацитетот на сорбентот исто така е зависен и од големината

на порите на силиката. Големината на порите влијае и на густината на алкил-врзаната фаза и миграцијата на анализите во и надвор од порите. Важна карактеристика на сорбентот е бројот на неизреагирани или слободни силанолни групи. Овие силанолни групи се способни за формирање водородни врски или слаба катјонска размена со која било компонента врзана за фазата на сорбентот, особено во случајот на слабо базичните соединенија. Овие секундарни интеракции треба да бидат внимателно разгледувани за време на развојот на метод бидејќи во развојот на хроматографските стационарни фази самите производители се обидуваат да го минимизираат ефектот на овие силанолни групи. Употребата на трифункционални деривати, трихлороалкилсилани, дава не само поголема стабилност при кисели услови, бидејќи јаглеводородниот синџир е прикачен на повеќе места, но и се намалува бројот на слободни силанолни групи. Бројот на слободните силанолни групи генерално понатаму се намалува со крајно врзување каде што дериватизируваниот силика гел реагира со триметилхлоросилан реагенс.

За успехот на SPE како техника за подготовка на примероци значително придонела употребата на шприцевите со буренце (кертриџ) кои може да се менуваат. Шприцевите се достапни од 1-25 mL. Шприцот е типично полипропиленски со Луер-тип монтирање на врвот. Сорбентниот материјал е спакуван во буренцето помеѓу две 20-милиметарски полипропиленски мрежи. Се користи вакуум систем за движење на примерокот и елуирање на растворувачите преку буренцето на шприцот под негативен притисок со примена на вакуум. SPE типично се изведува во четири чекори: подготовка, полнење, миеење и елуирање (слика 6.1). Цврсто-фазниот сорбент се подготвува со пропуштањето на растворувачот, обично метанол, преку сорбентот за да го намокри материјалот за полнење и да се растворат функционалните групи на сорбентот. Потоа сорбентот се урамнотежува со вода или со воден пуфер. Мора да се внимава да се спречи исушување на цврстата фаза пред да биде аплициран примерокот, бидејќи инаку може да се добијат променливи резултати. Примероците се разредуваат во однос 1:1 со вода пред аплицирањето со цел намалување на вискозитетот и да се спречи блокирање на цврстиот сорбент. Се користи миеење со вода и/или органски растворувачи за отстранување на контаминентите.



Слика 6.1. Принцип на SPE: 1 – подготовка; 2 – полнење; 3 – миеење; 4 – елуирање.

### 6.3. Инструментација

Голем дел од подготовката на примероците во биоаналитичките лаборатории сè уште се врши рачно. Навистина, автоматизација на подготовка на примероци во биоаналитичките лаборатории напредува со многу побавно темпо отколку во другите области на фармацевтската индустрија. Постои двоумење дали треба да се автоматизира биоаналитичката подготовка на примероците што е сосема разбирливо. Разновидноста на техники за подготовка на примероците и уникатноста на секоја една методологија за анализа го прават процесот за спроведување на потребната функционалност и флексибилност во автоматизација на системот премногу тежок и скап. Широкиот спектар на потрошен материјал

за екстракција (на пример епрувети, ампули, филтери, итн.) што се користат за подготовка на примероците значи дека автоматизацијата на системот, често е ограничена само на одредени производи за подготовка на примероците од определени производители. Повеќето биоаналитички методи се користат само за ограничено време и не е извесно дали нивната примена ќе продолжи и понатаму во зависност од потребите. Затоа и не се посветуваат значителни ресурси за автоматизација на сите методи кои се користат при анализите.

Сепак, најновите достигнувања и во лабораториската опрема за автоматизација и во производите за подготовка на примероци се практични и ја олеснуваат постапката на изведување на соодветните аналитички постапки. Воспоставувањето на LC-MS-MS системите, со нивната комбинација на висока чувствителност, висока специфичност и потенцијал за обработка на голем број примероци, како техника од избор во биоанализата во голема мера го забрзуваат развојот на автоматската подготовката на примероците. Постоечкиот тренд за паралелно процесирање на примероци во микротитарски плочи со 96-места ја прават процедурата за автоматска подготовката на примерокот побрза, поефективна и поефтина. Инструментите кои во моментот се на располагање може да се групираат според нивниот степен на автоматизација. Претставнички категории се:

1. Апликационо-специфични работни станици или модули за SPE
2. Инструменти за On-line подготовка на примерок
3. Роботски работни станици
4. Целосно автоматизирани роботски системи.

Оваа класификација не е апсолутна, бидејќи разновидноста на овие системи навистина се развива во континуитет. Некои системи можат да се преклопуваат во две или повеќе од категориите. Во On-line инструментите спаѓаат автосемплерите со техники за подготовка, додавање течност, способности за трансфер, префрлување на вентили и други on-line техники за директно вбригување на примерокот во инструментот за анализа.

## **7. СПЕЦИФИЧНИ БИОАНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИТЕ И МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ: ИМУНОЛОШКИ ТЕСТОВИ**

### **7.1. Вовед**

Во овој дел е прикажан генералниот концепт на имунолошките тестови како биоаналитичка алатка и се опишува современата примена на техниката во рамките на фармацевтската индустрија.

Различни видови имунолошки постапки се опишуваат во контекст на барањата за развој и оптимизација на имунолошки метод. Овде се вклучува генерирањето на поликлонални и моноклонални реагенс-антитела и изборот на нивното соодветно обележување. Откако методот е развиен од суштинско значење е тој да биде валидиран во однос на точност, прецизност, чувствителност, специфичност, линеарност и стабилност на анализот кој треба да се определува.

Иако овие тестови сè уште се користат за биоанализа на мали молекули на лекови секаде каде што е соодветно, тековна важна апликација за имунотестовите е во определувањето и на биомаркерите (конкретен пример е определувањето на COX-2 селективноста во примероци крв).

Другата важна тековна апликација на имунотестовите во биоанализата е во определувањето на биолошките лекови (биофармацевтици). Важните прашања кои се однесуваат на употребата на имунотестовите во оваа област се опишани заедно со вистински примери на примена на техниката за поддршка на биофармацевтскиот производ.

## **7.2. Улога на имунолошките методи во откривањето и развојот на лекови**

Во рамките на фармацевтската индустрија, имунотестовите традиционално се користат за анализа на мали и големи молекули на лекови во биолошки течности за да се поддржат предклиничките и клиничките програми за развој на лекови. Во 1980-тите радиоимуно тестовите - РИА (Radioimmunoassay - RIA) биле најважните тестови кои се користеле, но тие во голема мера во текот на 1990-тите го отстапуваат своето место на техниките со спектрофотометриска детекција, како што се ензимски поврзаниот имуносорбентен метод (ELISA) или флуоресцентните имунометоди (TRFIA). До 1990-тите години, течната хроматографија под висок притисок (HPLC) била главната алтернативна техника за биоанализата на лекови, но честопати таа не би можела да одговори на чувствителноста што ја бараат имунотестовите. Затоа, изборот на техниката се прави од случај до случај врз основа на зависноста од структурата на испитуваниот лек, достапноста на соодветна експертиза и ресурси и, секако, посакуваните граници на квантификација.

Постојат многу примери на успешни програми во развојот на лекови каде имунотестовите се користат како алатка од избор при нивната анализа, како што е случајот на ранитидин (Zantac), ацикловир (Zovirax и Valtrex) и ламотригин (Lamictal). Предностите на имунотестовите како биоаналитичка техника ја вклучува способноста да се постигне многу чувствителна анализа со многу мал волумен на примерокот. Освен тоа, генерално нема потреба од претходна подготовка на примерокот или чекор на екстракција пред анализата и примероците може да се анализираат директно во соодветната матрица. Штом ќе се постават и ќе се етаблираат, имунометодите лесно може да се автоматизираат и се високоефикасни методи кои не бараат скапа инструментација. Сепак, постојат и недостатоци на имунометодите, особено перцепцијата дека имунотестовите за лекови се суштински неспецифични, особено во однос на метаболитите. Ова не е сосема точно, бидејќи специфичноста е зависна од соодветниот развој на аналитичкиот метод, особено во однос на генерацијата на антисеруми. Уште еден голем недостаток е релативно долгото време за развој на анализата, што е обично неколку месеци, без гаранција за успех.

Имуноотестовите имаат важна улога во студиите за откривање, развој и анализа на лекови, при што некои од причините за ова се дадени подолу.

Прво, константниот напредок на комерцијалната имунодијагностичка индустрија несомнено влијае врз употребата на имунометодите во развојот на нови лекови и анализата на метаболизмот на истите. Овој напредок вклучува истовремено определување на поврзани аналити во мултианалитни имунотестови, развој на ултрачувствителни имунотестови (на пример, имуно-PCR) и постојано зголемување на бројот на достапните комерцијални тестови и антисеруми за нови биомаркери. Определувањето на биомаркерите во развојот на лекови станува сè поважно и бидејќи многу од овие маркери се макромолекули, какви што се протеините, имунотестовите се обично техника од избор.

Второ, имунотестовите имаат важна улога за зголемувањето на бројот на откритијата и програмите за развој на биолошките лекови, на пример, терапевтските моноклонални антители и вакцините каде што често се и единствената соодветна аналитичка техника.

Конечно, развојот и примената на имунотестовите сè уште може да биде корисно и за некои лекови составени од мали молекули, како што е анализата на веќе етаблирани лекови, главно во подоцнежните фази на клиничкиот развој. Оваа стратешка употреба на имунотестовите може да помогне на LC-MS-MS инструментацијата или може да обезбеди соодветна алтернатива за веќе употребуваните методи. Релативно долгиот развоен период на имунотестовите може да се надмине со едноставен начин на оценување на специфичноста на имунометодите со вкрстено користење на други веќе достапни и валидирани методи.

## **7.3. Принципи на имунолошките тестови**

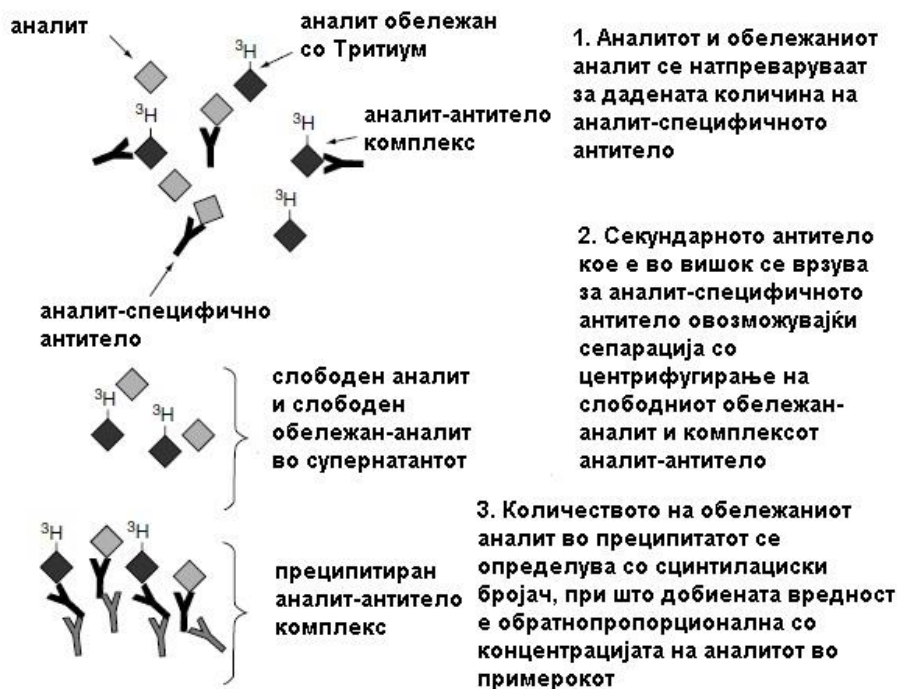
Имуноотестовите се аналитичка алатка, која се потпира врз способноста на генерирање одговор како резултат на антители-антиген интеракција. Антиген е молекула која може да биде врзана со специфично антители и е способна, директно или индиректно, да предизвика имун одговор кога се инјектира во жив домаќин. Дел од овој имунолошки одговор е резултат на производството на високоафинитетни антители кои се врзуваат на конкретниот антиген. Во



природата овој процес е дизајниран да помогне во отстранувањето на туѓите молекули од домаќинот, но овие специфични и високоафинитетни антиген-антитело интеракции може да бидат користени и за квантифицирање на молекулите со помош на имунотестови. Уште од откривањето на имунометодите пред повеќе од 40 години, оваа технологија е многу широко експлоатирана за биоанализа и на мали и на големи органски молекули.

Во принцип имунотестовите спаѓаат во две големи категории, конкурентни и неконкурентни. Кај конкурентните тестови, анализот (антиген) во примерокот се натпреварува со обележан анализ со константна концентрација за определено количество антитела. Зголемените количини анализ во примерокот ќе резултираат со помала концентрација на обележани антигени врзани со антителата. Пред определувањето на обележаната фракција врзана за антителата, сепарацијата на антиген-антитело комплексите и слободниот обележан-антиген се постигнува со еден од бројните методи, вклучувајќи употреба и на секундарно антитело кое се врзува за примарното антитело. Во РИА тестовите обележувањето на анализот се прави со радиоактивни изотопи (обично  $^3\text{H}$  или  $^{125}\text{I}$ ) коишто може да бидат детектирани во антитело-врзаната фракција со сцинтилациски или гама-бројач (слика 7.1).

Алтернативно, како обележувач може да се користи ензим-конјугат, каде што соодветен ензим (како алкална фосфатаза) ковалентно се врзува со анализот при што си ја задржува својата каталитичка активност (т.н. ензимски имунометод, Enzyme Immunoassay - EIA). Количеството на ензимот во врзаната фракција (со користење систем за сепарација кој ја задржува врзаната фракција во супернатантот) се утврдува со додавање супстрат при реакција со кој резултат е формирањето на обоен продукт. Интензитетот на бојата се определува спектрофотометриски.



**Слика 7.1.** РИА метод со примена на секундарно антитело за овозможување сепарација на врзаната и слободната фракција.

Неконкурентните имунотестови, всушност, вклучуваат врзување/фаќање на сите анализи во примерокот од вишокот антитела. Врзувачките антитела вообичаено се имобилизирани на цврста фаза како што е полистирен, или обложена површина на микротитарска плоча како што е случајот со најпопуларниот имунотест кој во моментов се користи, ELISA. По миењето на цврстата фаза, се додава секундарно антитело, кое исто така е специфично за анализот но се врзува на друго место (епитоп) и е конјугирано со ензим. Секундарното антитело се врзува за веќе врзаниот анализ формирајќи „сендвич“. Понатаму, миењето за да се отстрани неповрзаното секундарно антитело и додавањето на ензимскиот



супстрат резултира со развојот на обоен комплекс, чијшто интензитет на бојата е директно пропорционален со концентрацијата на анализот во примерокот (слика 7.2). Бидејќи овој „сендвич“ метод е зависен од анализот кој треба да е доволно голема молекула за да се приспособи кон двете различни молекули на антителата обично се применува само за анализа на макромолекули.



Слика 7.2. Некомпетитивен ELISA метод.

#### 7.4. Развој на метод

Првото што треба да се има предвид при развојот на методот и оптимизацијата е намената и примената на анализата бидејќи таа ќе влијае врз развојните цели, како што се точноста, прецизноста и чувствителноста.

Имунотестовите, во споредба со другите бианалитички техники, бараат релативно долго време за развој на анализата. Чекор којшто одзема повеќе време е генерирањето на реагенс антителата, било да се тие моноклонални или поликлонални, кој може да потрае подолго време без гаранција дека ќе се добие соодветно реагенс-антитело. Најчесто постојат комерцијално достапни имунолошки реагенс-китови и/или реагенс-антитела кои можат да се користат директно, или да се адаптираат за употреба во анализата на биомаркерите. Овие реагенс-китови и реагенс-антитела затоа штедат многу време и напор и се користат секаде каде е можно и се преферираат пред оние изработени во самата лабораторија *ex tempore*.

#### 7.5. Продукција на реагенс-антитела

Антисерумот е клучниот реагенс во кој билој имунолошки тест бидејќи е одговорен за селективност, чувствителност, прецизност и точност на методот. Макромолекулите, како што се високомолекуларните туѓи протеини и полипептиди, се природно имуногени, додека хаптените со ниска молекулска маса (< 2000 Da) имаат потреба од поврзување со протеини за да станат имуногени.

Потребно е да се направи избор во врска со производство на моноклонални или поликлонални антисеруми. Како правило, моноклоналните антитела се најпогодни за големи молекули при употреба на „сендвич“ анализите (едно моноклонално антитело да се врзе со молекулата од интерес и второто против различен непреклопувачки епитоп), а поликлоналните

за мали молекули. За конкурентните имунотестови како што е РИА, поликлоналните антители најчесто се преферираат поради нивниот генерално поголем афинитет. За производство на моноклонални антители стандардниот метод вклучува серија на имунизација на глувци со антиген во текот на неколку недели за да се подобри активирањето и пролиферацијата на зрелите В-клетки за производство на антиген-специфични антители локализирани во рамките на капсулата на слезенката. Неколку глувци обично се вакцинираат, а серумот периодично се тестира за да се утврди антиген-специфичниот титар на антителата. Кога ќе се постигне соодветен титар, клетките на слезината се отстрануваат и се фузираат со бесмртни хибридомни или миеломни клетки кои се култивираат во микротитарски плочи. Еднаш кога бараните антитело-секретирачки бунарчиња ќе се идентификуваат, клетките се размножуваат и може да се издвојат антителата.

Поликлоналните антители може да се генерираат во голем број различни животински видови, но едни од најчесто користените се зајаци и овци. Генерирањето поликлонални антисеруми бара помалку труд од генерирањето моноклонални антители. На кратко, животните се имунизираат со имуноген во соодветен адјувант (супстанца кој го подобрува имуниот одговор при инјектирањето) и потоа по извесно време дозата се зголемува неколку пати во текот на неколку месеци. Серумот се собира (жнее) кога ќе се постигне соодветен титар на антителата. Реагенс-антителата, исто така, може да се произведуваат и со користење молекуларно биолошки техники без употреба на животни, но во моментот тие не се користат во фармацевтската индустрија.

## 7.6. Селектирање и обележување

Обележувањето на реактантите е еден од критичните фактори на имунолошките тестови и може да биде релативно интензивно напорно и технички тешко да се направи кај новите тестови. Поради овие причини главно се користат комерцијално готови извори за обележување и само ако тие не се достапни тогаш се развиваат обележувачи во лабораторијата. Се користат поголем број различни обележувачи во имунолошките тестови, но постојат главно четири вида обележување најчесто користени во фармацевтската индустрија:

- Обележување со радиоактивни изотопи
- Ензимско обележување
- Флуоресцентно обележување
- Хемилуминесцентно обележување.

Изборот на обележувањето е зависно од барањата на анализата (на пример, висока чувствителност), расположивоста (на пример, комерцијален извор), детекција на способноста, прописите и ограничувањата за радиоактивноста и искуството на аналитичарот.

### 7.6.1. Обележување со радиоактивни изотопи

Обележувањето со радиоактивни изотопи било користено во првите имунотестови и покрај сегашниот пад на нивната употреба сè уште има многу анализи кои се прават со помош на радиоактивни обележувачи како можност за следење. Можно е да се направи радиоактивно обележување на антигенот како што се прави во традиционалните RIA тестови или антителата како што се користи во имунорадиометричките тестови (IRMA).

Постојат неколку радиоизотопи кои би можеле теоретски да се користат, но во практика најчесто се користат само  $^{125}\text{I}$  и во помала мера и тритиум ( $^3\text{H}$ ). Вториот, сепак, наоѓа голема примена во фармацевтската индустрија за лековите со мала молекулска маса каде барањата за биоаналитичката чувствителност често се релативно скромни ( $> 1 \text{ ng/mL}$ ).

Сите молекули од интерес содржат атоми на водород, а тоа обично дава можност да се синтетизира верзија на молекулата во која еден или повеќе од овие атоми се заменуваат со тритиум за да се создаде можност за следење. Меѓутоа, едно главно ограничување е подготовката на обележувањето кое бара учество на специјалист од областа.

За разлика од тритиум-обележувачите, далеку е полесно да се подготват јод-обележувачи. Огромното мнозинство на комерцијални RIA или IRMA тестови користат  $^{125}\text{I}$  како изотоп за обележување, бидејќи генерално само таквото радиообележување е соодветно за протеините. Дополнителна предност на јод-обележувачите е повисоката специфична активност која дава потенцијал за повеќе чувствителни анализи и поедноставно и побрзо детектирање. Постапките за јодирање може или да бидат директни, каде што анализот (или негов аналог) е обележан со замена на еден атом на водород со  $^{125}\text{I}$ , или, пак, индиректни преку поврзување на соодветна претходно јодирана молекула кон анализот. Главните недостатоци на  $^{125}\text{I}$  како обележувач се безбедносните прашања како што се следење на изложеноста, следење на контаминацијата и строгите процедури за диспозиција. Освен тоа, обележувачите имаат релативно краток рок на траење поради краткиот полуживотот на  $^{125}\text{I}$ .

### 7.6.2. Ензимско обележување

Ензимското обележување е воведено во имунотестовите во почетокот на 1970-тите и денес овие обележувачи се етаблираат како најголема и популарна класа на обележувачи. Ензимите ковалентно се врзуваат со протеините (на пр. антитела и анализот од интерес) и овозможуваат засилување на сигналот со создавањето обоени продукти со супстратот. Едни од најчесто користените ензимски обележувачи се пероксидаза и алкална фосфатаза. Комерцијално достапни се широк спектар на антитело-ензим конјугати што може да се користат како реагенси во ELISA и затоа обично нема потреба за обележување за време на анализата. Главните предности на ензимите како обележувачи се нивната достапност, соодветност за употреба со микротитарски плочи и фактот дека тие се мерливи со примена на многу методи со висока чувствителност. Главниот недостаток е големината на ензимската молекула, а и на конјугатот ензим-аналит. Комплексите што содржат големи ензими дифундираат полека што доведува до зголемено време на инкубација и можност тие да се поврзат неспецифично дури и на садовите и приборот во кои се изведува реакцијата.

### 7.6.3. Флуоресцентно обележување

Употребата на флуоресцентното обележување обезбедува важна алтернатива за радиоактивно и ензимското обележување кај имунометодите, со потенцијал за помали интерференции и поголема чувствителност. Постојат лесно достапни комерцијални китови и реагенси за оваа технологија (на пример од компанијата PERKIN ELMER) како што е имунотестот со лантанидна флуоресценција (DELFIА). Технологијата употребува хелати на лантанидни метални јони кои поседуваат флуоресценција со долг животен век под определени услови. Кај DELFIА методот овие лантанидни метални јони (особено европиумот), се користат за обележување на молекулите од интерес.

### 7.6.4. Хемилуминесцентно обележување

Хемилуминесцентното обележување е екстремно популарно во имунометодите со употреба на широк спектар на китови и анализатори на располагање, главно за поддршка на клиничко-хемиските апликации. Во моментот, овој тип обележување не е широко користено во конвенционалните биоанализи освен во EIA и квантитативното ензимско обележување (на пр. пероксидаза, алкална фосфатаза).

### 7.6.5. Стрептавидин-биотин систем

Стрептавидин-биотин (или авидин-биотин) системот е широко користен во имунометодите. Стрептавидинот е врзувачки протеин изолиран од *Streptomyces* кој има исклучително висок афинитет и специфичност за водорастворливиот витамин B6, биотин. Авидинот е протеин изолиран од белката од јајце, кој има слични особини како стрептавидинот но е повеќе склон кон неспецифично врзување. Биотинот е релативно поларен и на тој начин може лесно да се комбинира со антитела, а стрептавидинот (или авидинот) може да се куплираат во цврста фаза со флуорохромни соединенија и ензими. Стрептавидинот е тетрамер и има четири биотин-врзувачки места на молекулата. Затоа, употребата на стрептавидин-биотин системот во имунометодите значително може да ја подобри чувствителноста на анализата со проширување на сигналот.

### 7.7. Развој на метод и оптимизација

По генерирањето или набавката на реагенс антителата и соодветното обележување постојат голем број понатамошни чекори потребни за да се развие и да се оптимизира еден имунолошки метод за анализа. Работата на развојот на анализата е под влијание на голем број променливи од кои некои се наведени подолу:

- Квалитетот на антисерумот и обележувачот
- Тип на пуферот
- Протеинските додатоци
- Инкубацијата
- Концентрација на реактантите
- Времето и температурата на изведување на реакцијата
- Избраните чекори за сепарација
- Матрицата на примерокот

### 7.8. Биомаркери

Биомаркерите стануваат сè повеќе важни во фармацевтската индустрија поради примената во ефикасниот развој на нови лекови. Биомаркерите обезбедуваат информации за механизмите на дејство на лековите и потенцијалната ефикасност и може да помогнат во дизајнот на клиничките студии и соодветна селекција на дозата. Поради многуте комплексни хронични заболувања, како инфаркти, хронична опструктивна белодробна болест (ХОББ) и остеоартритис, неопходно е лекување на илјадници пациенти во текот на повеќе години за да се докаже ефикасноста на еден кандидат-лек. Определувањето на соодветните биомаркери за ефикасноста или безбедноста на лекот значително може да го скрати времето за клинички развој на лекови или времето за преземање критични одлуки во развојот. Всушност, информациите обезбедени од страна на група биомаркери, во програмите за клинички развој, придонесуваат кон донесување одлуки за најдобрите кандидати за лекови и за нивен брз развој. Спротивното исто така е точно; молекулите кои не одговараат може побрзо да се елиминираат.

- Биомаркер е карактеристика (параметар) што објективно може да се определи и да се оценува како индикатор за нормални физиолошки процеси, патогени процеси или фармаколошки одговори при терапевтска интервенција.
- Прогностички маркер е резултатот од направен тест или група тестови што укажува на веројатноста за прогресијата на одредена болест.
- Дијагностички маркер е резултатот од направен тест или група тестови што го одредува присуството или отсуството на одредена болест.

Во областа на развојот на лекови, биомаркерите во моментот најчесто се определуваат со имунометоди. Тоа е затоа што макромолекулите во биолошките течности генерално, не се подложни на биоанализа со висока чувствителност со користење на хроматографските пристапи, но извлекуваат добар имунолошки одговор при производство на соодветни реагенс-антитела.

## 8. *IN VITRO* ТЕХНИКИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЛЕКОВИТЕ И МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ

### 8.1. Вовед

Употребата на *in vitro* техниките за проучување на метаболизмот на лековите овозможува споредба на метаболизмот на соединението кај различни животински видови пред негова администрација кај луѓе. Повеќе релевантни информации за метаболитите кај човекот, најверојатно, ќе бидат обезбедени дури од клиничките студии. Затоа, компарацијата на метаболитите кај различни животински видови може да помогне во рационалното разјаснување на профилот на лекот-кандидат. Изборот на најсоодветните животински видови за проценка на метаболизмот, и конечно, потенцијалните клинички интеракции, односно способноста на лекот-кандидат да влијае на фармакокинетиката на други коаплицирани лекови (индукција или инхибиција на лек-метаболизирачките ензими), идентификувањето на метаболитите на лекови, исто така, може да се разгледува со користење и човечки *in vitro* системи.

Црниот дроб е едно од главните места за биотрансформација на ксенобиотиците и многуте модели на метаболизмот на лековите главно се фокусираат на црниот дроб и ензимите содржани во него. Овие истражувања на метаболизмот на лековите вклучуваат употреба на хепарни препарати кои може да варираат на ниво на клеточен интегритет. Системите се подредени од употреба на прочистени ензими *in vitro* до цели хепарни ткива *in situ*.

Цитохромите P450 се голема фамилија на ензими кои се вклучени во метаболизмот на широк спектар на структурно различни ксенобиотици. Цитохром P450 ензимите се поврзани со мембраните на ендоплазматичниот ретикулум и се користат концентрирани препарати кои за испитувањето на метаболизмот на лекот може да бидат подготвени од хомогенизиран црн дроб со диференцијално центрифугирање. Хомогенизираните субмитохондријални (S9) фракции се добиваат преку седиментација на партикулите, вклучувајќи ги клеточните нуклеуси и митохондриите од хомогенизираниот хепар на 9000 g и претставуваат сиров ткивен препарат. Така добиените препарати се непрочистени поради што може да предизвикаат аналитички грешки. Попроцистени ензими можат да се добијат од сиров хепар преку понатамошно центрифугирање. Фрагментите на ендоплазматскиот ретикулум се преобразуваат во везикули познати како микросоми. Микросомите се главен и збогатен извор на мембрански врзани ензими како што се цитохром P450 и како такви се најчесто применувани системи во фармацевтската индустрија при проучување на *in vitro* цитохром P450 посредуваниот метаболизам. Хомогенизираните субмитохондријални (S9) фракции подеднакво како и микросомите ја задржуваат својата ензимска активност при чување на -80 °C. Поради ова, S9 и микросомалните препарати можат да се приготват и да се чуваат на определена температура пред употреба, што е предност при вкрстени проучувања и споредба на метаболизмот помеѓу различни донори на хепар.

Паренхимните клетки на црниот дроб (хепатоцити) се богат извор на цитохром P450. Хепатоцитите може да бидат изолирани од ткиво на црниот дроб со ензимска дисоцијација и користење колагеназна перфузија. Откако ќе бидат изолирани, хепатоцитите можат да се користат за изучување на метаболизмот на лековите и индукција или инхибиција на лек-метаболизирачките ензими со ксенобиотици.

Најголема предност на хепатоцитите над микросомите во изучувањето на метаболизмот на лековите е самиот клеточен систем, каде хепатоцитите содржат многу ензими и ензимски кофактори кои не се присутни во микросомалниот дел од клетките. На пример, неколку од ензимите одговорни за конјугација на ксенобиотиците, како што се сулфотрансферазите, се наоѓаат во цитоплазмата на клетката (табела 8.1). Иако некои метаболитички патишта од Фаза II може да се изучуваат со користење микросоми дополнети со соодветни кофактори (на пр. глукуронидацијата), истото проучување е многу полесно доколку би се користеле хепатоцити.

Хепатоцити можат да се користат како краткотрајни суспензиони култури (4 часа) или или, пак, можат да се стават на подлога (хепатоцитни култури) и да се следи индукцијата или инхибицијата на ензимите предизвикана од определен лек за што се потребни подолги периоди на изложеност на хепатоцитите на испитуваната супстанца. Еден проблем со хепатоцитните клеточни култури е дека тие се подложни на дедиференцијација, односно губење одредени клеточни карактеристики, што резултира со брзо намалување на содржината и активноста на метаболизирачките ензими, особено цитохром P450. Како такви, основните хепатоцитни култури рутински не се користат за проучување на разликите во метаболизмот на

лекот кај различни животински видови, туку најчесто при проучување на ензимската индукција или инхибиција предизвикана од лек.

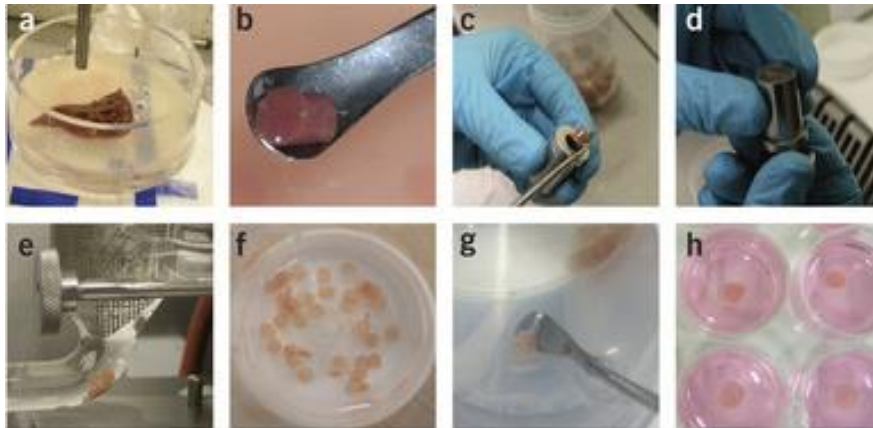
**Табела 8.1.** Локација во клетката на најважните ензими учесници во метаболизмот на лекови

Реакција	Ензим	Локација во клетката	Супстрат
<b>Реакции од Фаза I</b>			
<b><u>Хидролиза</u></b>	Естерази	Цитозол Митохондри Микрозоми Крв	Естери
	Епоксид хидролаза	Цитозол Микрозоми	Епоксиди
	Пептидази	Микрозоми Крв Лизозоми	Пептиди Глутатионски конјугати
<b><u>Редукција</u></b>	Оксидази со мешана функција	Микрозоми	Азо- Нитро- N-оксиди Арен оксиди Алкил халогениди
	Алкохол дехидрогеназа	Цитозол	Алкохоли
<b><u>Оксидација</u></b>	Оксидази со мешана функција	Микрозоми	Алкани Алкени Арени Амини Тиони Тиоестери
	Моноаминооксидази	Митохондри	Амини
	Алкохол дехидрогеназа	Цитозол	Алкохоли
	Алдеhid дехидрогеназа	Цитозол	Алдехиди
<b>Реакции од Фаза II</b>			
<b><u>Конјугација со глутатион</u></b>	Глутатион трансферази	Микрозоми	Електрофилни соединенија
<b><u>Глукуронидна конјугација</u></b>	Глукуронил трансферази	Микрозоми	Феноли Тиоли Амини Карбоксилни киселини
<b><u>Сулфатирање</u></b>	Сулфотрансферази	Цитозол	Феноли Тиоли Амини
<b><u>Метилација</u></b>	Метил трансферази	Цитозол Микрозоми	Феноли Амини
<b><u>Ацетирање</u></b>	Ацетил трансферази	Цитозол	Амини
<b><u>Конјугација со аминокиселини</u></b>	Трансферази	Цитозол Митохондри	Карбоксилни киселини Ароматични хидроксиламини

Црнодробните тенки исечоци претставуваат многу повисоко ниво на структурна целина споредени со субклеточните фракции или хепатоцитите и можат да се приготват преку употреба на инструменти секачи на ткиво (каков што е Krumdieck секач) (слика 8.1). Ткивните исечоци имаат предност споредени со хепатоцитите поради зачуваната природна тридимензионална клеточна структура, што овозможува да биде зачувана клеточната архитектура како и интрацелуларната комуникација. Овој клетка-клетка контакт помеѓу различните хепарни клетки е важен во одржувањето на клеточната диференцијација.

Исечоците на хепар, како и хепатоцитите даваат можност за изведување на Фаза I и Фаза II од биотрансформацијата.

Во студиите каде се користи човечки црн дроб, ткивните исечоци нудат поголема предност во однос на подготовката на хепатоцити, бидејќи примероци поврзани со Glisson-овата капсула (чие присуство е задолжително за хепатоцитна изолација) не се неопходни за подготовка на ткивните исечоци и затоа примерокот може да се подготви од кој било свеж човечки црнодробен примерок. Црнодробните исечоци, како и хепатоцитите, се способни за вршење и на двете биотрансформациски фази (Фаза I и Фаза II). Треба да се напомене дека не само црниот дроб, но и голем број други ткива како што се бубрезите, белите дробови и цревата содржат лек-метаболизирачки ензими и вршат метаболизам на ксенобиотици во *in vivo* услови. Затоа, *in vitro* препарати, особено на S9, и микросоми може бидат подготвени од кое било ткиво за испитување на екстрахепаталниот метаболизам или метаболитите на лековите.



Слика 8.1. Фази при подготовка на црнодробни исечоци

## 8.2. Подготовка на хепарни субклеточни фракции и хепатоцити

### 8.2.1. Подготовка на субклеточни фракции

Најчесто користените субклеточни фракции во студиите за метаболизмот на лековите се S9 фракцијата и микросомалните препарати. Двата препарати се подготвуваат со помош на диференцијално центрифугирање на ткивни хомогенати. Освен тоа, микросоми може да бидат подготвени и од S9 фракција со агрегација со калциум. Со цел да се зачува ензимската активност, пуферите, инструментите и роторот на центрифугата треба да се одржуваат ладни за време на постапката за подготовка, било со чување на мраз или во фрижидер.

Екстрахирираниот црн дроб (или делови од црниот дроб од поголемите животни и човекот) се мери и се мие во соодветен ладен пуферски раствор со pH=7,4. Почетниот пуфер се отстранува и кон црниот дроб се додава нов пуфер до добивање 25 % хомогенат. Ткивото се реже и хомогенизира со користење соодветна „мека“ хомогенизациона техника како на пример аван и пистил. Ако се користат поагресивни методи за ткивното разорување може да се намали ензимската активност на конечниот производ.

Ткивниот хомогенат потоа се центрифугира на 9000 x g за 20 минути на 4 °C. Ова е чекор на пелетирање при што се отстрануваат непроменетите клетки, клеточните остатоци, јадрата и митохондриите од суровиот клеточен хомогенат. Супернатантот ја претставува субмитохондријалната фракција (S9), која потоа може да биде брзо замрзната во течен азот и да се чува на -80 °C до употреба.

Микросомалната фракција, потоа може да биде подготвена од S9 фракцијата со понатамошно центрифугирање или со преципитација со калциум. Откако супернатантот ќе се одвои, микросомите се мешаат со пуфер (pH=7,4) во волумен еквивалентен на оригиналната тежина на ткивото кое се користи. За понатамошно прочистување на примерокот може да се повтори чекорот на центрифугирање. Со оваа подготовка генерално се добива протеинска концентрација од неколку милиграми микросомални протеини/милилитар ткиво. Чистотата и активноста на микросомалниот хомогенат зависат од техниката на подготовка и ќе се разликуваат во зависност од агресивноста на хомогенизационата техника и последователната температурата на хомогенатот и деградацијата на ензимите.

За зголемување на чистотата или ензимската активност на конечниот препарат може да се додадат различни пуфери. На пример, со додавање EDTA во пониска концентрација во подготвителните пуфери се смета дека се стабилизира активноста на флавин монооксигеназите (FMO). Додавањето калиум хлорид (1,15 % w/v) во пуферот за хомогенизација понатаму го прочистува препаратот со отстранувањето на крвта и другите цитоплазматски загадувачи. Додавањето глицерол во крајниот пуфер за чување на препаратот се смета дека ја зачувува ензимската активност во периодот на складирање. Табела 8.2 го покажува составот на пуферите кои се користат за подготовка на црнодробни субклеточни фракции.

**Табела 8.2.** Пуфери кои се користат за подготовка на S9 и микросоми

Пуфер за хомогенизација	0,1 M фосфатен пуфер (pH=7,4) + 1,15 % KCl (опционално 10 mM EDTA)
Пуфер за миене	0,1 M фосфатен пуфер (pH=7,4) + 1,15 % KCl (опционално 1 mM EDTA)
Пуфер за чување	0,1 M фосфатен пуфер (pH=7,4) + 20 % глицерол (опционално 0,1 mM EDTA)

Алтернативен метод за подготовка на микросоми е да се користи преципитација со калциум. Овој метод е базиран на калциум-зависната агрегација на ендоплазматичниот ретикулум. Се додава калциум хлорид на постмитохондриалната фракција до добивање крајна концентрација од 8 mM. Смесата се остава да отстои пет минути со повремено мешање. Се центрифугира на 27000 g за 15 минути при што се добиваат микросомалните пелети кои можат подоцна да бидат ресуспендирани.

#### Чекори за подготовка на S9 и микросомални протеини (со ултрацентрифугирање)

1. Сите чекори се изведуваат на 4 °C.
2. Се мери свежиот или одмрзнатиот примерок од црниот дроб.
3. Се додава пуфер за хомогенизација во волумен четири пати поголем од оној на тежината на црниот дроб.
4. Се реже мало парче ткиво и потоа се хомогенизира со користење механички хомогенизатор за ткиво.
5. Хомогенатот се центрифугира на 9000 g за време од 20 минути.
6. Супернатантите се собираат (S9 фракција) и се замрзнуваат во течен азот. S9 фракцијата се чува на -80 °C.
7. За подготовка на микросомалната фракција, S9 фракцијата се центрифугира на 10000 g за време од 1 час.
8. Супернатантот се отстранува и пелетите се ресуспендираат во пуфер. Хомогенатот се центрифугира на 10000 g за 1 час.
9. Супернатантот се отстранува и пелетите се ресуспендираат во пуферот за чување (се додава волумен еквивалентен на оригиналната тежина на ткивото).
10. Одделни аликвотни примероци може да се замрзнат (1 или 2 mL) во течен азот и се чуваат при -80 °C.

#### 8.2.2. Подготовка на хепатоцити

Постојат три методи кои рутински се користат за подготовка на хепатоцитите. Овие методи вклучуваат отстранување на калциумот од ткивото проследено со третман на ткивото со раствор кој содржи колагеназа. Отстранувањето на калциумот иницира поделба на клетка-клетка адхезијата поради калциум-зависните дезмосоми. Третманот со колагеназа ја дезинтегрира структурата на црниот дроб и овозможува ослободување на хепатоцитите.

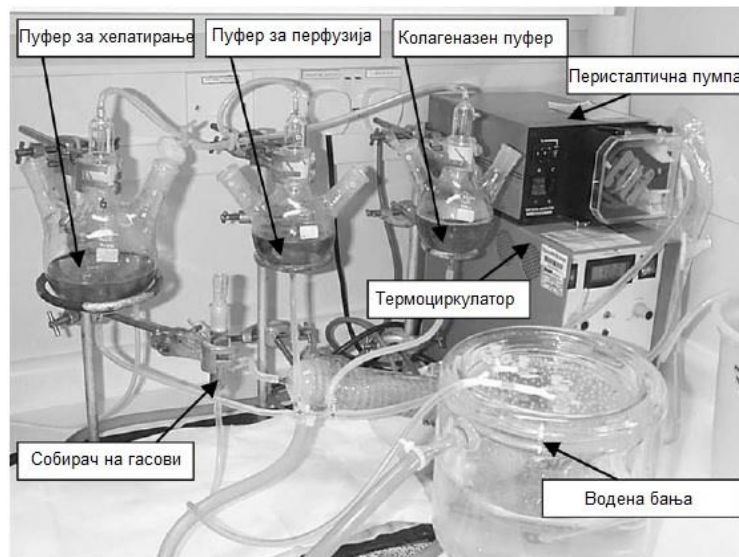
Првиот метод вклучува перфузија на црн дроб *in situ*. Вториот метод е развиен во 1976 година и вклучува дигестија на црнодробните парчиња, на тој начин избегнувајќи ја потребата од перфузија. Предноста на овој метод е тоа што интактната Glisson-ова капсула околу црниот дроб не е потребна, па може да се искористи и ткиво кое инаку залудно би се потрошило. Третиот метод е адаптација на *in situ* колагеназно-перфузионата техника. На перфузија се подлагаат малите фрагменти од краевите на лобусите на црниот дроб, опкружени со интактната Glisson-ова капсула. Овој трет метод е методот кој рутински се користи во повеќето



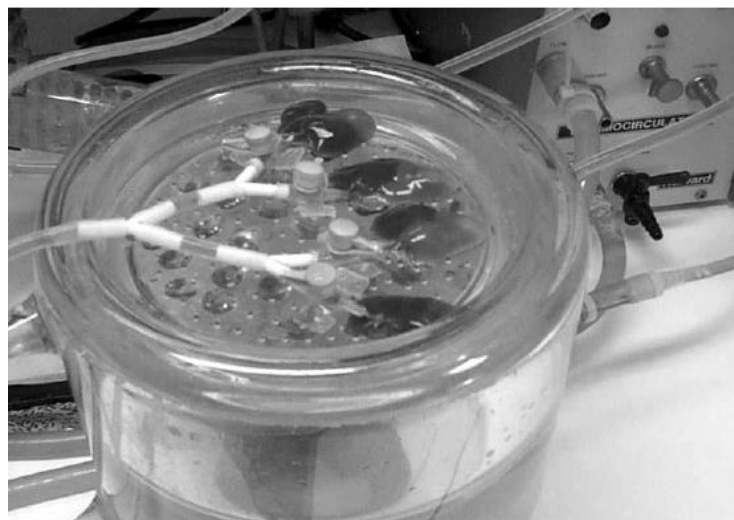
лаборатории, бидејќи со него може да се изолираат хепатоцити од неколку различни животински видови, вклучувајќи го и човекот, со минимални промени на основната техника. Слики 8.2 и 8.3 ги прикажуваат апаратите кои се користат за изолација на хепатоцити со постапка на перфузија на цели лобуси од црниот дроб на стаорец.

Во примерокот преку канила се внесуваат пуферите за перфузија (пуфер за хелатирање, пуфер за перфузија и колагеназен пуфер). Перфузијата со колагеназниот пуфер продолжува додека Glisson-ова капсула не стане сунѓереста на допир, некаде околу 20-25 мин за црн доб на стаорец и околу 1 час кога се работи за изолација на човечки хепатоцити. Времето на изолација на човечки хепатоцити варира од староста, статусот на фиброза на примерокот од црниот дроб кој се користи. По перфузијата, ткивото се отстранува и клеточната суспензија се филтрира и се диспергира со пуфер кој содржи DNAаза I (5 mg/100 mL). Со DNAазата се отстранува ДНК која инаку би се ослободила од оштетените клетки и која би предизвикала таложеење на клетките.

Сите натамошни манипулации на клеточната суспензија се вршат на 4 °C. Ниската температура ја минимизира активноста на цитотоксичните ензими кои можеби би биле ослободени од оштетените клетки и овозможува да се зачуваат лек-метаболизирачките ензими.



Слика 8.2. Апарат кој се користи за изолација на хепатоцити.



Слика 8.3. Изолација на хепатоцити: перфузија на црнодробен лоб од стаорец.

### 8.2.3. Подготовка на црнодробни исечоци

Постојат голем број различни техники и инкубациони системи за производство на црнодробни исечоци. На располагање се голем број комерцијални секачи на ткиво (Brendel-Vitron и Krumdieck апарати), кои овозможуваат сечење тенки парчиња од црниот дроб (со дебелина 250  $\mu\text{m}$ ). Исечоците подготвени од ткивото, се чуваат потопени во ладен физиолошки пуфер. По ова, подготвените исечоци се собираат и се користат во различни инкубациони системи, изборот на кој може да зависи од целта на експериментот.

## 8.3. Употреба на субклеточни фракции, хепатоцити и црнодробни парчиња во испитувањето на метаболизмот на лекови

### 8.3.1. Субклеточни фракции

Субклеточните фракции се најчесто применуван медиум за проучување на метаболизмот на лековите. Квалитативното проучување на метаболитичкиот профил на потенцијалните лекови има за цел да го докаже присуството на одредени метаболити кај животните и луѓето и со тоа да даде потврда на претходно извршените токсиколошки испитувања. За изведување на овој вид експерименти потребен е систем кој се состои од испитуваното соединение, пуфер, ензим и ензимски кофактори. Додавањето органски растворувачи во текот на ензимската инкубација треба да се сведе на минимум, бидејќи органските растворувачи може да влијаат на ензимската активност. Изборот на соодветни ензимски кофактори е исто така важен. На пример, подготовката на микросоми произведува фракција богата со ендоплазматичен ретикулум кој содржи мембрански врзан цитохром P450. Сите растворливи ензимски кофактори ќе се загубат во текот на процесот. Затоа, оксидацијата од страна на цитохром P450 ќе се стопира така што нема да се додаде редуцираната форма на кофакторот NADPH во текот на инкубацијата на микросомите.

Првиот процес кој се одвива е инкубација по што следи прочистување кое се постигнува со додавање соодветен органски растворувач при што доаѓа до преципитација на протеините. На овој начин добиените метаболити може да се анализираат со помош на различни инструментални техники како на пример HPLC во комбинација со масена спектроскопија, или нуклеарна магнетна резонанца. На овој начин, може да се добијат детални податоци за метаболитичкиот профил на испитуваното соединение.

Квантитативното испитување на метаболизмот може да се примени во првичните стадиуми на истражувањето за да се следат и потоа да се рангираат потенцијалните левоцикандидати во однос на нивната метаболитичка стабилност. Најновите достигнувања во областа на комбинаторната хемија им овозможуваат на хемичарите да создаваат голем број нови синтетски соединенија. Метаболитичката (не)стабилност е круцијален фактор во развојот на кој било нов лек. При овие истражувања се користат субклеточни фракции кои се создадени за да ја следат метаболитичката стабилност на голем број супстанции за релативно кратко време. Супстанциите со несоодветна метаболитичка стабилност можат на таков начин да бидат елиминирани уште во раните фази од истражувањето.

### 8.3.2. Хепатоцити

Хепатоцитите даваат можност за проучување на метаболизмот на потенцијалните левоцикандидати преку вклучување на цел клеточен систем. Овие клетки можат да се одржат во суспензија и до 4 часа при испитување на метаболизмот на одредени соединенија.

Најчест медиум кој рутински се користи при одгледување на хепатоцити во лабораторија е William's E медиум што содржи 4 mM L-глутамин (медиум кој не содржи фенол црвено бидејќи овој индикатор се метаболизира преку неколку лек-метаболизирачки ензими од Фаза II и затоа може да се натпреварува за метаболизмот од страна на овие ензими и да се спречи Фаза II метаболизам на тест-соединението).

### 8.3.3. Црнодробни исечоци

Како цело ткиво, исечоците од хепар претставуваат добра алтернатива на хепатоцитите и перфузираниот хепар при испитување на метаболизмот. Исечоците од хепар имаат широка примена при проучување на метаболизмот на лековите. Поради брзата и лесна подготовка, се олеснува задржувањето на метаболичката активност и поради ова се корисни како алатки кога се проучува биотрансформацијата на лековите *in vitro*. Можат да бидат користени како „метаболички фабрики“ за производство на значителни количества метаболит за карактеризација и идентификација.

Изборот на систем за инкубирање зависи од целите на експериментот. Може да биде употребен динамичен систем на култури доколку исечокот од органот е поставен на мрежа во вијала која го содржи медиумот и така поставен да се придвижува на температура од 37 °C, така што исечокот се движи во и надвор од течната фаза. Исто така, исечокот може да биде поставен во конусна колба и инкубиран на соодветна температура. Најчесто се применува „Whichever“ системот како начин на преинкубација на исечок свежо ткиво во свежа подлога во период од 2 часа. На овој начин се овозможува клетките од пресечената страна на ткивото да остварат хомеостаза. При краткотрајно инкубирање, вакви едноставни проучувања на ксенобиотската биотрансформација е многу слична со употребата на хепатоцитната суспензија. Овие парчиња можат да се инкубираат во медиум за ткивна култура (како што е William's E медиум), обогатен со глутамин кој ја содржи и испитуваната супстанца. Генерално кај краткотрајните култури, вишокот кислород може да се постигне со доведување кислород директно во вијалата. При долготрајните испитувања, подлогата мора да биде менувана редовно при што е потребна и соодветна оксигенација која се постигнува преку додавање кислород во инкубаторот со ткивна култура. На крајот од инкубацијата, медиумот како и хепаталното ткиво треба да се проанализираат, бидејќи метаболитите може да бидат задржани во самото ткиво.

### 8.4. *In vitro* и *in vivo* корелации

Сите системи прикажани досега може да се користат за определување на метаболичкиот клиренс на соединението во *in vitro* услови. Податоците добиени од кој било од овие системи, можат да бидат пресметувани со користење различни модели за да се обезбеди проценка на клиренсот на конкретниот лек во *in vivo* услови.

Првиот чекор во квантитативното предвидување на метаболниот клиренс на лек-кандидатот *in vivo* се постигнува со утврдување на внатрешниот клиренс на лекот. Внатрешниот клиренс е способност на ензимскиот систем да го метаболизира лекот во отсуство на какви било интеракции како што се врзувањето за плазмените протеини или протококот на крв. Внатрешниот клиренс всушност едноставно е односот на Михаелис-Ментеновите параметри  $K_m$  и  $V_{max}$ , како што е прикажано подолу:

$$\text{Брзина на метаболизам} = \text{внатрешен клиренс} \times \text{концентрација на супстрат } [S]$$

$$\text{Внатрешен клиренс} = \text{Брзина на метаболизам} / \text{концентрација на супстрат}$$

$$\text{Според Михаелис-Ментен: } V_{max} \cdot [S] / K_m + [S]$$

$$\text{Кога } [S] \text{ е } 10 \% \text{ или помалку од } K_m \text{ равенката се редуцира до } V_{max} \cdot [S] / K_m$$

$$\text{Па затоа, внатрешниот клиренс} = V_{max}/K_m.$$

### 8.5. Предности и недостатоци на *in vitro* системи употребувани во испитувањето на метаболизмот

#### 8.5.1. Субклеточни фракции

Предностите и недостатоците на користење на субклеточните фракции за проучување на метаболизмот на лекови се сумирани во табела 8.3.

S9 претставува сиров клеточен препарат и содржи голем број цитозолни и мембрански врзани ензими. Поради ова, ваквата фракција дава широк спектар на продукти на биотрансформација. За разлика од S9 кој е сиров препарат, микорозомалниот препарат е

високо прочистен ензимски препарат кој ги содржи само оние ензими кои се врзуваат за ендоплазматскиот ретикулум *in vivo*.

Постои, исто така, разлика во расположливоста на кофакторите за одредени ензимски реакции помеѓу препаратите. S9, како сиров клеточен препарат би требало да ги содржи сите неопходни кофактори потребни за ензимска активност. Сепак, искуството до сега покажало дека додавањето одредени кофактори како што е NADPH може да има клучна улога во задржувањето на активноста на цитохром P450. NADPH или NADP(H)- регенерирачкиот систем мора да биде додаден во инкубаторските мешавини за да отпочне процесот на биотрансформација. Дополнително, иако микрозомите содржат мембрански врзана глукуронил трансфераза, потребно е додавање на кофакторот уридин дифосфат глукуронска киселина (UDPGA) како и одредени детергенти за да отпочне фазата II - реакција на глукуронидација. Детергентите се додаваат за да ги ослободат ензимите од центарот на микрозомалната везикула каде пристапот на супстратот е оневозможен.

**Табела 8.3.** Предности и недостатоци на субклеточни фракции употребувани во испитувањето на метаболизмот

	Предности	Недостатоци
<b>S9</b>	Лесна подготовка	Сурова подготовка Висока протеинска концентрација
	Содржат растворливи и мембрански врзани ензими	
	Лесно чување и складирање	
	Содржат кофактори	
	Се подготвуваат и од замрзнато ткиво	
<b>Микрозоми</b>	Лесно чување и складирање	Неопходно е ултрацентрифугирање
	Се подготвуваат и од замрзнато ткиво	Не содржи кофактори
	Содржат мембрански врзани ензими	

S9 и микрозомите имаат предности бидејќи можат да се приготвуваат во големи количества, подеднакво од замрзнато или свежо ткиво. Еднаш подготвени, препаратите можат да се чуваат на -80 °C без каква било промена на ензимската активност. Ова значи дека голем број експерименти можат да се изведуваат употребувајќи еднаш подготвен препарат, а со ова се олеснува споредувањето помеѓу експериментите.

Недостатоците од употребата на субклеточни култури, вклучуваат интеракции поради големи концентрации на неспецифични протеини во матриксот. Протеините можат да се врзат и битно да го отстранат испитуваниот лек од инкубациониот медиум со тоа предизвикувајќи погрешна проценка на стабилноста на лекот. Концентрациите на неспецифичните протеини се многу поголеми кај S9 фракциите отколку кај микрозомалните фракции. Присуството на големи количества протеини можат да влијаат на метаболизмот директно или да ја попречат анализата на експерименталните инкубати.

Метаболизмот, исто така, може да биде блокиран во субклеточните фракции за време на одвивањето на метаболичките трансформации од Фаза 1. Ова може да доведе до погрешна процена на метаболичкиот промет. Исто така, постои можност да се појави реакција помеѓу ензимот и лекот при употреба на субклеточни фракции во тек на *in vitro* експериментите. На пример, лек со мал волумен на дистрибуција можно е воопшто и да не е достапен на клетките за да извршат ензимска активност *in vivo* и поради ова метаболичката стабилност на лекот да биде погрешно проценета. Активноста на субклеточните фракции е високо зависна и од условите на анализата, на пример, активноста на цитохром P450 е зависна од концентрацијата на пуферот и pH вредноста.

### 8.5.2. Хепатоцити

Предностите и недостатоците на користење на хепатоцитите за испитување на метаболизмот на лекови се прикажани во табела 8.4.

Хепатоцитите можат да се употребуваат во краткотрајни суспендирани инкубати, слични на оние за субклеточните фракции или, пак, можат да се чуваат во долготрајни култури. Овој дел се однесува на краткотрајните суспензии. Хепатоцитите се структурно непроменети хепатални клетки и поради ова претставуваат чекор понапред во однос на ткивниот интегритет за разлика од субклеточните фракции. Присуството на непроменета клеточна мембрана значи

дека пристапот на лекот до лек-метаболизирачките ензими е контролиран на сличен начин како *in vivo*. Така на пример, пристапот на лекот во и надвор од клетката може да биде контролиран од физичкото присуство на клеточната мембрана или од клеточните транспортери (влезните и излезните) присутни на клеточната мембрана.

Хепатоцитите не само што го содржат целиот систем на активни ензими, воедно тие содржат и кофактори потребни за одвивање на метаболитичките процеси. Поради ова хепатоцитите имаат предност пред употребата на субклеточни фракции. Дополнително, поради комплетниот систем на ензими, метаболизмот може нормално да се одвива од Фаза I во Фаза II, при што метаболитите од Фаза I (продуктните инхибитори) нема да влијаат на понатамошниот метаболизам како кај микрозомите. Поради присуството на непроменета клеточна мембрана, ензимската активност е помалку зависна од пуфери или подлоги споредено со субклеточните фракции, исто така по лизирање на клетките, хепатоцитните суспензии се многу почисти и поради ова полесни се за анализа во однос на субклеточните фракции.

**Табела 8.4.** Предности и недостатоци на хепатоцитите употребувани во испитувањето на метаболизмот

	Предности	Недостатоци
Хепатоцити	Комплетен ензимски состав	Потребно е свежо ткиво
	На располагање се методи за работа во различни култури	Чувањето е лимитирано
		Нема клетка-клетка контакт

Недостатоците на хепатоцитните подготовки ја вклучуваат потребата од свежо ткиво за изолација на клетките, иако голем број автори тврдат дека ензимската активност на изолирани клетки може да се зачува преку криопрезервација.

### 8.5.3. Црнодробни исечоци

Табела 8.5 нагласува некои предности и недостатоци на црнодробните исечоци во испитувањето на метаболизмот на лековите. Нивната главна предност лежи во леснотијата на подготовката и одржувањето клетка-клетка контакт, и на тој начин тие нудат алтернатива за други целоклеточни системи за одредени апликации. Криопрезервацијата на црнодробните исечоци е испитана со поглед на долгорочното чување човечки ткива кои го задржуваат својот капацитет за метаболизирање на лекови и резултатите во оваа област се охрабрувачки.

**Табела 8.5.** Предности и недостатоци на употребата на црнодробни исечоци во испитувањето на метаболизмот на лекови

	Предности	Недостатоци
Црнодробни исечоци	Брза, лесна подготовка	Потребно е свежо ткиво
	Клетка-клетка контакт	Некроза во средината на исечокот
	Не се користат протеолитички ензими	Добивањето долгорочни култури е тешко
	Присутни сите типови клетки	Квантитативните студии се варијабилни (поради нееднаквата големина на исечоците)
Потенцијал за криопрезервација		

## 8.6. Испитување интеракции на лекови со користење *in vitro* системи

### 8.6.1. Интеракции лек-лек: субклеточни фракции и хепатоцити

Голем број клинички значајни интеракции на лекови ја истакнуваат потребата да се испита етиологијата на реакциите на метаболизам на лековите и да се утврди дали потенцијалните интеракции на лекови може да се случат и во клинички услови.

За оваа намена биле користени субклеточните фракции и суспензионите култури на изолирани хепатоцити, па така, на пример, може да се утврди инхибиција на метаболизмот на лек А во присуство на лекот Б. Може да се детектираат механизмите на конкуритивна инхибиција на или од страна на лекот-кандидат и понатаму да се испитаат сите потенцијално опасни интеракции. Со испитување на конкуритивната инхибиција со користење конкурент чиј метаболизам се припишува на еден тип цитохром Р450, исто така може да се расветлуваат различните изоформи на цитохром Р450 вклучени во метаболизмот на потенцијален лек-кандидат.

### 8.6.2. Интеракции на лек: еднослојни култури на хепатоцити

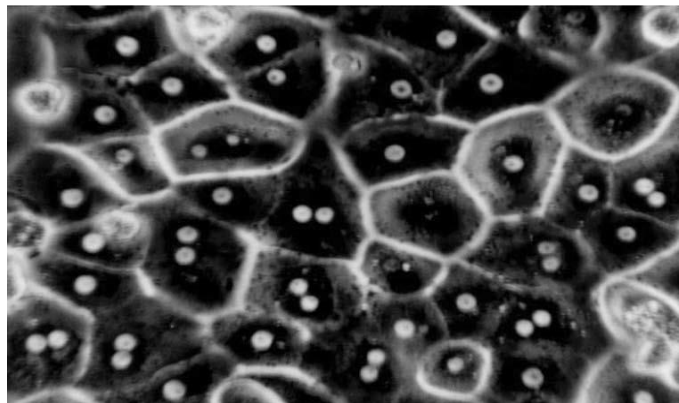
Еден од главните недостатоци на примарните култури на хепатоцити е брзото губење на ензимската експресија кое се јавува бидејќи културите од овие клетки подлежат на дедиференцијација. Конкретно, постои загуба на цитохром Р450 експресијата во еднослојни култури на хепатоцити.

Затоа еднослојните култури на хепатоцити се користат најчесто за испитување на ензимската индукција и инхибиција. Индукцијата и инхибицијата на ниво на лекметаболизирачките ензими присутни во клетката играат клучна улога во некои несакани реакции на лековите. Одредени лекови можат да индуцираат или да инхибираат производството на лекметаболизирачки ензими, често преку влијание врз генската експресија.

Со ставање на хепатоцитите во примарни култури и обезбедувањето со супстрат составен од екстрацелуларните матриксни протеини како што е колагенот, заедно со дополнителни ткивни медиуми, хепатоцитите може да се одржуваат дури и неколку дена или недели. Бидејќи примарните култури може да се одржуваат во овој пролонгиран период, може да се изучуваат и промените во генската експресија.

Свежо изолираните хепатоцити можат да бидат посеани така што се формираат примарни култури. Хепатоцити поставени во култура на колаген-обложена пластика придобиваат еднослојна морфологија (слика 8.4). Хепатоцитите не пролиферираат во културата, па така мора да бидат посеани во доволна густина на почетокот, така што клетките ќе формираат монослоеве откако ќе се прикачат.

Еднослојните култури на хепатоцитите се користат да се испита индукцијата на цитохром Р450 со потенцијалните лек-кандидати. И покрај првичното губење на цитохром Р450 активноста во еднослојните култури на хепатоцитите, нивоата на индивидуалните цитохроми Р450 може да се зголемат повторно при третман со одредени хемиски-индуцирачки агенси. Табела 8.6 ги покажува едни од најчесто користените агенси за индукција заедно со цитохром Р450 кој тие го индуцираат.



**Слика 8.4.** Хепатоцити од стаорец во еднослојна култура. Клетките се засадуваат  $1 \times 10^5$  клетка на  $\text{cm}^2$  на плочи обложени со колаген.

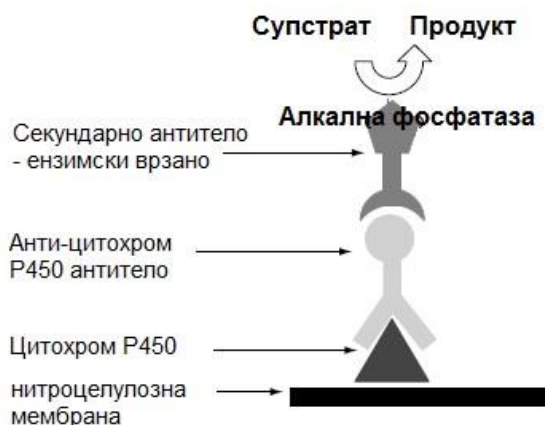
За испитување на индукцискиот потенцијал на потенцијален лек-кандидат, монослоевите на хепатоцитите се подготвуваат и се оставаат 24 часа пред третманот со познати индуцирачки агенси или потенцијалниот лек-кандидат. Клетките се третираат секојдневно со доза од испитуваниот агенс во период од три дена. Индукцијата на цитохром Р450 може да се утврди на неколку начини. Зголемувањето на каталитичката активност на цитохром Р450 во третираните клетки може да биде утврдена со инкубирање на контролните и

третираните клетки со тест-супстрат специфичен за изоформата на цитохром P450 од интерес. Табела 8.6, исто така, ги покажува тест-супстратите најчесто користени за оценување на активноста на различни цитохроми P450.

**Табела 8.6.** Цитохром P450: најчесто користени индуцирачки агенси и соодветни тест-супстрати

Цитохром P450	Индуцирачки агенси	Тест-супстрати
1A	$\beta$ -нафтофлавон	7-етоксирезорурфин
	3-метилхолантрен	Фенацетин
2A	Барбитурати (Фенобарбитон)	Кумарин
2B	Фенобарбитон	7-пентоксирезорурфин
		7-метоксирезорурфин
2C	Рифампицин	Диклофенак (2C9)
		Толбутамид (2C9)
		S-мефентоин (2C19)
2D	Непознат	Буфуралол
		Дебрисоквин
2E	Етанол	Хлорзоксазон
	Изонијазид	p-нитрофенол
3A	Рифампицин	Тестостерон
	Дексаметазон	
	Фенобарбитон	Мидазолам

Промените во количеството на цитохром P450 протеините може да се утврди и со примена на гел електрофореза и Western blotting. По третманот со индуктор или потенцијален лек-кандидат, клетките се собираат и се приготвува микрозомална фракција од клетките. Микрозомалните протеини потоа се разделуваат со користење натриум додецилсулфат полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) и се префрлаат електрофоретски на нитроцелулозни носачи. Нитроцелулозата потоа се инкубира со антицитохром P450 антитела, специфични за секоја поединечна изоформа. Откако овие антитела ќе се врзат за цитохром P450 на мембраната, мембраната потоа се инкубира со секундарно антитело кое содржи врзан ензим каква што е алкалната фосфатаза. Алкалната фосфатаза се користи за да се добие колориметриска реакција која резултира со формирање обоени фрагменти таму каде што цитохром P450 фрагментот е пренесен од гелот. Интензитетот на овој обоен фрагмент е пропорционален на количината на цитохром P450 првично присутен во примерокот. Сличен метод се користи и со примена на цитохром P450 ELISA реагенс-китови иако не постои потреба за гел сепарација бидејќи антитело-врзувачките чекори се изведуваат во 96-микролитарски плочи. Основните принципи од овие техники се прикажани на слика 8.5.



**Слика 8.5.** Принцип на блотинг со користење ензимско сврзано секундарно антитело.

### 8.6.3. Лек интеракции: црнодробни исечоци

Црнодробните исечоци, исто така, може да се користат за изучување на индукцијата на цитохром P450. Тие можат да се инкубираат во култури за да се испита индукцискиот потенцијал на ксенобиотиците врз цитохром P450 ензимите кај различни животински видови, меѓутоа овие испитувања може да се прошират и со користење човечки црнодробни исечоци за да се процени индукцијата во човечко ткиво. Црнодробните исечоци, исто така, може да се користат за да се оцени инхибиторниот потенцијал на ксенобиотиците врз лекметаболизирачките ензими, особено што исечоците ги задржуваат можностите и за Фаза I и Фаза II метаболизам во *in vitro* услови.

### 8.7. Други *in vitro* модели

Најчеста е употребата на црнодробна S9 фракција, микросоми, хепатоцити и црнодробни исечоци во проучувањето на метаболизмот на лекови. Но, постојат и други *in vitro* модели кои може да се користат, кои, сепак, не се широко користени од страна на фармацевтската индустрија во моментов. Поради забележаните проблеми со хепатоцитите кога ќе се ставаат во култура, односно клеточната дедиференцијација и потоа намалување на нивото на цитохром P450, развиени се голем број техники за продолжување на активноста на хепатоцитите во културата. Во овие техники се вклучуваат употребата на црнодробни сфероиди, колаген-сендвичи и биореактори со шупливи влакна. Како можност во проучување на метаболизмот на лековите исто така е и користењето на хепаталните клеточни линии.

#### 8.7.1. Црнодробни сфероиди

Црнодробните сфероиди се кластери на хепатоцити кои се формираат со култивирање свежо изолирани клетки на садови обложени со поли-(2-хидроксиетилметакрилат) (p-HEMA) којшто е позитивно наелектризиран слој за кој хепатоцити не се во состојба да се закачат. Со нежно тресење на примерокот во орбитален шејкер се овозможува хепатоцитите да агрегираат и да формираат сфероиди. Црнодробните сфероиди имаат предност што, како и црнодробните исечоци, клетките во крајна линија ја одржуваат тридимензионалната структура со што се овозможува повторно воспоставување на клетка-клетка комуникацијата. Сфероидите се способни на метаболизам за подолги периоди на време и различните изоформи на цитохром P450 може да бидат индуцирани од различни хемиски индуцирачки агенси.

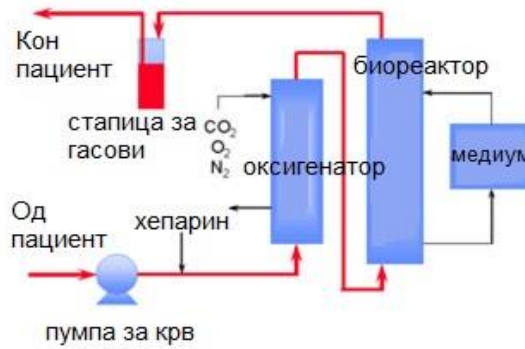
#### 8.7.2. Колагенски-сендвич култури

Култивирањето на хепатоцити во колагенски сендвичи се покажало дека ја проширува одржливоста на култивираниите хепатоцити во однос на интегритетот на клеточната мембрана и стабилноста на P450 ензимот. Клетките се култивираат во колаген-обложени колби на нормален начин, но, сепак, по еден период на време (околу еден ден) хепатоцитите се имобилизираат во уште еден слој на колаген.

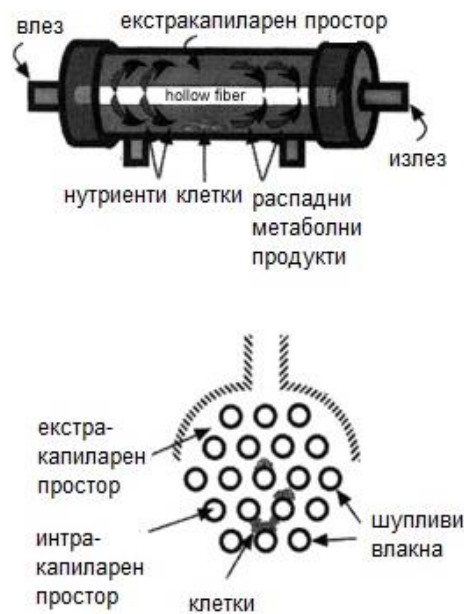
#### 8.7.3. Биореактори со шупливи влакна

Технологијата со шупливи влакна се користи клинички за да обезбеди екстра-телесен црнодробен помошен уред за одржување на пациентите додека чекаат трансплантација на црниот дроб или додека се чека спонтано да се случи хепатална регенерација. Биореакторите се засадуваат со човечки или свински хепатоцити и овие клетки вршат заменска синтетичка, метаболна, детоксикациска и екскреторна функција на црниот дроб кај пациенти со црнодробна инсуфициенција. Клинички, овие уреди може да се користат за релативно краток временски период (8-12 часа) (слика 8.6). Сепак, бидејќи системот нуди динамична животната средина за култура на хепатоцити, тој е под тековни испитувања за неговата соодветност за употреба во студии на метаболизам на лековите во рамките на фармацевтските истражувања. Биореакторот може да се засее со хепатоцити од различни животински видови и ако системот може да се одржува за подолг временски период всушност ќе обезбеди вештачки црн дроб со кој ќе се работи, па тогаш ќе биде можно да се проучуваат сите аспекти на функцијата на црниот дроб и особено метаболизмот на лекови, индукцијата на лекметаболизирачките ензими и хроничната хепатотоксичност (слика 8.7).





Слика 8.6. Екстра-телесен црnodробен уред



Слика 8.7. Систем на биореактор со шупливи влакна

#### 8.7.4. Хепатални клеточни линии

Постојат неколку хепатални клеточни линии достапни за користење во проучувањето на метаболизмот на лекови. Повеќето се добиени од линии на хепатоми или аденокарциноми. Од особен интерес за фармацевтската индустрија се човечките клеточни линии, главно HepG2 и Hep3B. Еден проблем со користење на овие клеточни линии, сепак, е што нивните лекметаболизирачки ензими не ги одразуваат оние присутни во свежо изолираните човечки хепатоцити. Метаболната активност на некои метаболизирачки ензими дури и не може да се детектира. Проблемот на ниската активност може да биде делумно надминат со претходно третирање на клеточните линии со индуктори на различни метаболитички ензими. Но, сепак, и индуцираната активност е многу пониска од ензимската активност во свежо изолирани човечки хепатоцити. HepG2, најчесто користената човечка хепатална клеточна линија, е погодна за испитување на неколку патишта од Фаза II и метаболизмот преку цитохром P4501A, додека каталитичката активност на другите изоформи на цитохром P450 во овие клетки е намалена.

#### 8.7.5. Рекombинантни човечки CYP и UGT ензими (суперзоми, бакулосоми)

Рекombинантните човечки CYP и UGT ензими докажано се корисна алатка во *in vitro* испитувањата на биотрансформацијата. Овој *in vitro* модел, именуван уште и како суперзоми

или бакулосоми, се добива со трансфекција на клетки од инсекти со cDNA за човечките CYP и UGT со бакуло вирус бидејќи клетките на инсектите немаат ендогена CYP и UGT активност. Предноста на овој систем е тоа што се експресира ензимската активност на една CYP или UGT изоформа и затоа може да се направи проценка на индивидуалните метаболички ензими и нивниот придонес во определен метаболички пат. Дополнително, овој *in vitro* систем може да биде од корист и при евалуација на лек-лек интеракциите. Исто така, поради достапноста на суперзоми со различни CYP и UGT генотипови, може да се проценува влијанието на различни полиморфизми врз биотрансформацијата на лековите. Во моментот комерцијално се достапни сите заеднички човечки CYP и UGT кои се коекспресираат со NADPH-цитохром P450 редуктазата. Недостаток на овој *in vitro* модел е латентноста на глукуронидацијата бидејќи активниот центар на UGT е заштитен зад хидрофобна бариера. За решавање на овој проблем се користат агенси кои формираат пори како што е аламетицин. Кога се изведуваат експерименти со суперзоми, треба да се направи и експеримент со контролни нетрансфицирани суперзоми. При оценување на UGT ензимската активност треба да се додаде уридин дифосфоглукуронска киселина (UDPGA) како кофактор и додавање на NADPH регенерирачки систем (NRS) (кој се состои од  $\beta$ -NADPH, глюкоза-6-фосфат и глюкоза-6-фосфат дехидрогеназа) или NADPH за време на инкубацијата при оценување на CYP активноста.

## 9. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА ПРОЦЕНКА НА МЕТАБОЛИТИ НА ЛЕКОВИ

За соодветна метаболичка проценка на лековите предуслов е познат идентитет на метаболитите. Течната хроматографија заедно со масената спектрометрија се најмоќната аналитичка алатка за скрининг и идентификација на метаболитите на лекови во биолошки матрици. Краток преглед на аналитичката стратегија за идентификација на метаболитите е даден подолу заедно со најважните информации во врска со изборот на соодветна инструментација (LC-MS).

### 9.1. Инструментација

#### 9.1.1. Јонизациски техники

LC-MS јонскиот извор има двојна улога, отстранување на растворувачот од LC елуентот и продуцирање јони во гасна фаза од примерокот за анализа. Примената на методи со јонизација под атмосферски притисок (API) всушност го обезбедува пробивот на LC-MS системите на чело на аналитичките техники од избор. Јонските извори, како API, работат под атмосферски притисок, додека други како електронската (EI) или хемиската јонизација (CI) работат во вакуум. Додека „меките“ API интерфејси од инструментот, особено електроспрејот, продуцира молекуларни јони со минимална фрагментацијата, изворите со висока енергија, како EI најчесто генерираат фрагментирани јони. API техниката најмногу се користи за детекција на метаболити, идентификација и квантификација, што се должи на способноста да се работи под атмосферски притисок, компатибилноста со обратна фазната хроматографија и генерацијата на непроменети молекулски јони со многу висока чувствителност. Сите три API техники: јонизација со електроспреј (ESI), хемиска јонизација под атмосферски притисок (APCI) и фотојонизација под атмосферскиот притисок (APPI) се комплементарни.

- Јонизацијата со електроспреј (ESI) е префериран метод за идентификација и квантификација на метаболити. Тоа е најуниверзалната техника за воведување на молекулите во гасна фаза на најмалку деструктирачки начин и затоа е најверојатно дека ќе даде непроменети молекуларни јони. ESI е совршено прилагодена за поларни, јонски и термолабилни соединенија како што се метаболитите на лекови; особено глукурониди и други метаболити од Фаза II. За оваа техника е неопходна јонизација на аналитите во растворот пред воведувањето во јонскиот извор и на тој начин најдобро функционира кај базни или кисели соединенија. Во зависност од поларитетот на напонот, небулизираните капки кои го опкружуваат јонизираниот примерок за анализа ќе бидат позитивно или негативно наелектризирани. Јони од растворот се испуштаат во гасната фаза без примена на топлина што ја прави ESI погодна за анализа на термолабилни соединенија. Многу параметри, како што се карактеристиките на

примерокот за анализа и растворот ( $pK_a$ , концентрацијата на аналитот, други електролити во растворот, диелектричната константа на растворувачот) влијаат на процесот на формирање јони. Во зависност од хемиската структура на примерокот за анализа, може да се формираат полинаелектризираните молекуларни јони, што е оптимално за анализа на биолошките макромолекули (на пример, протеините). И покрај бројните предности на ESI, недостаток е што оваа техника е подложна на ефекти на јонско потиснување од високи концентрации на пуферот, солите и други ендогени соединенија во растворот на матрицата.

- Хемиската јонизација под атмосферски притисок (APCI) е посоодветна за помалку поларни соединенија. Одредени класи на соединенија, како што се халогенираните јагледородни аналози и ароматичните соединенија се кандидати за APCI кои во исто време не даваат или даваат само слаб одговор при употреба на ESI. APCI како и ESI произведува јони врз основа на API стратегија, но со сосема различен процес. Во овој случај, течниот елуент се вбригува во загреаната комора (450-550 °C), каде што високата температура на протокот небулизиран гас предизвикува моментално испарување на растворувачот и примерокот за анализа. Во прилог на испарливоста при применетата температура, термичката стабилност на примерокот за анализа е предуслов за успешната примена на APCI (на пример, може да се раскинат врските во глукуронидите и да се појават во форма на протониран агликон). За ефикасна јонизација, употребената мобилна фаза треба да е испарлива и исто така подложна на ацидо-базни реакции во гасна фаза. APCI техниката е помалку склона кон јонска супресија и обезбедува поширок динамички ранг на детекција од ESI поради јонизацијата која се јавува главно во гасната фаза.
- Фотојонизацијата под атмосферски притисок (APPI) е релативно нов јонизациски метод. Оваа техника може да се користи за јонизација на аналити кои не може лесно да се јонизираат со ESI и APCI. APPI има слично подрачје на примена како и APCI но со проширување кон неполарните соединенија. Кај APPI јонскиот извор е многу сличен на APCI изворот, само што овде се користи фотојонизирачка ламба. Во зависност од протонскиот афинитет на примерокот за анализа во однос на составот на мобилната фаза, се добиваат или молекуларни јонски радикали (обично кај неполарните соединенија) или протонирани молекуларни јони (типично за поларните соединенија).

### 9.1.2. Масени анализатори

Функцијата за масените анализатори е одвојувањето на јони формирани во јонизациски извор во согласност со нивните различни соодноси маса-полнеж ( $m/z$ ). Квалитетот на сепарацијата според маса се карактеризира со степенот до кој блиските  $m/z$  вредности можат да бидат поделени во масениот анализатор. Масените анализатори се класифицираат во врска со резолуцијата на ниско и високо резолуциски инструменти. Последните се поврзани со уште еден важен параметар, точност на маса, што овозможува одредување на елементната формула на одредениот примерок. Претставниците на овие инструменти се опишани подолу.

- Инструменти со троен квадрипол (QQQ) се најчестите масени спектрометри во аналитичките лаборатории поради нивните очигледни предности во врска со високата чувствителност за квантитативна анализа. Овие инструменти често се користат и за идентификација на метаболити што се должи на широката достапност и можноста за тандем масена спектрометрија (MS/MS). Кај QQQ, првиот квадрипол ги филтрира јоните од интерес, а вториот квадрипол, исто така означен и како ќелија за колизија, ги фрагментира овие јони и се продолжува со филтрирање на фрагментираниите јони од страна на третиот квадрипол пред да се стигне до масениот детектор. Техниката е особено корисна за идентификација на метаболити бидејќи режимот на скенирање не бара претходно познавање на молекулската маса на метаболитите.
- Инструментите со јонска стапица (IT) се (како и QQQ) компатибилни со широк спектар на јонизациски интерфејси. Овие анализатори користат комора т.н. јонска стапица, каде се фаќаат јоните, а потоа селективно се исфрлуваат од комората. Осван тоа,

резонантната ексцитација која се применува во јонската стапица обезбедува ефикасна дисоцијација на јоните-прекурсори до јони-продукти.

- Инструментите со троен квадрипол-линеарна јонска стапица (QTrap) ја комбинираат чувствителната QQQ технологија со високиот капацитет на линеарните јонски стапици. Во овој инструмент, последниот квадрипол на QQQ се заменува со линеарна јонска стапица која работи како маса-разделувачки квадрипол. Со ова се обезбедува јасно подобрување на способноста за скрининг на метаболити во споредба со традиционалните IT или QQQ. QTrap овозможува висока чувствителност и широк спектар на скенирање на маса.
- Анализаторите со „време на прелетување“ (TOF) детектори се најпогодните масени спектрометри со висока резолуција за брза и економична идентификација на метаболити. TOF инструментите се релативно едноставни и способни за снимање на сите формирани јони за време од неколку микросекунди со висока чувствителност на детекцијата. Времето потребно за јоните да достигнат до детекторот е пропорционално со  $m/z$  соодносот. Предноста на TOF лежи во нивната многу висока чувствителност при детекција, добивањето широк спектар на податоци, овозможувајќи истовремено откривање на сите метаболити од интерес во примерокот истовремено. Високата масена резолуција и точност на масата ( $< 3\text{-}5$  ppm) овозможува сигурна и точна идентификација на метаболити преку одредување на елементната формула на метаболитите. Освен тоа, тие се идеални и за брза хроматографија.
- Инструментите со троен квадрипол-време на прелетување (Q-TOF) го комбинираат првиот масен филтер и колизијската ќелија QQQ со TOF како втор масен анализатор. Овие инструменти може да функционираат како вистински тандем-MS со обезбедување точна маса на добиените јони.

## 9.2. Стратегии за идентификација на метаболити

MS методологијата е најсоодветниот пристап за идентификација на метаболити бидејќи тие најчесто се присутни во многу ниски концентрации во сложени биолошки матрици. Соодветната LC-MS инструментација е од клучно значење и за детекцијата и за објаснувањето на структурата, иако алтернативни други техники, исто така, може да бидат важни во случај кога MS податоците сами по себе не се доволни.

Тандем-масените спектрометриски инструменти освен својата клучна улога за метаболитната квантификација, исто така, се соодветни и за квалитативни цели. Некои од вообичаените промени во масата кои може да се детектираат со испитувања направени со примена на овие техники се прикажани во табела 9.1.

Еден пример при идентификацијата е следење на јоните-прекурсори и загубата на неутралните групи во соединенијата кои се специфични пристапи за идентификување непознати метаболити. Некои метаболити од фаза II при фрагментацијата губат различни неутрални групи кои може да се користат за посебна идентификација на овие конјугати. Глукуронидите, сулфонатните и глутатионските конјугатите често може да се откријат со користење на вториот пристап преку нивниот  $m/z$  сооднос (176, 80 и 129, соодветно).

Типичните јони-прекурсори за некои лекови конјугати како алифатични сулфати, сулфонати и фосфати може да се следат преку нивните се  $m/z$  соодноси кои се 97, 81 и 79, соодветно. Овој пристап се засновува врз предвидената фрагментација и однесувањето на метаболитите, затоа метаболити со неочекувана фрагментација може и да се пропуштат. Сепак, во комбинација со целосното скенирање на податоците, овие два пристапа се моќна алатка за метаболитна идентификација.

**Табела 9.1.** Промена на маса при испитување на метаболити на лекови добиени преку некои од најчестите метаболитни реакции

Тип на реакција	Промена во молекулската формула	Промена во маса (Da)
Дехидратација	- H <sub>2</sub> O	-18
Деметилација	- CH <sub>2</sub>	-14
Дехидрогенација	- H <sub>2</sub>	-2
Хидрогенација	+ H <sub>2</sub>	+2
Метилација	+ CH <sub>2</sub>	+14
Хидроксилација	+ O	+16
Епоксидација	+ O	+16
S/N-оксидација	+ O	+16
Хидратација	+ H <sub>2</sub> O	+18
Дихидроксилација	+ O <sub>2</sub>	+32
Ацетилирање	+ C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	+42
Сулфатирање	+ SO <sub>3</sub>	+80
Глукуронидација	+ C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	+176
Конјугација со глутатион	+ C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> S	+305

## ЛИТЕРАТУРА

Asha, S., Vidyavathi M. (2010). Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs, a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 160(6):1699-1722.

Brandon, E.F., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2003). An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 189(3): 233-246.

Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. (Ed) (2006) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11-то издание). McGraw Hill Medical Publishing Division.

Cai, Y., Kingery, D., McConnell, O., Bach, A.C. (2005). Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery. *Rapid Commun Mass Spectrom.*19(12):1717-1724.

Coleman, M.D. (Ed.) (2010). *Human Drug Metabolism* (2 издание). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

De Graaf, I.A.M., Olinga, P., de Jager, M.H., Merema, M.T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E.G., Groothuis, G.M.M. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature: Protocols.* 5: 1540-1551.

Evans, G. (Ed.) (2004). *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism.* CRC Press.

Fasinu, P., Bouic, P.J., Rosenkranz, B. (2012). Liver-based *in vitro* technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr Drug Metab.* 13(2): 215-224.

Hariparsad, N., Sane, R.S., Strom, S.C., Desai, P.B. (2006). *In vitro* methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol In Vitro.* 20(2):135-153.

Kamel, A., Prakash, C. (2006). High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology. *Curr Drug Metab.* 7(8):837-852.

Klaassen, C.D. (2008) Casarett and Doull's Toxicology, *The Basic Science of Poisons* (7-мо издание). The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

Kostiainen, R., Kotiaho, T., Kuuranne, T., Auriola, S. (2003). Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom.* 38(4):357-372.

Ma, S., Chowdhury, S.K., Alton, K.B. (2006). Application of mass spectrometry for metabolite identification. *Curr Drug Metab.* 7(5):503-523.

Roškar, R., Trdan Lušin T. (2012). Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples. In: *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis.* (Edited by, de Azevedo Calderon L). In Tech, pp. 79-126.

Wolf, T.F. (Ed.) (1999). *Handbook of Drug Metabolism.* Marcel Dekker, Inc.

Zhang, D., Zhu, M., Humphreys, W.G. (Ed.) (2008). *Drug Metabolism in Drug Design and Development.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

**ISBN 978-608-244-197-9**