

Effekt av IL-6 og IFN- α 2b på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler

Tor Arne Hotvedt



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Effekt av IL-6 og IFN- α 2b på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler

Masteroppgave i farmakologi for graden *Master i farmasi*

Oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

Universitetet i Oslo



Veiledere:

Hege Christensen

Anders Åsberg

Espen Molden

Tor Arne Hotvedt

Mai 2012

© Tor Arne Hotvedt

2012

Effekt av IL-6 og IFN- α 2b på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler

Tor Arne Hotvedt

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Hege Christensen, professor Anders Åsberg og professor Espen Molden.

Jeg vil rette en stor takk til mine hovedveiledere Hege Christensen og Anders Åsberg for sin evne til å engasjere, for gode diskusjoner, og god hjelp under skrivearbeidet. Dette har bidratt til at jeg har hatt et fabelaktig år hos dere. Takk til Espen Molden for interessante innspill underveis.

Tusen takk til overingeniør Siri Johannesen for god opplæring og hjelp til det praktiske arbeidet, og til overingeniør Beata Mohebi for å ha tatt godt vare på THLE-cellene ved anledninger hvor vi ikke har vært tilstede.

Stor takk til medstudent Philip Fleischer for utveksling av erfaringer, samarbeid med forsøksplanlegging og musikk, prat og latter underveis. Takk til stipendiat Ida Robertsen for hyggelig prat i tide og utide, og for at du i fremtiden etter all sannsynlighet oppkaller en metode etter meg (torahot-metoden). Samtidig rettes en takk til resten av gjengen på kontor 410.

Til slutt ønsker jeg å takke alle på Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for et hyggelig år (jeg har aldri før spist så mye kaker på et så kort tidsintervall), og samtlige i Kull 2012 for fem uforglemmelige år på Farmasøytisk Institutt.

Blindern, Oslo 14. mai 2012

Tor Arne Hotvedt

Innholdsfortegnelse

FORORD	4
FORKORTELSER	8
SAMMENDRAG	10
1 INNLEDNING	12
1.1 FARMAKOKINETIKK	12
1.2 CYTOKROM P450 (CYP)-ENZYSYSTEMET	12
1.3 CYP3A-SUBFAMILIEN	13
1.4 CYTOKINER	14
<i>1.4.1 Cytokiners effekt på CYP-enzymmer</i>	<i>15</i>
<i>1.4.1.1 Effekt av IL-6 på CYP3A4-aktivitet</i>	<i>18</i>
<i>1.4.1.2 Effekt av IFN-α2b på CYP-enzymaktivitet</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2 CYP-medierte terapeutisk protein – legemiddelinteraksjoner</i>	<i>21</i>
1.5 MIDAZOLAM SOM CYP3A4-MODELLSUBSTRAT	22
1.6 IN VITRO-MODELLER FOR METABOLISMESTUDIER	24
<i>1.6.1 Transfekterte humane leverepitel (THLE)-celler</i>	<i>24</i>
1.7 ENZYMKINETIKK	25
1.8 HENSIKTEN MED OPPGAVEN	28
2. MATERIALER OG METODER	29
2.1 METABOLISMESTUDIER	29
<i>2.1.1 Dyrkning av THLE-celler</i>	<i>29</i>
<i>2.1.2 Høsting av celler</i>	<i>29</i>
<i>2.1.3 Metabolismestudier i THLE-celler</i>	<i>30</i>
<i>2.1.4 Forsøk med IFN-α2b i insektmikrosomer</i>	<i>32</i>
2.2 LC-MS-APPARATUR OG BETINGELSER	33

2.2.1	<i>Standardkurver</i>	33
2.2.2	<i>Analyse av prøver med LC-MS</i>	33
2.3	BEARBEIDELSE AV DATA	34
3.	RESULTATER	35
3.1	UTVIKLING AV METABOLISMEMODELL I THLE-CELLER	35
3.1.1	<i>Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon og tid</i>	35
3.1.2	<i>Basalaktivitet</i>	37
3.1.3	<i>Standardkurver</i>	37
3.2	EFFEKT AV CYTOKINER PÅ CYP3A4-AKTIVITET	38
	INTERLEUKIN-6 (IL-6)	38
	INTERFERON-A2B (IFN-A2B)	40
3.3	EFFEKT AV IFN-A2B PÅ METABOLISME I MIKROSOMER	42
4.	DISKUSJON	43
4.1	METODOLOGISKE BETRAKTNINGER	43
4.2	METABOLISMESTUDIER	44
	INTERLEUKIN-6 (IL-6)	44
	INTERFERON-A2B (IFN-A2B)	46
4.3	MIDAZOLAM SOM CYP3A4-MODELLSUBSTRAT	48
4.4	FREMTIDSUTSIKTER	48
5.	KONKLUSJON	49
6.	LITTERATURLISTE	50
7.	APPENDIKS	55
	<i>Utstyr</i>	55
	<i>Kjemikalier</i>	56
	<i>Løsninger for THLE-celler</i>	57

<i>Løsninger for LC-MS</i>	58
<i>Poster NSFT Vintermøte, Beitostølen 2012</i>	59

Forkortelser

1'-OH MDZ	1-hydroxymidazolam
4-OH MDZ	4-hydroxymidazolam
ACN	Acetonitril
APR	Akutt fase respons
AUC	Areal under plasmakonsentrasjonskurve
Caco-2	Humane adenokarsinom celler
CAR	Constitutive androstane receptor
CNS	Sentralnervesystemet (Central nervous system)
CRP	C-reaktivt protein
CYP	Cytokrom P450
DIA	Diazepam
EC ₅₀	Halve maksimale effektive konsentrasjon
EDTA	Etylen diamintetraeddiksyre (Ethylene diaminetetraacetic acid)
ED ₅₀	Effektiv dose for 50 % av pasientene som blir behandlet
E _{min}	Minimal respons
ER	Endoplasmatiske retikulum
FCS	Føtalt kalveserum (Fetal calf serum)
FDA	Food and Drug Administration
FMO	Flavin monooksygenase
g	Sentrifugeringseffekt (også kalt Relative Centrifugal Force, RCF)
GST	Glutation S-transferase
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HLM	Humane levermikrosomer
IL	Interleukin
IFN	Interferon
ISGF-3	IFN-stimulerende genfaktor 3
ISRE	IFN-stimulerende responselement
JAK	Janus kinase
KCl	Kaliumklorid
K _m	Michaelis-Menten konstanten
LC-MS	Væskeskromatografi med massespektrometrisk deteksjon

LPS	Lipopolysakkarid
MeOH	Metanol
ml	Milliliter
min	Minutter
NF- κ B	Nukleær faktor- κ B
ng	Nanogram
NO	Nitrogenoksid
NOS	Nitrogenoksid syntetase
pg	Pikogram
PPAR	Peroksisom proliferatoraktivert reseptor
PBMC	Mononukleære celler fra perifert blod
PBS	Fosfat-bufret saltvann (Phosphate Buffered Saline)
P-gp	P-glykoprotein (P for permeabilitet)
PXR	Pregnan X reseptor
RA	Revmatoid artritt (leddgikt)
rpm	Omdreiningstall (revolutions per minute)
RXR α	Retinoid X reseptor α
SAA	Serum amyloid A
SEM	Standardfeil til gjennomsnitt
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SULT	Sulfotransferase
SV-40	Simian Virus 40
SV-40 T antigen	Simian Virus-40 tumor antigen
THLE-celler	Transfekterte humane leverepitel-celler
TNF	Tumor nekrose faktor
TYK2	Tyrosin kinase 2
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
UGT	Uridindifosfat-glukuronosyltransferase
V	Reaksjonshastighet
V _{max}	Maksimal reaksjonshastighet for et enzym

Sammendrag

Bakgrunn:

Flere kliniske studier indikerer at inflammatoriske tilstander hos pasienter kan endre farmakokinetikken til mange ulike legemidler. Det er vist nedsatt clearance og økt systemisk eksponering av legemidler i forbindelse med infeksjoner, vevsskade, operasjoner, kreft og autoimmune sykdommer.

Interferoner, interleukin-1 og -6, samt TNF- α ser ut til å være potensielle mediatorer i denne sammenheng, og noen av disse cytokinene er vist å nedregulere ekspresjon og aktivitet av CYP-enzymmer *in vitro*. Immunologisk respons hos pasienter antas derfor å være en av årsakene til individuell variasjon i evnen til å metabolisere legemidler, men det er mye ukjent vedrørende effekten av spesifikke cytokiner på de enkelte CYP-enzymene.

Hensikten med denne studien var å 1) etablere en cellemodell for å studere CYP3A4-metabolisme og 2) studere effekten av interleukin-6 (IL-6) og interferon- α 2b (IFN- α 2b) på CYP3A4-mediert metabolisme *in vitro*.

Metode:

Det ble etablert en fullcellemodell for undersøkelse av regulering av CYP3A4-metabolisme med midazolam (MDZ) som probe. Transfekterte humane leverepitelceller (THLE) som spesifikt uttrykker CYP3A4 ble dyrket i Corning[®] CellBIND[®]-brett. IL-6 ble tilsatt 48, 72 og 96 timer før forsøksdagen, mens IFN- α 2b ble tilsatt 24, 48 og 72 timer før forsøksdagen. CYP3A4-proben MDZ (50 μ M) ble tilsatt i brønnene på forsøksdagen og cellene ble inkubert ved 37 °C i 15 minutter. Metabolitten 4-OH MDZ ble analysert med en validert LC-MS-metode, som et mål på metabolismeaktiviteten.

Resultat:

Midazolam viste en konsentrasjon- og tidsavhengig metabolisme via CYP3A4 til 4-OH MDZ i THLE-celler, og denne viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk. Det var imidlertid vanskeligheter med å detektere 1'-OH MDZ med LC-MS i denne cellemodellen. Forsøk med IL-6 og IFN- α 2b viste ingen klar effekt på CYP3A4-aktiviteten, men responsen på disse cytokinene viste en stor variasjon i denne cellemodellen.

Konklusjon:

I denne oppgaven ble det etablert en metode for å studere CYP3A4-metabolisme i THLE-celler ved bruk av midazolam som probe. Årsaken til de minimale og høyt varierende effektene av IL-6 og IFN- α 2b i denne oppgaven, kan være at THLE-celler ikke er optimale til studier av regulering av CYP3A4-aktivitet eller at midazolam ikke er ideell som probe for å studere cytokiners effekt på CYP3A4-aktivitet, siden det har blitt postulert at dette virkestoffet kan ha effekt på den viktige transkripsjonsfaktoren NF- κ B.

Det kreves ytterligere forskning på cytokiner og effekt på CYP-enzymmer i årene fremover, spesielt med tanke på at utvikling av nye terapeutiske proteiner er et stort satsingsområde i farmasøytisk industri.

1 Innledning

1.1 Farmakokinetikk

Sammenhengen mellom en gitt dose av et legemiddel og konsentrasjonen denne oppnår i kroppen (plasma og vev) er et resultat av absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon, og kan beskrives av farmakokinetiske formler og modeller [1]. Farmakokinetikk kan på en forenklet måte defineres som hva kroppen gjør med et legemiddel, i motsetning til farmakodynamikk som defineres som hva legemidlet gjør med kroppen [2].

Renal ekskresjon og hepatisk metabolisme er de dominerende eliminasjonsveiene for legemidler [1]. Metaboliserende enzymer finnes i de fleste vev i kroppen, med høyest nivå i lever og den gastrointestinale trakt (spesielt tynntarm og tykktarm) [3]. Leveren uttrykker et stort antall legemiddelmetaboliserende enzymer, inkludert cytokrom P450-enzymmer (CYP-enzymmer), flavin monooxygenase (FMO), uridindifosfat-glukuronosyltransferaser (UGT), sulfotransferase (SULT) og glutation S-transferase (GST) [4]. Metabolisme av legemidler skjer i prinsippet i to trinn. Disse deles inn i fase 1-reaksjoner, hvor enzymer utfører oksidasjon, reduksjon eller hydrolytiske reaksjoner, og fase 2-reaksjoner hvor enzymene videre danner et konjugat av fase 1-produktet [3]. Fase 1-reaksjoner resulterer vanligvis i biologisk inaktivering av legemidlet, bortsett fra i tilfeller der legemidlet har aktive metabolitter eller der legemidlet er et prodrug og blir bioaktivert til en aktiv substans [5]. I fase 2-reaksjoner produseres det metabolitter med forbedret vannløselighet og økt molekylvekt, som dermed øker eliminasjonen fra kroppsvev. Denne konverteringen av hydrofobe stoffer til hydrofile derivater fører til at legemidlets aktive eller inaktive metabolitter lettere kan skilles ut gjennom urin eller galle [3].

1.2 Cytokrom P450 (CYP)-enzymssystemet

CYP-enzymmer er en superfamilie av heme-inneholdende enzymer som er ansvarlig for fase-1 metabolisme av legemidler og andre forbindelser. Navnet cytokrom P450 er avledet fra spektroskopisk observasjon. Når et legemiddel er bundet til det reduserte heme-enzymet kan karbonmonoksid binde til komplekset og absorbere lys ved den karakteristiske bølgelengden

450 nanometer. CYP-enzymene er i cellene lokalisert i fosfolipid-bilaget i det endoplasmatiske retikulum (ER), der mesteparten befinner seg på den cytosoliske overflaten av ER.

Mer enn 57 aktive humane CYP-gener er kjent. Til tross for det store antallet av CYP-gener og enzymer, ser det ut til at kun CYP1, CYP2 og CYP3-subfamiliene av enzymer har en viktig rolle i legemiddelmetabolisme. Hos mennesker er det 12 CYP-enzymene (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 og 3A5) som er kjent for å være viktige i metabolisme av legemidler [3].

Metabolisme av legemidler utviser omfattende interindividuell variasjon. Faktorer som medvirker til variasjon av CYP-aktivitet inkluderer blant annet genetisk polymorfisme, mat og drikke, miljø, fysiologisk status og sykdom, samt inntak av legemidler som hemmer eller øker enkelte enzymeres aktivitet [3]. Personer som har inaktiverende mutasjoner i begge genene som koder for det respektive enzym, såkalte langsomme omsettere, trenger lavere doser av de legemidlene som brytes ned av det aktuelle enzymet. Personer med ett mutert og ett normalt gen, såkalt heterozygot raske omsettere, vil bryte ned legemidler via det aktuelle enzymet med en hastighet som er innenfor normalvariasjonen, men kan være noe langsommere enn gjennomsnittet. Personer med to gener som koder for aktivt enzym, såkalt homozygot raske omsettere, vil bryte ned legemidler via det aktuelle enzymet med normal hastighet [6]. For CYP2D6, men ikke for andre enzymer, er det vist at noen få prosent i befolkningen har mer enn to normale genkopier. Disse individene, såkalte ultrarask omsettere, vil ha store mengder av dette enzymet og vil bryte ned legemidler via CYP2D6 med svært høy hastighet. Det er ikke uvanlig med en variasjon i enzymaktivitet på 10 - 20 ganger mellom ulike individer. Dette betyr at for å oppnå samme konsentrasjon av legemidlet i plasma, må dosen hos ultrarask omsettere være 10 - 20 ganger høyere enn hos langsomme omsettere [6].

1.3 CYP3A-subfamilien

CYP3A-subfamilien er de CYP-enzymene som er høyest uttrykt i lever og tynntarm. Disse enzymene utviser svært bred substratspesifisitet og har derfor evne til å metabolisere et stort utvalg av strukturelt forskjellige forbindelser. Det er sannsynlig at CYP3A-enzymene er

involvert i metabolismen av mer enn 50 % av legemidlene som brukes i dag [7]. Det finnes fire CYP3A-isoenzymmer (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43), men CYP3A-aktivitet ser ut til å være summen av de tre isoenzymene CYP3A4, CYP3A5 og CYP3A7. CYP3A43 er uttrykt i svært små mengder, og dets relevans for legemiddelmetabolisme er hittil ukjent [8].

CYP3A4 er ansett for å være det mest uttrykte og klinisk viktigste enzymet som er involvert i legemiddelmetabolisme, og er i tillegg involvert i metabolismen av flere endogene forbindelser, blant annet steroidhormoner. Under fosterstadiet er CYP3A7 det dominerende CYP3A- enzymet, men dets ekspresjon faller etter fødsel samtidig med en økning i CYP3A4- ekspresjon, som blir den dominerende isoformen hos voksne [8]. Også andre enzymer i CYP3A-familien kan metabolisere de samme legemidlene som CYP3A4. Det viktigste av disse er CYP3A5. Hos de fleste kauasiere spiller dette enzymet en liten rolle for den totale CYP3A-aktiviteten, ettersom mer enn 80 % av befolkningen har mutasjoner som medfører et inaktivt CYP3A5 [9].

For enkelte CYP-enzymmer, som blant annet CYP1A2, er det ikke identifisert mutasjoner som har klinisk betydning. En betydelig variasjon i aktiviteten er det likevel også av dette enzymet; for eksempel inneholder tobakksrøyk stoffer som øker aktiviteten til CYP1A2 [6]. Ekspresjon av CYP3A4, og dermed enzyemmengde, varierer også i betydelig grad mellom ulike individer. Forskjellen i enzymaktivitet mellom individer med lavest og høyest CYP3A4-aktivitet er mer enn ti ganger [9]. Studier omkring årsaker til at nivå av CYP3A4 varierer i så vesentlig grad har vært mangelfulle, og det har ikke før i den senere tid blitt påvist genetiske mutasjoner som medfører endret aktivitet av dette enzymet. Nylig har det blitt påvist et SNP (single nucleotide polymorphism) i intron 6 (CYP3A4*22), som har blitt koblet til redusert hepatisk ekspresjon og aktivitet av CYP3A4 [10]. Denne polymorfismen har et potensiale til å brukes som biomarkør til å forutsi effekt av CYP3A4-metaboliserte legemidler [11].

1.4 Cytokiner

Cytokin er et begrep med gresk opphav som betyr "å sette celler i bevegelse". Cytokiner er intercellulære signalpeptider som kan virke autokrint (påvirker seg selv), parakrint (sender ut

signaler mellom celler) og endokrint (går via blodet) [12]. Disse produseres av monocytter, makrofager og lymfocytter, noe som forklarer hvorfor disse molekylene ofte omtales som inflammatoriske mediatorer. Til tross for dette produseres cytokiner også av en rekke andre typer celler, som blant annet endotelceller og fibroblaster. Effektene av cytokiner er svært varierte; for eksempel promoterer noen cytokiner cellevekst, mens andre induserer celledød. Noen cytokiner stimulerer inflammasjon, mens andre undertrykker den [13]. Cytokiner dannes normalt ikke konstitutivt, men ekspresjon og sekresjon oppstår som respons på for eksempel infeksjoner eller skader [14].

Cytokiner kan deles inn i grupper kategorisert etter hvilke funksjoner disse har (Tabell 1). Den største gruppen er de immunmodulerende forbindelsene som dannes av blant annet makrofager, NK-celler og lymfocytter. Tumor nekrose faktor- α (TNF- α), interferoner (IFN- α , - β og - γ) og interleukiner (IL) tilhører denne gruppen [13]. Andre grupper er chemokiner, peptidvekstfaktorer og fibrogeneseregulatorer. Et cytokin har ofte flere funksjoner, og kan av den grunn befinne seg i flere grupper (Tabell 1).

Tabell 1: Cytokiner kategorisert i grupper etter tilhørighet

Immunmodulerende forbindelser	TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, -5, IL-4, -13, IL-6, IL-10, IL-12
Chemokiner	IL-8, PF-4, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES
Peptidvekstfaktorer	TGF- α , - β , HGF, HBGF-I, -II, IGF-I, -II, PDGF, TNF- α , IL-6, IL-1
Fibrogeneseregulatorer	TGF- β 1, IL-1, IL-4, TNF, IFN- γ , IL-10, PDGF, MCP-1

1.4.1 Cytokiners effekt på CYP-enzymmer

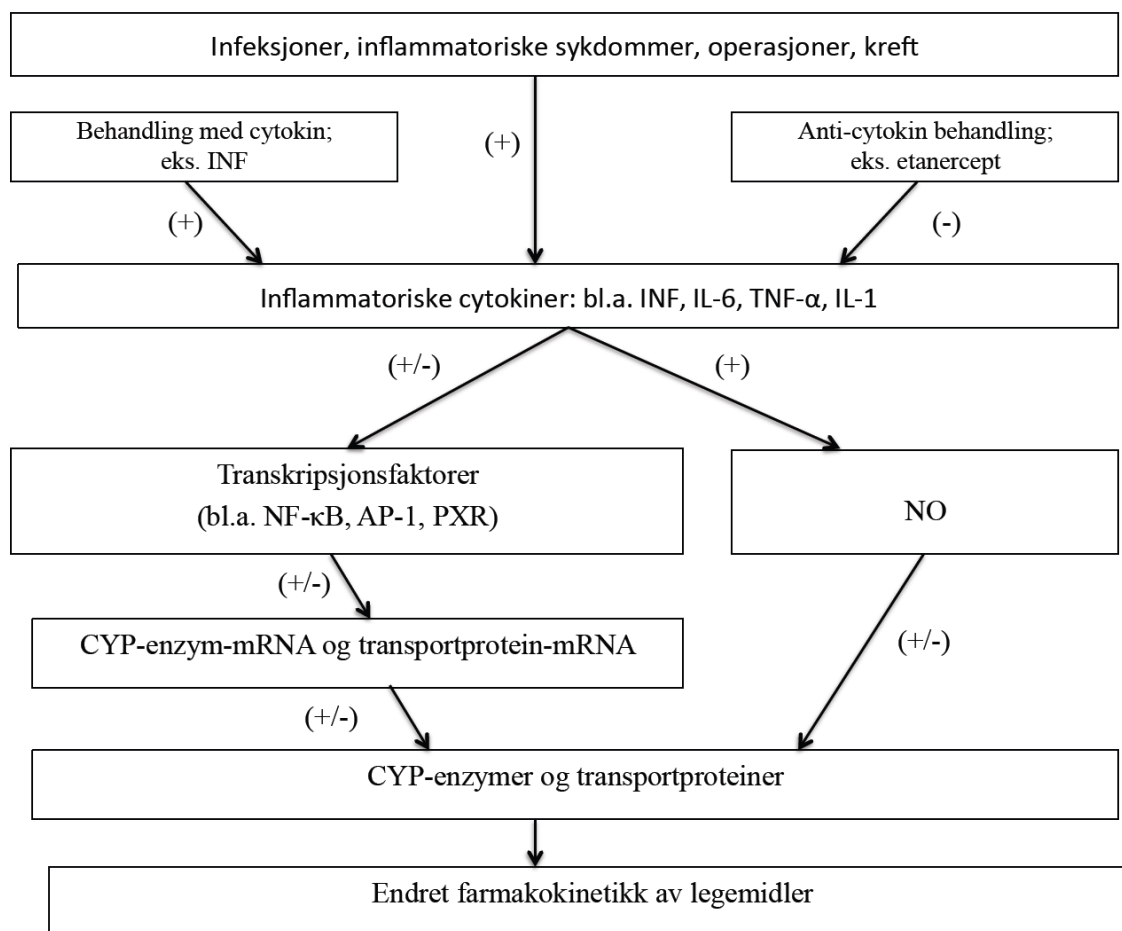
Det innledende kliniske arbeidet relatert til cytokiner og effekt på legemiddelmetabolisme ble utført i 1970-årene av flere forskningsgrupper [15, 16]. Her ble det beskrevet

legemiddel-cytokin-interaksjoner som førte til redusert hepatisk metabolisme av legemidler via CYP-enzymmer, mens det i dag er etablert at også transportproteiner blir påvirket av cytokiner [17]. Transportproteiner er membranproteiner som transporterer legemidler inn i celler og ut av celler, og det er stadig økende interesse for betydningen disse har for individuelle forskjeller i eksponering av legemidler. Av de ATP-bindende kassett (ABC)-transportørene som medierer transport av legemidler ut av celler (efflux), er P-glykoprotein (P-gp, også kjent som ABCB1) viktig [18]. Denne pumpen er lokalisert blant annet i lever, nyrer og tarmkanalen der den beskytter hele kroppen mot fremmedstoffer, og i blod-hjernebarrieren der den forhindrer akkumulering av legemiddel i sentralnervesystemet (CNS) [14]. Det har blitt vist at cytokiner utøver en effekt på denne pumpen. Inkubering av Caco-2-celler med cytokinet IL-2, har vist å redusere ekspresjon og aktivitet av P-gp [19].

Det er kjent at inflammasjon og infeksjon kan føre til nedregulering av aktivitet og ekspresjon av CYP-enzymmer involvert i legemiddelmetabolisme [4, 20]. Dette kan resultere i økt plasmanivå av legemiddel, og dermed en økning i bivirkninger og potensielt toksisitet. En slik nedregulering av CYP-aktivitet kan på den annen side beskytte mot toksisitet fra forbindelser som blir bioaktivert av disse enzymene. Fra studier som har blitt utført har man sett at infeksjon eller inflammasjon kan redusere metabolsk clearance av CYP-substrater med 20 - 70 % [4]. Klinisk relevante konsekvenser av disse forandringene vil være størst når store forandringer i clearance oppstår, eller med legemidler med smalt terapeutisk vindu.

Cytokiner påvirker forskjellige CYP-enzymmer, og det er generelt god korrelasjon mellom deres *in vivo* og *in vitro*-effekter [4]. Spesifisitet av CYP-påvirkningen kan være forskjellig i forskjellige modeller av infeksjon og inflammasjon. For å reflektere kliniske situasjoner trenger man modeller som innehar alle tilstedeværende faktorer. Regulering av CYP-ekspresjon i inflammasjon og infeksjon har blitt tilskrevet effektene av de inflammatoriske cytokinene IL-1 β , IL-6, TNF- α og interferon- α eller - γ . I de fleste tilfeller er nedregulering av CYP-aktivitet og protein-nivå ledsaget eller innledet av en nedgang i de respektive CYP-enzymers mRNA. Endring i aktivitet eller ekspresjon av hepatiske transkripsjonsfaktorer under en akutt fase respons (APR), mediert hovedsakelig av inflammatoriske cytokiner, er godt dokumentert [4]. Mekanismene for transkripsjonell nedregulering av CYP-enzymmer er komplekse og varierte, og forskjellige mekanismer er sannsynlig å være avhengig av det spesifikke gen og inflammatoriske stimuli, samt tidspunktet i responsen [4]. De

inflammatoriske cytokinene binder seg til overflatereseptorer og aktiverer en intracellulær signalkaskade som enten øker eller reduserer transkripsjonsfaktorer som igjen regulerer ekspresjon av CYP-enzymmer og transportproteiner (Figur 1.1) [21]. En annen postulert mekanisme involverer produksjon av nitrogenoksid (NO) via nitrogenoksid-syntetase (NOS), som påvirker legemiddelmetabolisme og transport av legemiddel inn og ut av celler [21, 22].



Figur 1.1: Innvirkning av cytokiner på CYP-enzymmer og transportproteiner ved inflammatoriske tilstander. Modifisert fra [14].

Transportproteinet P-gp og CYP-enzymet 3A4 medvirker begge til å redusere systemisk tilgjengelighet av en rekke legemidler, og disse proteinene har stor grad av substratoverlapping [23]. Siden P-gp-ekspresjon også reguleres av cytokiner, kan man vente å få en kombinert effekt på CYP3A4 og P-gp [24].

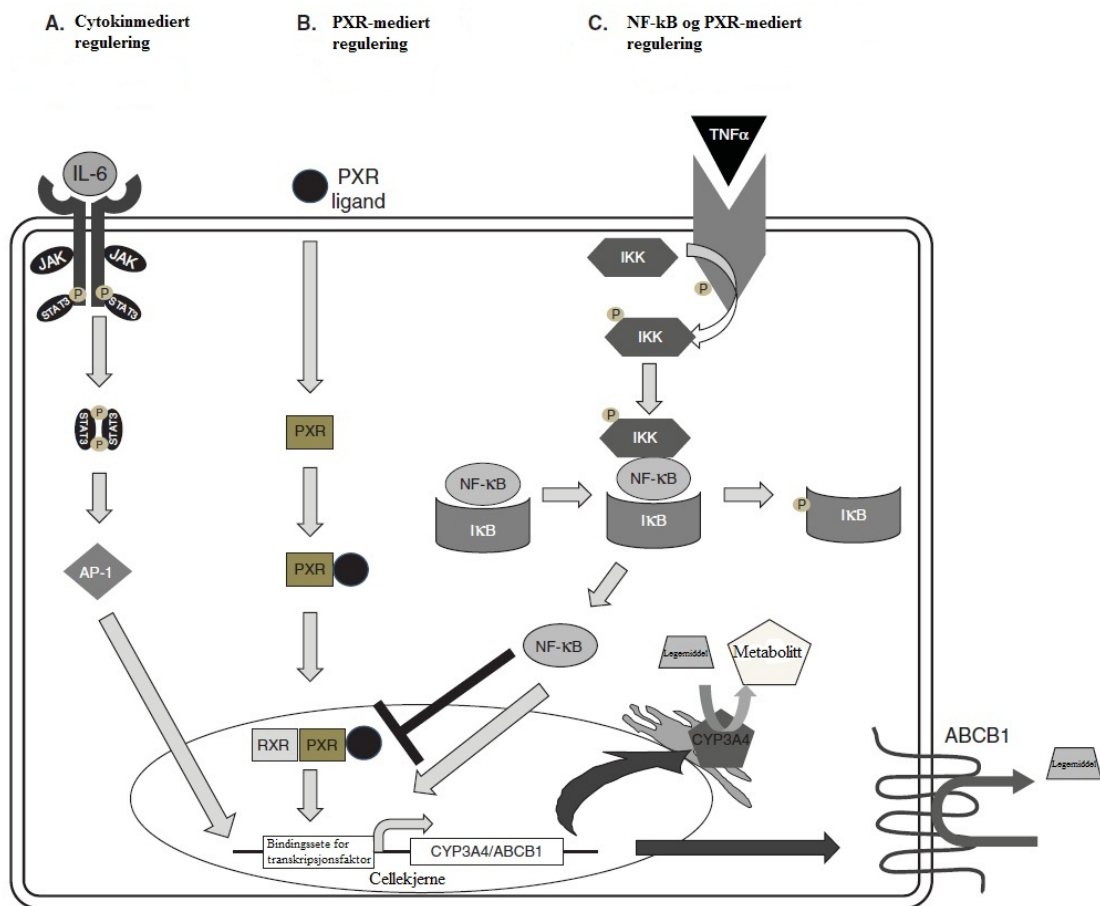
Selv om enkelte cytokiner er viktigere enn andre når det gjelder påvirkning av CYP-enzymmer og transportproteiner, er det mest sannsynlig den samlede virkningen av et stort antall cytokiner som til slutt bestemmer effekten et legemiddel vil ha på kroppen [14].

1.4.1.1 Effekt av IL-6 på CYP3A4-aktivitet

Interleukin-6 (IL-6) er et pleiotropisk cytokin som påvirker den antigen-spesifikke immunresponsen, og er hovedmediatoren for APR i inflammasjon. Syntese av IL-6 har blitt rapportert i celler fra forskjellige vev, men hovedsakelig forløper produksjon *in vivo* sannsynligvis i stimulerte monocytter, fibroblaster og endotelceller [25]. Ved endt differensiering fra monocytter, blir det dannet spesialiserte lever-spesifikke makrofager kalt Kupffer-celler [26]. Disse utskiller IL-6 som binder seg til sin reseptor IL-6R (CD126) som et løselig eller membranbundet protein. IL-6/IL-6R-komplekset må deretter binde seg til et membranprotein kalt gp130 for å utløse signaloverføring. IL-6 er som nevnt et pleiotropisk cytokin, og kan dermed utvise en rekke effekter. Dette inkluderer mediering av komponenter i APR, hepatisk regenerering, samt antiapoptotiske og antinekrotiske effekter [27].

Flere artikler har beskrevet IL-6 sin evne til å nedregulere CYP3A4-aktivitet, både *in vitro* [21, 27] og *in vivo* [28, 29]. Mekanismen bak denne nedreguleringen er tilsynelatende på transkripsjonelt nivå [27]. En studie utført av Yang *et al.* (2010) viser at pregnan X reseptor (PXR) er nødvendig for IL-6-mediert undertrykkelse av CYP3A4-ekspresjon i humane hepatocytter. PXR medierer transkripsjonell aktivering av CYP3A4 ved å binde seg til retinoid X reseptor α (RXR α) og danne en heterodimer. Proinflammatoriske cytokiner, som blant annet TNF- α og IL-6, øker produksjonen av nukleær faktor- κ B (NF- κ B). Når NF- κ B translokerer inn til cellekjernen og blir kombinert med RXR α , forstyrres dette dannelsen av heterodimeren PXR-RXR α . Dermed oppstår det en undertrykkelse av transkripsjon av CYP3A4-enzymmer [30]. Denne mekanismen gjelder også for cytokinet TNF- α [31]. En skjematisk fremstilling er gitt i Figur 1.2 C.

En annen mulig mekanisme for IL-6 på regulering av CYP-enzymmer, representert i Figur 1.2 A, er interaksjon med transkripsjonsfaktorer som aktivator protein-1 (AP-1). IL-6R-komplekset aktiverer tyrosin kinasen JAK, som resulterer i fosforylering av «signal transducer and activator of transcription» (STAT)-proteiner, som deretter interagerer med AP-1 før denne translokerer inn til cellekjernen og regulerer ekspresjon av gener [31].

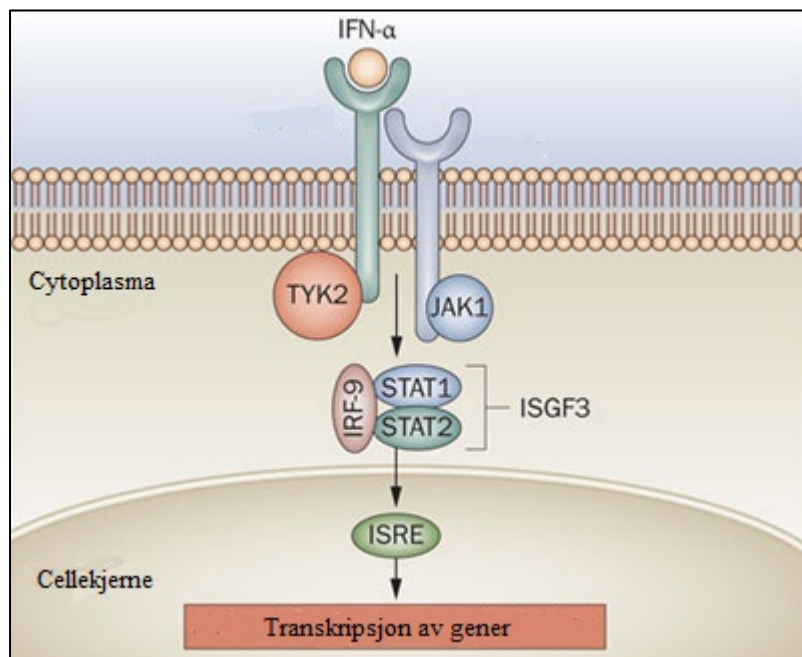


Figur 1.2: A. Cytokiner kan påvirke ekspresjon av gener som koder for CYP-enzymmer direkte via transkripsjonsfaktorer som aktivator protein-1 (AP-1). B. Induksjon av PXR-mediert regulering. En PXR-ligand (for eksempel rifampicin som er en CYP3A4-induser [32]) binder seg til PXR som deretter translokerer inn til cellekjernen og binder seg til RXR α og danner en heterodimer, som igjen binder responselementer oppstrøms (i forkant) av gener for legemiddelmetaboliserende enzymer og transportproteiner. C. TNF- α aktiverer NF- κ B som deretter translokerer inn til cellekjernen og aktiverer gener, samt interfererer med PXR-RXR α -komplekset. Figuren er modifisert fra [31].

1.4.1.2 Effekt av IFN- α 2b på CYP-enzymaktivitet

Interferon- α 2b (IFN- α 2b) ble godkjent av FDA i 1988 for behandling av AIDS-relatert Kaposis sarkom og hepatitt-infeksjoner, spesielt hepatitt C [33]. Dette cytokinet er et "Type-I"-interferon som i dag brukes i behandling av virale infeksjoner, kreft og autoimmune sykdommer [34, 35]. I dag er to subtyper av interferon- α markedsført: Interferon- α 2a (IFN- α 2a) og Interferon- α 2b (IFN- α 2b). Effekten av disse preparatene synes å være svært lik [36].

Flere studier har vist redusert ekspresjon av CYP-enzymmer i nærvær av IFN- α 2b, både *in vivo* [37] og *in vitro* [35]. Dette kan få betydning for blant annet dosering av immunsuppressive og antineoplastiske legemidler, som ofte har et smalt terapeutisk vindu. Dersom et slikt legemiddel, som for eksempel de antineoplastiske midlene vinblastin og metotreksat [38] eller det immunsuppressive virkestoffet ciklosporin A [39], kombineres med IFN- α 2b og eventuelt andre legemidler metabolisert av CYP3A4, kan dette derfor utsette pasienter for potensielt toksiske doser. Den spesifikke effekten IFN- α 2b har på CYP-enzymmer er imidlertid ennå ikke klarlagt, og det er også vist økning i CYP3A4-aktivitet *in vitro*, dog kan ikke studiene direkte sammenlignes da det er benyttet ulike cellemodeller [34, 35]. Det er samtidig vist at høydose IFN- α 2b-behandling ikke gir effekt på enkelte enzymer (CYP2E1), mens det for andre enzymer er vist betydelige effekter (CYP1A2; 60 % reduksjon i aktivitet) [37]. Det har blitt postulert at IFN- α reduserer CYP3A4-aktivitet ved å nedregulere CYP3A4-transkripsjon via JAK-STAT-signalveien (Figur 1.3) [35].



Figur 1.3: JAK-STAT-signalveien. *IFN- α binder seg til spesifikke reseptorer på celleoverflaten. Disse reseptorene er assosiert med JAK1 og tyrosin kinase 2 (TYK2) som aktiveres ved binding av IFN- α . Denne aktiveringen resulterer i fosforylering av STAT-proteinene. STAT-proteinene, sammen med interferon regulerende faktor-9 (IRF-9), danner et kompleks som kalles IFN-stimulerende genfaktor 3 (ISGF-3). Dette komplekset translokerer så inn til kjernen og binder seg til spesifikke DNA-sekvenser, som interferon-stimulerende responselement (ISRE), og dermed reguleres transkripsjonen. Figuren er modifisert fra [40].*

1.4.2 CYP-medierte terapeutisk protein – legemiddelinteraksjoner

Terapeutiske proteiner (TP) er biologiske produkter som produseres for farmasøytisk bruk, og inkluderer antistoffer, vekstfaktorer, cytokiner, enzymer og andre proteinprodukter som fusjonsproteiner og peptidhormoner. Utvikling av slike biologiske produkter er av de raskest økende satsingsområdene i farmasøytisk industri. Fordi terapeutiske proteiner ikke metaboliseres av CYP-enzymet, er den generelle oppfatningen at disse er fri for metabolismebaserte legemiddelinteraksjoner og at TP – legemiddelinteraksjoner ikke er klinisk relevante. Det har imidlertid nylig blitt kjent at slike biologiske produkter, sannsynligvis på grunn av evne til å endre immunologisk tilstand hos pasienter, kan påvirke farmakokinetikken til et stort antall legemidler, ved å påvirke CYP-medierte metabolisme

[24]. Et eksempel på en slik interaksjon er å finne i en studie av C. Schmitt *et al.* (2011), som undersøkte eksponering av simvastatin, et CYP3A4-substrat, på pasienter med revmatoid artritt (RA) [29]. Denne pasientgruppen har generelt et forhøyet nivå av IL-6, som i henhold til hypotesen over kan redusere CYP3A4-aktivitet, og risikerer dermed å få økt plasmakonsentrasjon av enkelte legemidler. I denne studien førte administrasjon av simvastatin til høyere eksponering av simvastatin hos pasienter med RA sammenlignet med friske frivillige. Pasientene ble deretter behandlet med tocilizumab, en IL-6-hemmer, som dermed kan som kan reversere IL-6-indusert suppresjon av CYP3A4-aktivitet. Eksponering av simvastatin ble signifikant redusert etter 1 (40 %) og 5 uker (60 %) etter tocilizumab-infusjon [29]. Det foreligger dessuten en studie som viste at inntak av CYP3A4-substratet verapamil hos pasienter med RA, resulterte i redusert clearance av dette legemidlet og dermed en betydelig økning i plasmakonsentrasjon [41]. Arealet under plasmakonsentrasjonskurven (AUC) for begge enantiomerene, (S)- og (R)-verapamil, var henholdsvis 4 og 3 ganger høyere hos pasienter med RA i forhold til kontrollgruppen med friske frivillige [41]. Disse observasjonene kan ha klinisk relevans for pasienter som tar legemidler som metaboliseres av CYP3A4, og som har et smalt terapeutisk vindu eller krever individuell dosejustering. Dagens veiledning fra Food and Drug Administration (FDA) for industrien angående legemiddelinteraksjon-studier er under revisjon og vil gi mer spesifikk veiledning til industri og utprøvere i vurderingen av TP – legemiddelinteraksjoner under utvikling av legemidler [42].

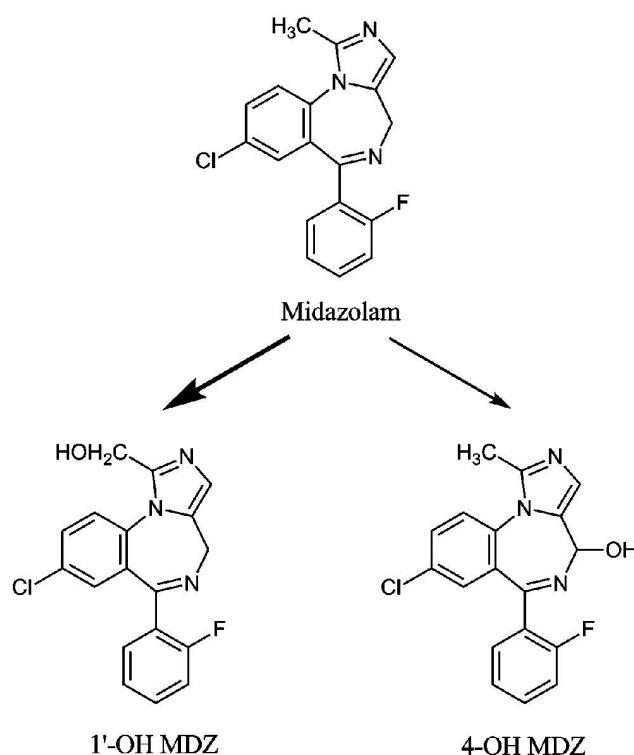
1.5 Midazolam som CYP3A4-modellsubstrat

Benzodiazepinet midazolam (MDZ) er et velkjent og validert CYP3A4-substrat som er mye brukt som probe for CYP3A4-aktivitet [43]. Midazolam brukes hovedsakelig intravenøst til anesthesiinnledning, og intravenøst, intramuskulært, rektalt eller peroralt til sedasjon og kupering av kramper [1]. Den korte halveringstiden på rundt 2 timer gir mulighet for estimering av AUC og andre lett målbare farmakokinetiske endepunkter med prøvetaking over en begrenset tidsperiode [43].

Midazolam metaboliseres nesten utelukkende av CYP3A4/3A5, og er foretrukket som CYP3A-modellsubstrat av blant andre FDA i USA [43]. *In vitro*-teknologi brukes ofte for å

karakterisere metabolismen av legemiddelsubstanser og deres metabolitter, og denne informasjonen kan brukes videre til å anslå metabolsk clearance og potensielle legemiddelinteraksjoner *in vivo* [44].

Midazolam metaboliseres hovedsakelig til metabolitten 1'-hydroxymidazolam (1'-OH MDZ) og en sekundær metabolitt, 4-hydroxymidazolam (4-OH MDZ) [44] (Figur 1.4). Et annet ofte brukt navn på hovedmetabolitten 1'-OH MDZ, er alfa-hydroxymidazolam [45].



Figur 1.4 Kjemisk struktur og metabolismeveier av midazolam til hovedmetabolitten 1'-OH MDZ og sekundærmetabolitten 4-OH MDZ. Figuren er hentet fra [44].

Midazolam er et derivat av imidazobenzodiazepingruppen. Den frie basen er en lipofil forbindelse med lav vannløselighet. Det basiske nitrogenatomet i posisjon 2 i imidazobenzodiazepin-ringen utgjør den aktive delen i midazolam som danner vannløselige salter med syrer [45]. Både MDZ og hovedmetabolitten 1'-OH MDZ er farmakologisk aktive [46].

Midazolam har en lav til intermediær hepatisk ekstraksjonsratio (0,3-0,5) [47], som betyr at clearance i større grad er avhengig av CYP-enzymaktivitet og grad av proteinbinding, enn

hepatisk blodflow som er den hastighetsbestemmende faktoren for legemidler med høy ekstraksjonsratio [48].

1.6 *In vitro*-modeller for metabolismestudier

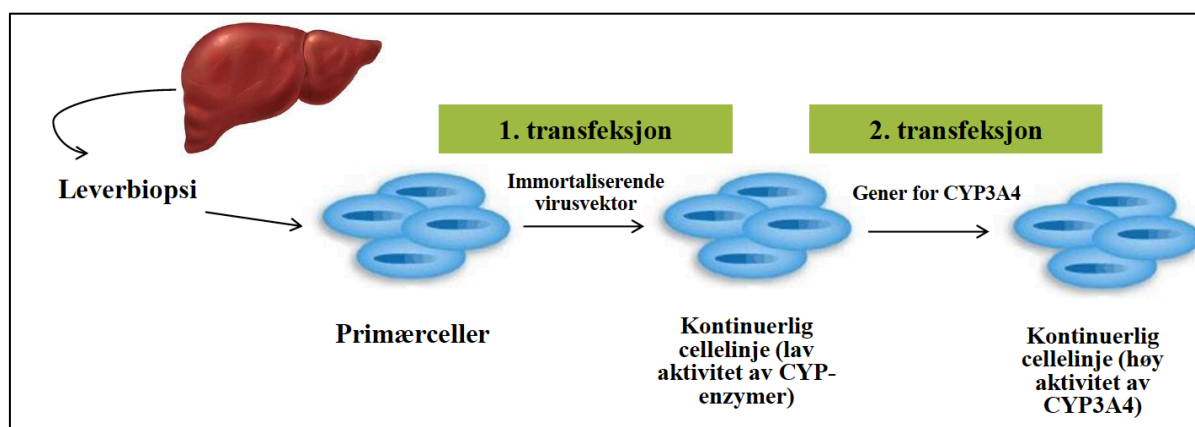
Leveren er som nevnt tidligere spesielt viktig når det gjelder biotransformasjon av legemidler. Ideelt sett bør derfor en *in vitro*-modell for biotransformasjon av legemidler så nøyaktig som mulig etterligne biotransformasjonen som foregår i lever *in vivo*.

Flere humane *in vitro* levermodeller har blitt utviklet de siste tiårene, blant annet mikrosomer og primære hepatocytter. Humane levermikrosomer (HLM) og rekombinante mikrosomer er fortsatt de mest brukte *in vitro*-modellene, blant annet grunnet den store tilgjengeligheten og sin enkelhet i bruk. Det som derimot taler for bruk av cellekulturer fremfor mikrosomer, er at disse utgjør et mer reelt bilde av virkeligheten ved å ha et komplett sett av opptaksmekanismer, metabolisme- og eliminasjonsveier [49]. I mikrosomer eksponeres legemidler maksimalt for enzymene, mens i intakte celler er både transport- og metabolismeprosessene ivaretatt [50]. Normale humane levervev og hepatocytter i kultur er verdifulle modeller for å studere legemiddelmetabolisme og toksisitet, men de har en begrenset levetid *in vitro* og er ikke alltid like lett tilgjengelige [51]. Cellekulturer av hepatocytter er samtidig underlagt et gradvis tap av funksjoner, da spesielt ekspresjon av CYP-enzymene. Dette tapet er forskjellig for de spesifikke CYP-isoformene; CYP3A4 mister sin aktivitet etter et par dager i kultur, mens enzymene CYP1A2 og CYP2C9 forblir nesten upåvirket [52]. En hepatisk cellelinje som er et alternativ til humane primære hepatocytter, er transfekterte humane leverepitel (THLE)-celler (Avsnitt 1.6.1). Et annet potensielt alternativ er HepaRG-celler (avledet fra immortaliserte hepatomaceller), som beholder de fleste leverfunksjonene, og i kultur kan uttrykke tilsvarende enzymaktivitet [53].

1.6.1 Transfekteerte humane leverepitel (THLE)-celler

Livstiden til humane leverepitelceller kan økes signifikant eller immortaliseres ved transfeksjon av Simian Virus-40 tumor antigen (SV-40 T antigen) ved å benytte et plasmid som inneholder Simian Virus-40 (SV-40) som vektor. Disse cellene kalles transfekteerte humane leverepitel (THLE)- celler [51]. Aktivitet av de fleste fase-2-enzymene er bevart i

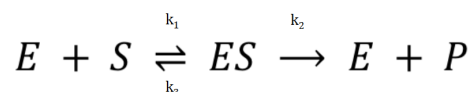
THLE- celler, men ekspresjon av fase-1-enzym er redusert. Disse cellene er av den grunn spesielt egnet som modell for re-ekspresjon av individuelle humane CYP450-gener. Transfeksjon av disse cellene med gener for spesifikke CYP-enzym gir dermed mulighet til å studere enzymkinetiske parametere for ett enkelt CYP-enzym. Cellelinjen T5-3A4 har vist lever-lignende uttrykk av CYP3A4 og et tilsvarende nivå av katalytisk aktivitet [54]. THLE-cellene har gjennomgått over hundre populasjonsdoblinger (passasjer) uten endringer i egenskaper [51]. En klar fordel med intakte celler er som nevnt at dette miljøet i større grad gjenspeiler det fysiologiske miljøet. Dette er spesielt viktig ved *in vitro-in vivo* ekstrapolering av legemiddelmetabolisme. En begrensning ved bruk av intakte celler derimot, er at metabolisme som blir observert ikke bare reflekterer den katalytiske aktiviteten til CYP3A4, men også andre prosesser som blant annet transport av legemiddel inn i cellen [50].



Figur 1.5: Transfeksjonsprosessen for THLE-celler som resulterer i celleklonen T5-3A4.

1.7 Enzymkinetikk

Enzymer er biologiske katalysatorer som øker hastigheten til biokjemiske reaksjoner, og den enkleste enzymatiske reaksjonen kan beskrives ved ligningen,



(Ligning 1)

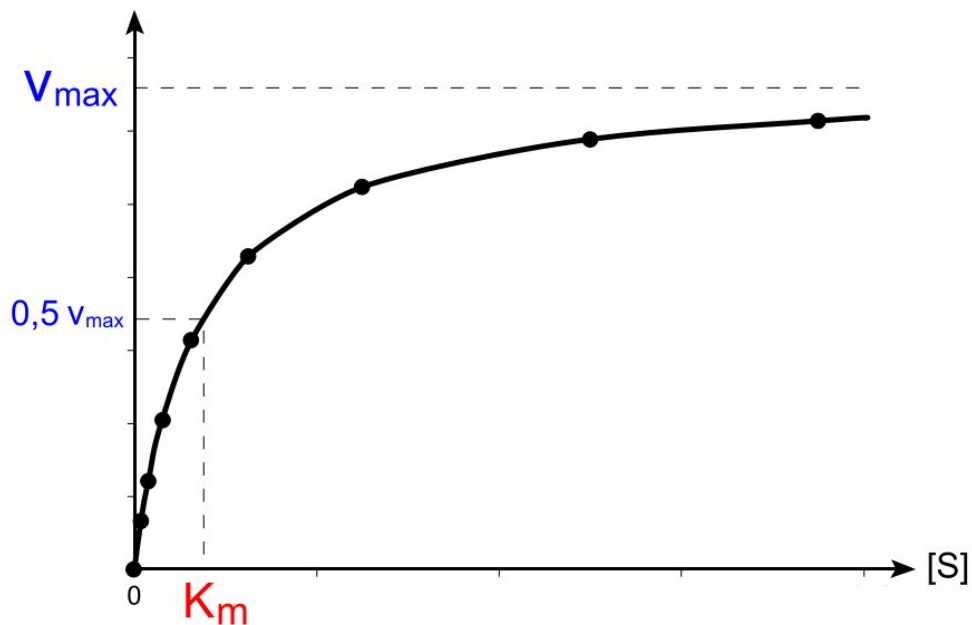
der E er enzym, S er substrat, P er metabolisert substrat, k_1 er hastighetskonstanten for dannelsen av enzym-substratkompleks (ES), k_2 er hastighetskonstanten for dannelsen av produkt og frigjøring fra enzymet og k_3 er hastighetskonstanten for oppløsning av enzym-substratkomplekset [55].

Hastigheten av en slik enzymatisk reaksjon som funksjon av substratkonsentrasjon kan beskrives ved hjelp av Michaelis-Menten kinetikk. Michaelis-Menten-ligningen (Ligning 2) beskriver det kvantitative forholdet mellom substratkonsentrasjonen [S] og metabolismehastigheten (v) [56].

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \text{(Ligning 2)}$$

Michaelis-Menten-konstanten, K_m , er et invers mål på affiniteten av legemidlet for enzymet. Substratkonsentrasjonen hvor reaksjonshastigheten for enzymet er halvparten av det maksimale, er K_m -verdien. Jo lavere K_m -verdi, jo høyere er affiniteten. V_{max} representerer maksimal hastighet av metabolittdannelse, og denne verdien er direkte proporsjonal med totalkonsentrasjonen av enzym. For eksempel er clearance av MDZ sterkt korrelert til hepatisk nivå av CYP3A-enzymet [57]. Ved ubundet plasmakonsentrasjon godt under K_m , varierer hastighet og konsentrasjon direkte proporsjonalt, en tilstand hvor kinetikken er lineær. Ved konsentrasjon over K_m , nærmer hastigheten seg verdien av V_{max} og kinetikken blir ikke-lineær og utviser metning (Figur 1.6) [58].

Mange legemidler utviser Michaelis-Menten kinetikk, som resulterer i en kinetikkprofil hvorfra parameterne K_m og V_{max} enkelt kan estimeres. Ved å sammenligne K_m og V_{max} -verdiene til forskjellige enzymer som metaboliserer et legemiddel av interesse, kan man bestemme det relative bidraget fra hvert enkelt enzym [59]. Michaelis-Menten-modellen, utviklet fra *in vitro* data, kan videre brukes som utgangspunkt for å sammenligne substrater, og til å forutsi *in vivo*-clearance eller legemiddelinteraksjoner [58].



Figur 1.6 Michaelis-Menten kurveforløp som viser hastigheten (V) på reaksjonen som funksjon av substratkonsentrasjonen $[S]$.

Bruk av Michaelis-Menten-modellen forutsetter at enzymet kun har ett bindingssete for substratene [60]. I motsetning til de fleste CYP-enzymmer, utviser CYP3A-enzymene såkalt atypisk kinetikk for mange substrater *in vitro*, også kalt sigmoid enzymkinetikk. Dette er tilsynelatende et resultat av en allosterisk effekt som vanligvis gir en sigmoid kurve [61]. Sigmoid enzymkinetikk er en type positiv homotrop kooperativitet. Kooperativitet er en egenskap som finnes hos enzymer med multiple bindingssteder for ligander. Dersom bindingen av en ligand øker bindingen av neste ligand har man positiv kooperativitet. Negativ kooperativitet vil si at bindingen av en ligand fører til dårligere binding av neste ligand [59]. Betydningen av atypisk kinetikk *in vivo* er imidlertid ikke avklart [62]. Når det gjelder midazolam, er det vist at 1'-hydroksylering og 4-hydroksylering av dette CYP3A4-substratet følger vanlig Michaelis-Menten-kinetikk *in vitro* [63].

1.8 Hensikten med oppgaven

Det har i flere studier blitt indikert at inflammatoriske cytokiner kan regulere aktivitet av CYP-enzymmer, noe som kan føre til endret farmakokinetikk for en rekke legemidler [42]. Hensikten med denne oppgaven var å etablere en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler, for deretter spesifikt å studere effekten av de inflammatoriske cytokinene interleukin-6 (IL-6) og interferon- α 2b (IFN- α 2b) på CYP3A4-aktiviteten. Utvikling av terapeutiske proteiner er et av de raskest økende satsingsområdene i den farmasøytiske industrien i dag, og blant annet av den grunn er det spesielt viktig å belyse hvilken potensiell effekt cytokiner kan ha på CYP-enzymmer.

2. Materialer og metoder

2.1 Metabolismestudier

2.1.1 Dyrkning av THLE-celler

THLE-cellene T5-3A4 (passasje 22) ble tatt opp fra nitrogentank (- 196 °C), og tinet raskt i vannbad ved 37 °C. Innholdet i ampullen ble reløst i 1 ml næringsmedium (Appendiks: Løsning 1), og deretter overført til Corning® CellBIND® 75 cm² flaske med 11 ml næringsmedium. Cellene ble dyrket i en inkubator ved 37 °C i fuktig atmosfære med 5 % CO₂ i luft.

Cellene fikk ny næring ved å suge av gammelt næringsmedium og tilsette 12 ml nytt næringsmedium på mandager, onsdager og fredager. Cellene ble splittet 1 gang i uken ved ca. 90 % konfluens. Gammelt næringsmedium ble sugd av og cellene ble deretter vasket med 5 ml Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) to ganger, etterfulgt av tilsetning av 2 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) (Appendiks: Løsning 2) til flasken og inkubering i 5 minutter ved 37 °C. Celleflasken ble etter endt inkubasjon dunket kraftig mot hånden og det ble studert i mikroskop at cellene hadde løsnet fra celleflasken før tilsetning av 5 ml næringsmedium. Dette ble så overført til et sentrifugerør og sentrifugert i 5 minutter ved 1300 rpm. Supernatanten ble sugd av og pelleten inneholdende ca. 9 millioner celler ble reløst i 7 ml næringsmedium. Det ble av celleduspensjonen tatt ut et volum på 1 ml som ble sådd ut i en Corning® CellBIND® 75 cm² flaske og tilsatt 11 ml næringsmedium, og inkubert i inkubator ved 37 °C i fuktig atmosfære med 5 % CO₂ i luft.

Cellene som ble benyttet i forsøk ble sådd ut i Corning® CellBIND®-brett bestående av 6 brønner med ca. 200 000 celler per brønn. Disse stod i minst 4 dager før forsøkene for å sikre et adekvat celleantall.

2.1.2 Høsting av celler

I slutten av hvert forsøk ble cellene høstet for måling av proteinverdier. Cellelaget ble vasket med høstebuffer (1 ml) (Appendiks: Løsning 3). Deretter ble det tilsatt ytterligere 1 ml høstebuffer og en gummiskrape ble benyttet for å løsne cellene. Celleduspensjonen i hver

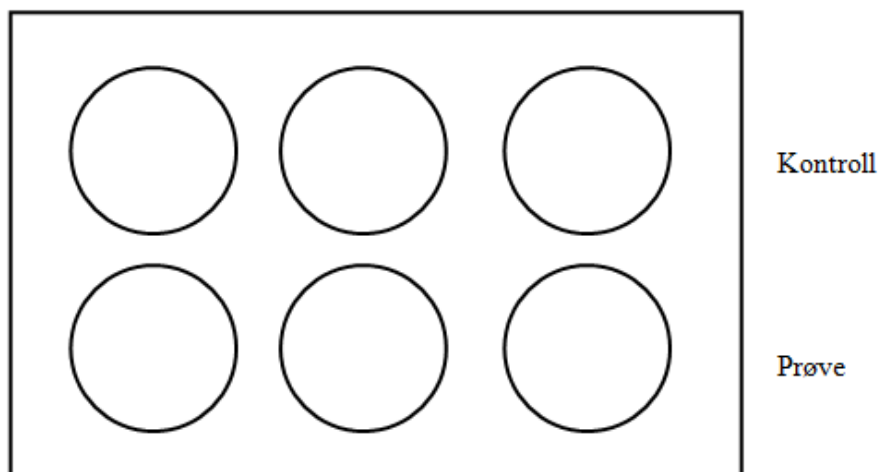
brønn ble så overført til hvert sitt plastrør, og brønnene ble vasket med enda 1 ml høstebuffer og overført til samme plastrør. Plastrøret ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 2000 g. Supernatanten ble sugd av og cellepelletten ble resuspendert i 200 µL høstebuffer, overført til eppendorfrør og frosset ned (-20 °C).

2.1.3 Metabolismestudier i THLE-celler

Ulike inkubasjonsbetingelser ble utprøvd for å finne optimale forhold for metabolittdannelse av midazolam i *THLE-celler*, både med hensyn til tid og konsentrasjon. I *humane hepatocytter* detekterte Kimoto *et al.* (2012) metabolisme av midazolam allerede innen 5 minutter [64]. Ulike inkubasjonstider ble studert (15 min, 30 min, 1 time, 2 timer og 4 timer), og 15 min ble anvendt i endelig metode.

Det innledende forsøket med IL-6 ble utført med 70 µM MDZ. Basert på metningskurvene (2-50 µM og 10-200 µM) ble konsentrasjon av midazolam på 50 µM benyttet i endelig metode, da denne lå i det lineære området for dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ.

Hvert Corning[®] CellBIND[®] -brett bestod av 3 paralleller med kontroll og 3 paralleller med prøve (Figur 2.1). Det ble hver dag sugd av gammelt og tilført nytt næringsmedium til kontrollprøver, og næringsmedium med tilsatt cytokin til brønnene med prøver for å opprettholde konsentrasjonen av denne. På forsøksdagen ble 1 ml medium med 50 µM MDZ løst i næringsmedium tilsatt brønnene. Corning[®] CellBIND[®]-brettene ble så inkubert ved 37 °C i 15 min. Ved endt inkubasjon ble metabolismen terminert ved henstand på is og tilsetning av etylacetat; løsningen i brønnene ble overført til ferdig merkede glassrør, og tilsatt 300 µL etylacetat med 0,0073 µM diazepam (DIA) som internstandard, for å få metabolittene over i organisk fase. Den organiske fasen ble sugd av og overført til eppendorfrør. Etter dette ble det tilsatt 300 µL etylacetat for fullstendig ekstraksjon, som ble overført til samme eppendorfrør. Prøveopparbeidelse var nødvendig for å få prøver rene nok til å kunne bli analysert ved hjelp av væskechromatografi med massespektrometrisk deteksjon (LC-MS), og samtidig redusere bakgrunnsstøy i kromatogrammene. Etylacetat ble dampet av ved hjelp av nitrogen, og tørrstoffet ble deretter reløst i buffer (MS-vann/ACN i forholdet 220/150). Eppendorfrørene ble så ristet på whirlmikser ved 2000 rpm. Et volum på 123 µL av denne løsningen ble til slutt overført til ferdig merkede rør til LC-MS-analyse. Rørene ble oppbevart i fryser ved -20 °C dersom analysen ikke ble utført på samme dag.



Figur 2.1: 6-brønners Corning® CellBIND®-brett, der "Kontroll" og "Prøve" indikerer henholdsvis celler uten tilsetning og med tilsetning av cytokin.

Basalaktivitet

For å undersøke dag-til-dag-variasjon ble det utført basalaktivitetsforsøk ($n = 2$). Det ble benyttet midazolam med en konsentrasjon på $50 \mu\text{M}$, 3 paralleller hver dag over 5 dager. Første forsøk ble utført på dag 4 etter utsåing av celler, og siste forsøk på dag 8 etter utsåing. Det ble utført daglig mediumskifte.

Interleukin-6 (IL-6)

Konsentrasjoner på 500 pg/mL og 2000 pg/mL av IL-6 ble valgt ut på bakgrunn av en studie utført av Dickmann *et al.* (2011) [27]. IL-6 (Sigma-Aldrich) ble løst i MS-vann til en konsentrasjon på $10 \mu\text{g/mL}$, som videre ble fortynnet i MS-vann og deretter blandet med næringsmedium til ønsket konsentrasjon før tilsetning i brønner.

Det ble utført et IL-6-forsøk med de to nevnte konsentrasjoner av IL-6 med 30 minutters inkubering med $70 \mu\text{M}$ MDZ, og et forsøk med 2000 pg/mL med 15 minutters inkubering med $25 \mu\text{M}$ MDZ. Cellene ble preinkubert med IL-6 i 48, 72 og 96 timer før forsøksdagen. Ytterligere forsøk for å undersøke IL-6 sin effekt på CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ ble utført av Fleischer [65].

Interferon- α 2b (IFN- α 2b)

Aktivitet av IFN- α 2b i cellelinjen HEK293 ble av produsenten (Sigma-Aldrich) oppgitt i ED₅₀ med en verdi på $\leq 0,16$ ng/mL. Basert på dette ble i første omgang to konsentrasjoner valgt ut; 0,16 ng/mL og 1,6 ng/mL. IFN- α 2b (Sigma-Aldrich) ble løst i fosfat-bufret saltvann (PBS) til en konsentrasjon på 10 μ g/ml, som videre ble fortynnet i PBS og deretter blandet med næringsmedium til ønsket konsentrasjon før tilsetning i brønner.

Det ble utført forsøk (n = 3) med ovennevnte konsentrasjoner av IFN- α 2b, som ble tilsatt 24, 48 og 72 timer før forsøksdagen for å se på tidsavhengig effekt, samt et forsøk for å se på konsentrasjonsavhengig effekt etter 24 timers inkubering med IFN- α 2b (0,05, 0,1, 0,16, 1,6 og 5 ng/mL). Alle forsøk ble utført med 15 minutters inkubering med 50 μ M MDZ.

2.1.4 Forsøk med IFN- α 2b i insektmikrosomer

Det ble utført et forsøk for å undersøke CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i rekombinante CYP3A4-insektmikrosomer, etter tilsetning av IFN- α 2b. MDZ ble benyttet som probesubstrat, med en sluttkonsentrasjon på 2 μ M, da dette tidligere er vist å være nær K_m-verdien [44]. Denne ble gjort i stand fra en stamløsning av MDZ i metanol (100 mM), hvor metanolen ble dampet av med nitrogengass, og tørrstoffet av MDZ ble reløst i Tris-H₂SO₄. Forsøket ble utført med 2 paralleller for hver konsentrasjon av IFN- α 2b, og to paralleller med kontrollprøve. Uttak av stamløsninger av IFN- α 2b løst i PBS (2 ng/ml, 10 ng/ml og 100 ng/ml) ble pipettert ut i glassrør, som deretter ble tilsatt Tris-H₂SO₄ til ønsket sluttkonsentrasjon (0,05 ng/ml, 0,16 ng/ml og 1,6 ng/ml). Det ble videre tilsatt Tris-H₂SO₄, MgSO₄ og NADPH slik at totalt sluttvolum i hvert rør var 220,5 μ l, der konsentrasjonen henholdsvis var 118 mM, 0,5 mM og 1,6 mM. Deretter ble 50 μ l mikrosomløsning tilsatt rørene, som midlertidig ble lagret på is, og preinkubert på vannbad med risting (trinn 7,5) i 15 minutter ved 37 °C. Ved endt preinkubering ble hvert av rørene tilsatt 22 μ l MDZ-løsning hvert 30. sekund, og satt tilbake i vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 7,5 minutter. Etter 7,5 minutter ble ett og ett rør, avhengig av hvor lenge de hadde stått, tatt ut av vannbadet og tilsatt 150 μ l iskald acetonitril med 0,044 μ M DIA. Rørene ble så ristet på whirlmikser (2000 rpm) og satt på is i 30 minutter. Etter henstand på is ble rørene sentrifugert i 5 minutter ved 1600 g og 4 °C. 300 μ l av supernatanten ble til slutt pipettert over i rør til analyse med LC-MS [44, 66].

2.2 LC-MS-apparatur og betingelser

2.2.1 Standardkurver

Standardkurver bestående av 8 konsentrasjoner i området 0,0143 μM til 0,236 μM (0,0143, 0,0286, 0,0429, 0,0572, 0,0858, 0,1144, 0,143 og 0,236) ble laget ved å pipettere ut volumer som tilsvarte konsentrasjonen til den aktuelle standarden fra løsninger med metabolittene 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ. Det ble laget to paralleller av hver konsentrasjon. Standardprøvene ble tilsatt samme mengde intern standard (Diazepam) som i prøvene, fra en løsning med konsentrasjon på 4,4 μM . Disse løsningene ble så dampet inn ved hjelp av nitrogengass, før standardene ble reløst i 123 μL bufferløsning bestående av MS-vann og ACN i forholdet 220/150.

2.2.2 Analyse av prøver med LC-MS

For analyse av prøvene ble det benyttet en tidligere validert metode; væskekromatografi med massespektrometrisk deteksjon (LC-MS) (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, og DIA [67]. Analyttene ble separert på omvendt-fase C8 kolonne (3 x 50 mm, 5 μm), med forkolonne (omvendt-fase C8, 3 x 10 mm, 5 μm), ved hjelp av gradienteluering med to mobilfaser; mobilfase A (0,05 M ammoniumformiatbuffer, pH 4,4) og mobilfase B (acetonitril og metanol; 95:5 v/v).

Injeksjonsvolum på 10 μL ble benyttet. I løpet av de første 5 minuttene etter injeksjon av prøve steg det prosentvise bidraget av mobilfase B fra 25 % til 37,5 %. Denne sammensetningen av mobilfase A og B holdt seg konstant i 2,5 minutter. De neste 2,5 minuttene steg mengde mobilfase B til 46,7 %, for deretter å øke raskt til 80 %, etter 10 minutter. Re-ekvilibrering av kolonnen startet 11 minutter etter injeksjon av prøve, og gikk i 6,0 minutter. I dette tidsrommet ble mengde mobilfase B redusert til 25 % og holdt konstant frem til analysens endepunkt, 17 minutter etter injeksjon av prøve. Gjennom analyseforløpet holdt mobilfasen en hastighet på 0,5 ml/min, for så å øke til 1 ml/min under re-ekvilibreringen av kolonnen. Disse betingelsene gav omtrentlige retensjonstider på 4,7 minutter og 6,0 minutter for henholdsvis 4-OH MDZ og 1'-OH MDZ. DIA ble benyttet som internstandard og hadde retensjonstid på ca. 9,8 minutter.

2.3 Bearbeidelse av data

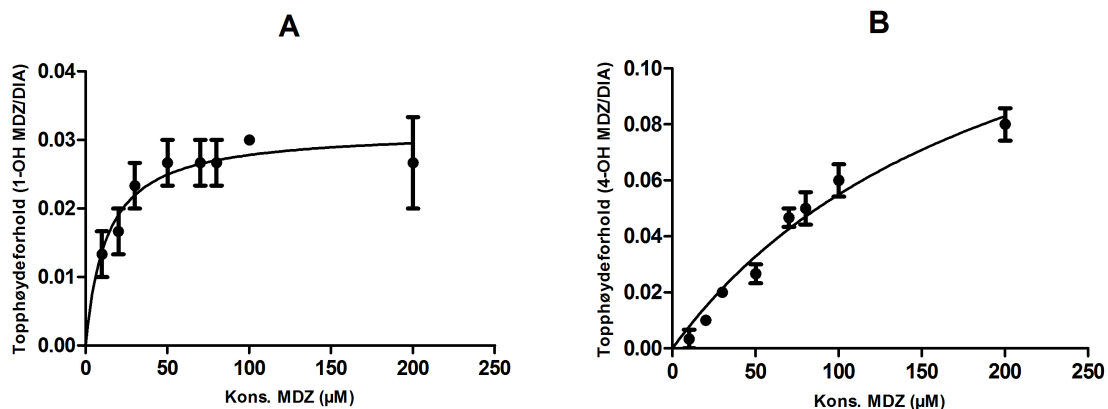
Topp høydene og retensjonstidene av kromatogrammene ble bestemt ved hjelp av dataprogrammet LCMSsolution (Versjon 4.3, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Topp høydene ble bearbeidet i Microsoft Office Excel 2011, hvor forholdet mellom metabolittene og internstandard; 4-OH MDZ/DIA og 1'-OH MDZ/DIA ble beregnet. Videre ble effekt av prøver med tilsatt cytokin beregnet som prosent av kontroll \pm SEM der antall forsøk var ≥ 2 . Disse dataene ble deretter behandlet i GraphPad Prism (Versjon 5, GraphPad Software Inc., La Joll, CA, USA) og kurvene ble tilpasset Michaelis-Menten kinetikk. For utvikling av metabolismemodell i THLE-celler er resultatene presentert som topp høydeforhold som funksjon av MDZ-konsentrasjon eller tid, mens resultatene for forsøk med cytokin er presentert som CYP3A4-aktivitet (i prosent) som funksjon av cytokin-konsentrasjon eller tid.

3. Resultater

3.1 Utvikling av metabolismemodell i THLE-celler

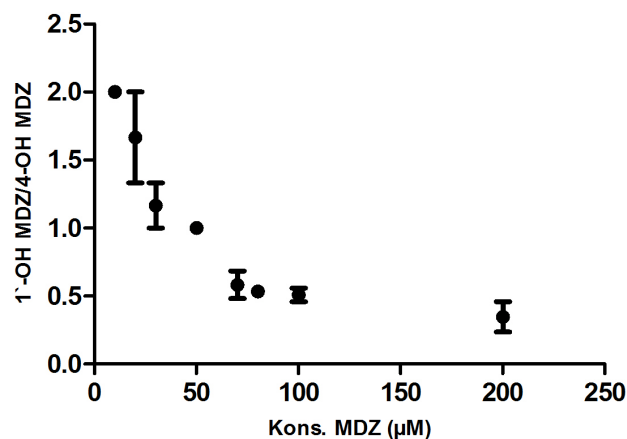
3.1.1 Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon og tid

Dannelse av metabolittene 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ i CYP3A4-THLE-celler etter inkubering med midazolam, viste en Michaelis-Menten-lignende kinetikk (Figur 3.1). Økt dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ med økende konsentrasjon av MDZ ble observert. Ved en midazolamkonsentrasjon på 200 μM kan man se at metning er oppnådd for 1'-OH MDZ, men ikke for 4-OH MDZ. K_m for dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ var henholdsvis 13 og 207 μM .



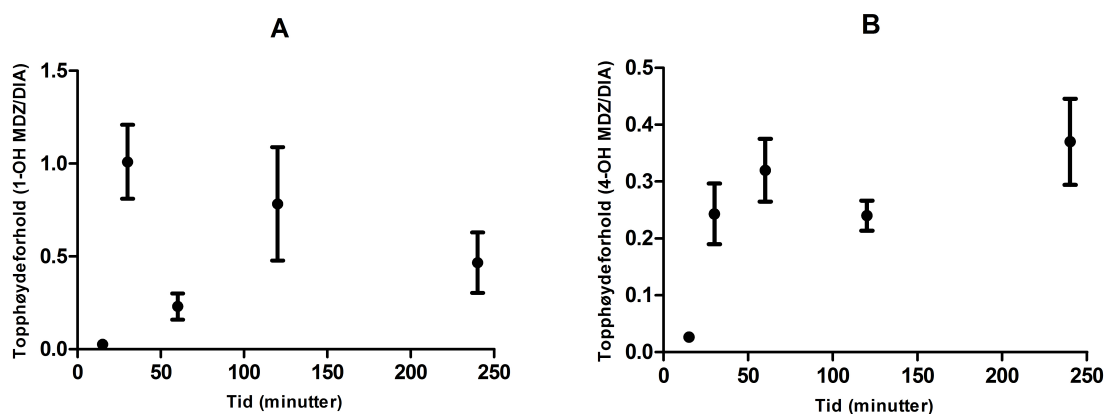
Figur 3.1: Dannelse av 1'-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ) ($r^2 = 0,458$) (A) og 4-hydroksymidazolam (4-OH MDZ) ($r^2 = 0,921$) (B) som funksjon av MDZ-konsentrasjon, etter 15 minutters inkubasjon med MDZ i konsentrasjonsområdet 10-200 μM . Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

Figur 3.2 viser ratio av 1'- og 4-OH MDZ, og man kan utfra denne se at jo høyere konsentrasjonen er, jo lavere blir denne ratioen. Det vil si at det ved høyere konsentrasjon av MDZ i THLE-celler, dannes mer av sekundærmetabolitten 4-OH MDZ enn hovedmetabolitten 1'-OH MDZ.



Figur 3.2: Ratio av metabolittdannelse (1'-OH MDZ/4-OH MDZ) som funksjon av MDZ-konsentrasjon. THLE-cellene ble inkubert med MDZ i 15 min.

En tidsavhengig dannelse av 4-hydroxymidazolam (4-OH MDZ) ble observert (Figur 3.3 B). Denne tidskurven var tilnærmet lineær frem til 60 minutter.

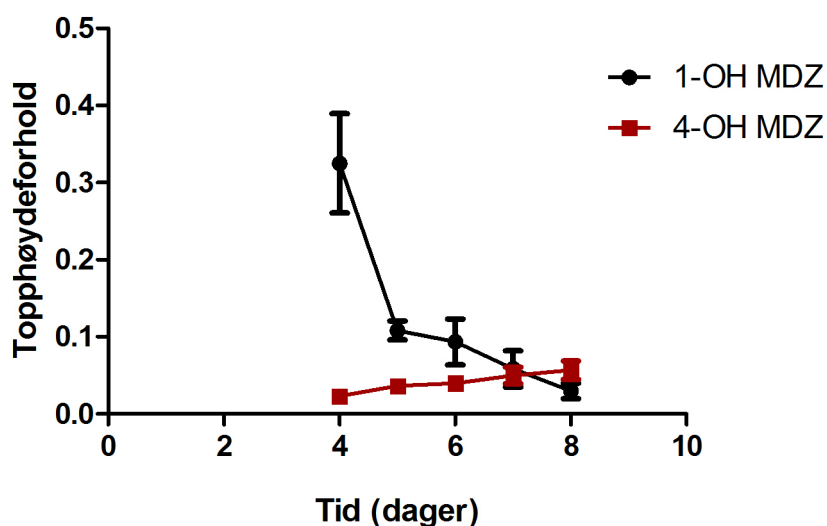


Figur 3.3: Dannelse av 1'-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ) (A) og 4-hydroxymidazolam (4-OH MDZ) (B) som funksjon av inkubasjonstid med 50 µM MDZ.

Metabolisme av midazolam til 1'-OH MDZ var konsentrasjonsavhengig, mens metabolisme til 4-OH MDZ var både konsentrasjons- og tidsavhengig, som man kan se av Figur 3.1 B og 3.3 B.

3.1.2 Basalaktivitet

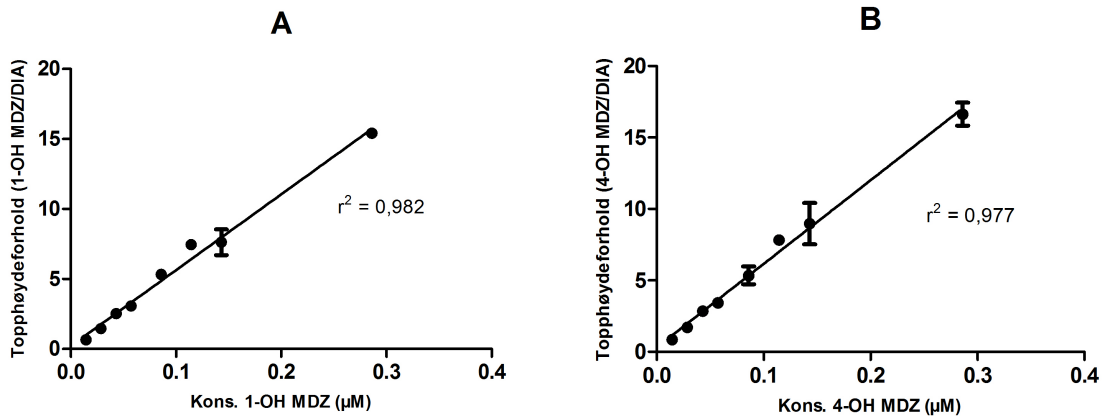
CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam til 1'-OH MDZ viste en gradvis reduksjon fra 4 til 8 dager etter utsåing (Figur 3.4) i begge forsøkene, med et betydelig fall i dannelse av denne metabolitten fra dag 4 til dag 5. Dannelse av 4-OH MDZ viste seg derimot å være tilnærmet konstant i det samme tidsrommet (4-8 dager).



Figur 3.4: Dannelse av hydroksylerte metabolitter som funksjon av hvilken dag forsøket ble utført på etter utsåing av THLE-celler i Corning® CellBIND® -brett. Ved hvert tidspunkt ble THLE-cellene inkubert med 50 μ M MDZ i 15 minutter ($n = 2$).

3.1.3 Standardkurver

Lineariteten av analysemetoden for deteksjon av hydroksylerte metabolitter av midazolam ble undersøkt ved å lage standardkurver for 1'-OH MDZ (Figur 3.5 A) og 4-OH MDZ (Figur 3.5 B). Det var observert en lineær korrelasjon mellom konsentrasjon og topphøydeforholdet (metabolitt/intern standard). Korrelasjonskoeffisienten (r^2) var 0,982 for 1'-OH MDZ og 0,977 for 4-OH MDZ.

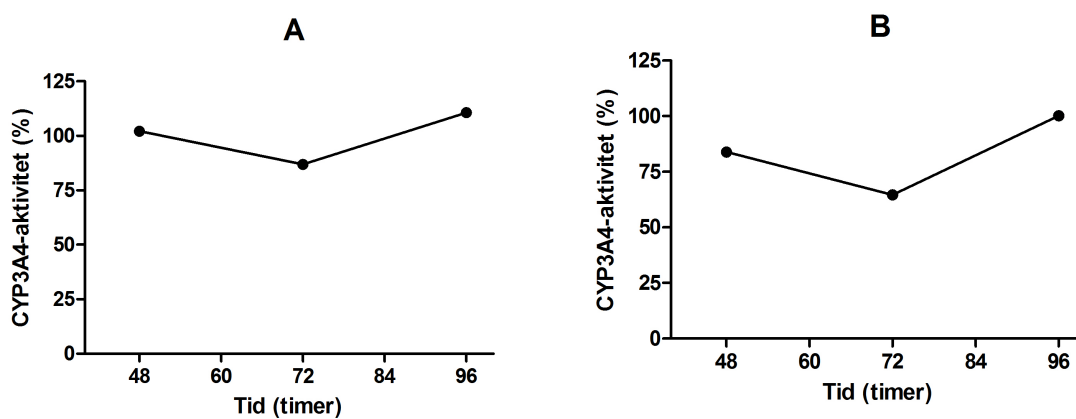


Figur 3.5: Standardkurver for 1-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ) (A) og 4-hydroksymidazolam (4-OH MDZ) (B).

3.2 Effekt av cytokiner på CYP3A4-aktivitet

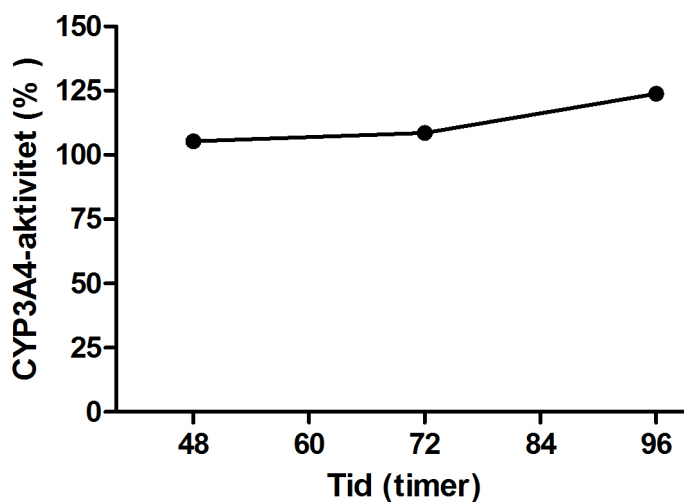
Interleukin-6 (IL-6)

I det innledende forsøket med IL-6 (500 og 2000 pg/ml) var det stor variasjon mellom parallellene, og dermed ingen betydelig endring i CYP3A4-aktivitet i tidsrommet 48 til 96 timer (Figur 3.6).



Figur 3.6: CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av preinkubasjonstid med IL-6 ((A) 500 pg/ml og (B) 2000 pg/ml). Ved hvert tidspunkt ble THLE-cellene inkubert med 70 µM MDZ i 30 minutter.

Det ble utført et forsøk med lik konsentrasjon av IL-6 (2000 pg/ml), men med en redusert konsentrasjon av MDZ på bakgrunn av et metningsforsøk (Figur 3.1) som viste at 25 μ M MDZ var i det lineære området for dannelse av 4-OH MDZ. Ingen markant endring i CYP3A4-aktivitet ble observert ved inkubasjon med IL-6 fra 48-96 timer (Figur 3.7).

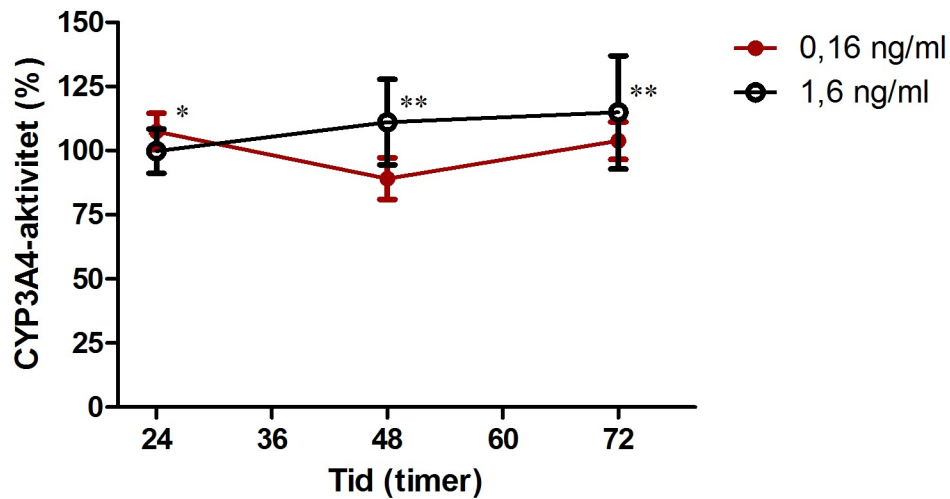


Figur 3.7: CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av preinkubasjonstid med IL-6 (2000 pg/ml). Ved hvert tidspunkt ble cellene inkubert med 25 μ M MDZ i 15 minutter.

I disse forsøkene var det stor variasjon mellom parallellene. Flere forsøk kunne ha avdekket om det forelå en eventuell reell effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler. Videre forsøk med dette cytokinet ble utført av Fleischer [65].

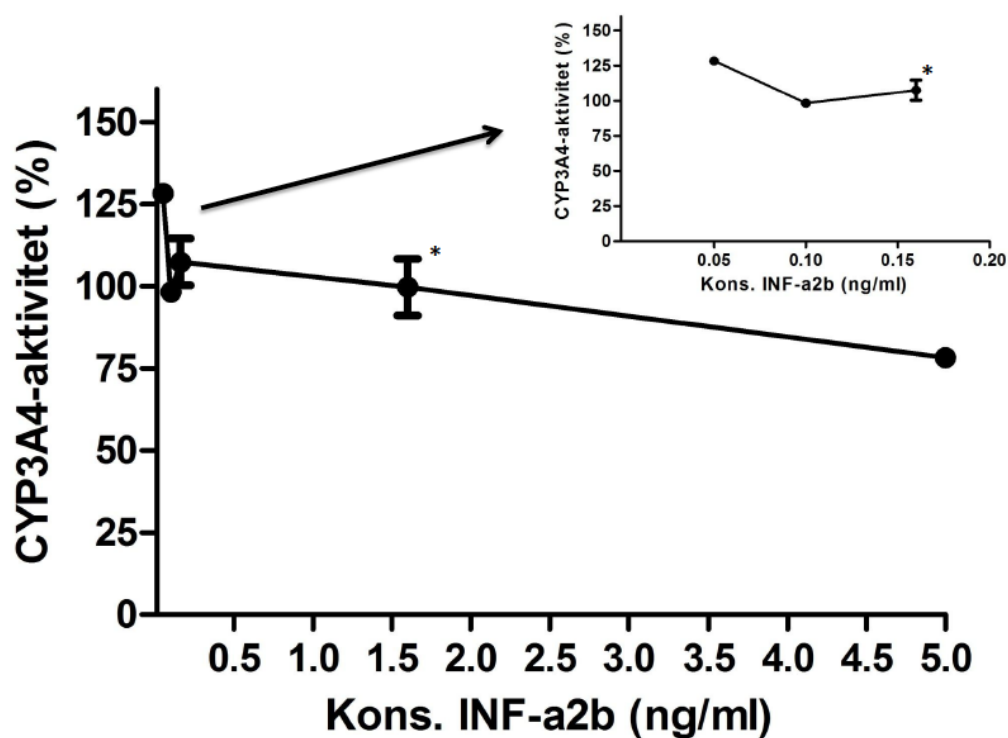
Interferon- α 2b (IFN- α 2b)

Inkubering av THLE-cellene med IFN- α 2b i to ulike konsentrasjoner (0,16 og 1,6 ng/ml) ga ingen vesentlig endring i CYP3A4-aktivitet verken etter 24, 48 eller 72 timer (Figur 3.8).



Figur 3.8: CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av preinkubasjonstid med IFN- α 2b (0,16 og 1,6 ng/ml). Ved hvert tidspunkt ble cellene inkubert med 50 μ M MDZ i 15 minutter. * indikerer $n = 4$, ** indikerer $n = 3$

Inkubasjon i 24 timer med økende konsentrasjon IFN- α 2b (0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,16 ng/ml, 1,6 ng/ml og 5 ng/ml) viste ingen vesentlig endring i aktivitet av CYP3A4 (Figur 3.9).

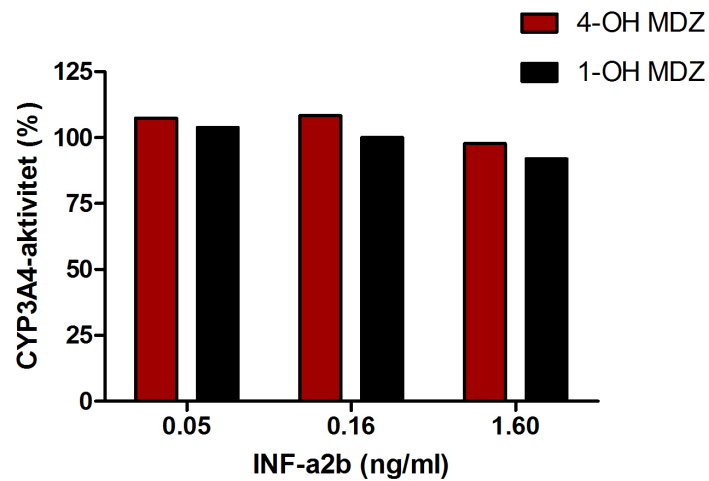


Figur 3.9: CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelsen av 4-OH MDZ, som funksjon av IFN- α 2b-konsentrasjon etter 24 timer preinkubasjon (0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,16 ng/ml, 1,6 ng/ml og 5 ng/ml). Innfelt bildeutsnitt viser de tre laveste konsentrasjonene av IFN- α 2b.

* indikerer $n = 4$

3.3 Effekt av IFN- α 2b på metabolisme i mikrosomer

Ingen direkte effekt av IFN- α 2b på CYP3A4-mediert dannelse av 1'-OH MDZ eller 4-OH MDZ ble observert ved tilsetning av dette interferonet til CYP3A4-insektmikrosomer (Figur 3.10).



Figur 3.10: CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av hydroksylerte metabolitter, som funksjon av IFN- α 2b-konsentrasjon (0,05, 0,16 og 1,6 ng/ml). CYP3A4-insektmikrosomene ble inkubert med 2 μ M MDZ.

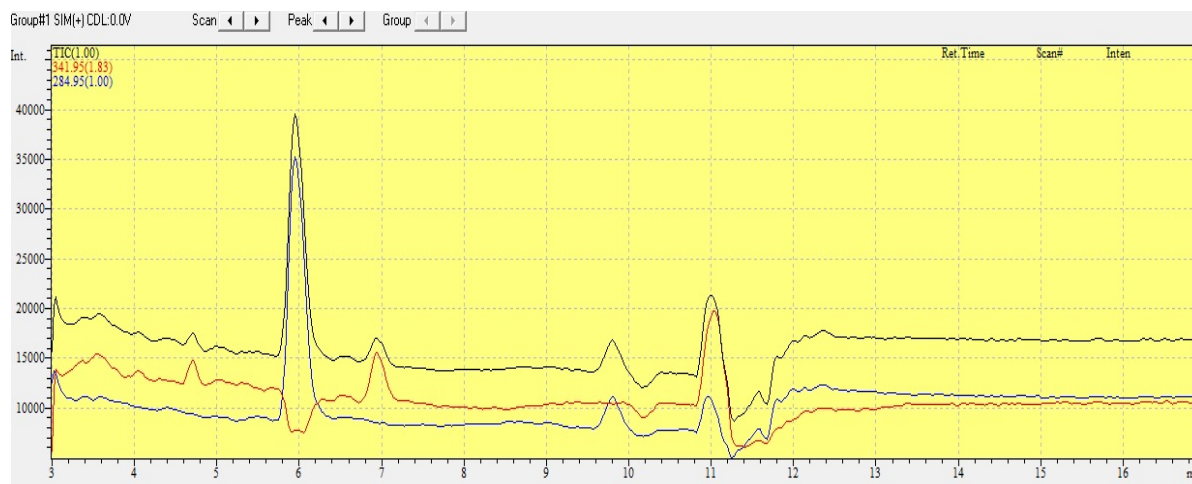
4. Diskusjon

4.1 Metodologiske betraktninger

Ved metabolisme av midazolam via CYP3A4 dannes to metabolitter, 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, som ved hjelp av gradienteluering kan separeres kromatografisk [67]. I den anvendte metoden har disse retensjonstider på henholdsvis 6,0 og 4,7 minutter, og følgende masse/ladningsforhold (m/z): 341,95 (1'-OH MDZ og 4-OH MDZ) og 284,95 (DIA).

Ved analyse av de innledende forsøkene med LC-MS, viste 1'-OH MDZ lavere intensitet på topphøydene enn hva som kunne forventes. Det ble samtidig observert en forurensning ved samme retensjonstid som 1'-OH MDZ og det ble antatt at signalet for 1'-OH MDZ ble undertrykt som følge av forurensningen (Figur 4.1). Det ble derfor utført utvasking av omvendt-fase C8 kolonne (3 x 50 mm, 5 µm), og senere utskiftning av denne, uten at dette førte til bedre deteksjon av 1'-OH MDZ. For å finne ut av hvor denne forurensningen kunne stamme fra, ble det utført forsøk med MDZ-prøver med økende konsentrasjon (2,5, 5 og 7,5 µM), både i nærvær av THLE-celler og fravær av THLE-celler. Ved begge tilfeller viste det seg at forurensningstoppen økte ved økende konsentrasjon av MDZ. Det ble derfor bestilt ny MDZ. Denne var fra en annen leverandør (Sigma-Aldrich) enn tidligere (F. Hoffmann-La Roche AG).

Etter det innledende forsøket med IL-6, ble basalaktiviteten undersøkt (Figur 3.4), hvorpå metabolitten 1'-OH MDZ igjen ble detektert, selv om forurensningstoppen også her var tilstede. Det ble på grunn av dette senere utført forsøk på dag 4 etter utsåing for å undersøke om dette fortsatt ga topper av 1'-OH MDZ. I dette tilfellet og i alle senere forsøk var 1'-OH MDZ derimot ikke lenger detekterbar. Basalaktivitetsforsøkene viste også at metabolismen av MDZ til 4-OH MDZ var mer stabil fra dag til dag. Det ble tatt i bruk ny MDZ, men denne viste seg også å inneholde den samme forurensningstoppen. Av den grunn ble det sett bort i fra hovedmetabolitten, og heller skiftet fokus over til dannelsen av den sekundære metabolitten 4-OH MDZ i videre forsøk. Det har samtidig blitt vist at metabolismen fra MDZ til 4-OH MDZ i CYP3A4-THLE-celler har vært tilnærmet konstant gjennom alle forsøkene.



Figur 4.1: Kromatogram av 4-OH MDZ (retensjonstid 4,7 minutter) og 1'-OH MDZ (retensjonstid 6,0 minutter) og den interne standarden DIA (retensjonstid 9,8 minutter). Forurensningstopp (blå) ved retensjonstid på 6,0 minutter, som undertrykker signalet for 1'-OH MDZ (rød) med lik retensjonstid. Denne forurensningen hadde samme masse/ladningsforhold (m/z) som DIA (284,95).

4.2 Metabolismestudier

Det er i denne oppgaven blitt utviklet en metode for å studere CYP3A4-aktivitet i THLE-celler ved bruk av midazolam som probe, med en inkubasjonstid på 15 minutter og en konsentrasjon av MDZ på 50 μM . Metabolisme av midazolam viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk i THLE-celler, som vist ved hastighetskurvene i Figur 3.1 der beste tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk ble angitt. Forholdet mellom estimerte K_m -verdier for dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ i THLE-celler (henholdsvis 13 og 207) er lignende de som tidligere er vist i mikrosomer (henholdsvis 5,6 og 96,9) isolert fra disse cellene [44]. Metabolisme av MDZ til 4-OH MDZ ga høyere r^2 -verdi ved tilpasning til Michaelis-Menten modellen enn 1'-OH MDZ, dette mye på grunn av at signalet for 1'-OH MDZ ble undertrykket ved analyse med LC-MS.

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 viste ingen betydelig endring i CYP3A4-aktivitet i transfekterte humane leverepitel (THLE)-celler. Det innledende forsøket med IL-6 (500 og 2000 pg/ml) ble utført med en konsentrasjon av MDZ på 70 μM . Denne konsentrasjonen, som ligger i det øvre sjiktet i det

lineære området for 1'-OH MDZ, ble valgt på bakgrunn av at man på forhånd ikke hadde noen indikasjoner på om eller hvor mye CYP3A4-aktiviteten potensielt ville bli redusert. Antagelsen var at det med denne konsentrasjonen ville bli lettere å se hvor stor den eventuelle effekten var. Forsøket med 30 minutters inkubasjon av MDZ med en konsentrasjon på 70 μM viste ingen markant endring i CYP3A4-aktivitet i tidsrommet 48 til 96 timers inkubasjon med IL-6 (500 og 2000 pg/ml). Et annet forsøk med en konsentrasjon av IL-6 på 2000 pg/ml, men 15 minutters inkubasjon og 25 μM MDZ ga heller ingen endring i effekt på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam ved noen av tidspunktene. Disse resultatene er ikke i samsvar med nylig publiserte artikler. Dickmann *et al.* (2011) konkluderte med at IL-6 førte til en reduksjon i CYP3A4-aktivitet i en human hepatocyttkultur. IL-6 forårsaket en markant økning i APR-proteinene C-reaktivt protein (CRP) og serum amyloid A (SAA), når primære hepatocytter ble eksponert for IL-6 i 72 timer, i konsentrasjonsområdet 5 pg/ml til 50 ng/ml [27]. CYP3A4-aktivitet i den studien ble bestemt ved omdannelse av testosteron til 6 β -hydroxytestosteron ved 48, 72 og 96 timer, og ved alle tidspunktene ble dannelsen av denne metabolitten redusert med økende konsentrasjoner av IL-6. Maksimal undertrykkelse av CYP3A4-aktivitet oppstod etter 96 timer med E_{\min} på 21,5 % av kontroll og EC_{50} av IL-6 på 17,1 pg/ml. En reduksjon på under 5 % av kontroll ble sett i CYP3A4 mRNA-nivå etter eksponering for IL-6 i 72 timer, med EC_{50} av denne på 3,2 pg/ml [27].

Hos friske individer varierer IL-6-konsentrasjonen i plasma fra 1 - 10 pg/ml, mens dette økes til opp mot 130 pg/ml i enkelte pasientpopulasjoner med inflammatoriske sykdommer [27]. I denne oppgaven ble det benyttet suprafysiologiske konsentrasjoner (>2000 pg/ml) av IL-6, men dette førte allikevel ikke til en påviselig effekt. Dette kan tyde på at cellemodellen som ble brukt i denne oppgaven ikke innehar alle faktorer som må være tilstede for at IL-6 skal ha en effekt på CYP3A4-aktivitet. Ifølge Dickmann *et al.* (2011) har man sett flere begrensninger i forhold til å bruke primære hepatocytter, først og fremst med tanke på at denne cellemodellen mangler andre typer celler som normalt finnes i leveren, som blant annet Kupffer-celler [27]. Det samme kan tenkes å gjelde THLE-celler. Ettersom det til tross for dette har blitt vist i flere *in vitro*-studier at IL-6 nedregulerer CYP3A4-aktivitet i hepatocytter [21, 27, 29, 30], men ikke THLE-celler som ble brukt i denne oppgaven, tyder dette allikevel på at noe annet enn Kupffer-celler mangler i THLE-modellen. Flere studier har vist at aktivering av transkripsjonsfaktorer (blant annet NF- κ B og AP-1) inngår i

mekanismen til IL-6 sin nedregulering av CYP3A4-aktivitet [30, 31]. Det har samtidig blitt vist at en transkripsjonsfaktor i kjernereseptorfamilien, pregnan X reseptor (PXR), er nødvendig for at denne nedreguleringen skal oppstå [30]. Dersom THLE-celler ikke innehar en eller flere av disse transkripsjonsfaktorene vil dette kunne være en mulig forklaring på den manglende effekten ved tilsetning av IL-6 i denne oppgaven. Siden THLE-celler ikke innehar endogen CYP3A4, men har blitt transfektert med CYP3A4, er det også uklart om det transfekterte CYP3A4-genet reguleres på samme måte som i ikke-transfekteerte celler.

Interferon- α 2b (IFN- α 2b)

I denne oppgaven viste inkubasjon med interferon- α 2b ingen endring i CYP3A4-aktivitet i THLE-celler, uavhengig av inkubasjonstid og konsentrasjon av IFN- α 2b. Det foreligger motstridende resultater i litteraturen med hensyn til IFN- α 2b sin effekt på CYP3A4-aktivitet i cellemodeller [34, 35, 68, 69]. En nylig publisert studie av Flaman *et al.* (2011) viste at IFN- α 2b reduserte CYP3A4-aktivitet i humane hepatomaceller (HepG2) etter 6 timer, og at denne effekten vedvarte 48 timer etter behandling. For å bestemme om reduksjonen i aktivitet var grunnet redusert ekspresjon av CYP3A4, ble mRNA målt og en reduksjon ble detektert etter 1,5 timer og nadir ble nådd ved 9 timer [35]. Chen *et al.* (2011) viste derimot at CYP3A4-aktivitet ble oppregulert av IFN- α 2b i ko-kultur, men ikke i vanlig cellekultur [34]. En ko-kultur er en cellekultur som inneholder to forskjellige celletyper, i dette tilfellet parenkymale og non-parenkymale celler. Av de non-parenkymale cellene er Kupffer-celler kjent for å spille en viktig rolle i ekspresjonen av legemiddelmetaboliserende enzymer gjennom utslipp av cytokiner [70]. Den eksakte mekanismen er fremdeles uklar, men nåværende data tyder på at IFN- α 2b kan påvirke non-parenkymale celler som Kupffer-celler som i sin tur påvirker PPAR- og PXR/CAR-relaterte gener [34]. Årsaken til de motstridende resultatene *in vitro* er ikke åpenbare, men en forklaring kan være de ulike cellemodellene som er anvendt.

Det var av interesse å undersøke om det forelå en direkte effekt av IFN- α 2b på CYP3A4-aktivitet, eller om en potensiell effekt var på transkripsjonelt nivå. IFN- α 2b viste ingen endring i CYP3A4-katalysert metabolisme av MDZ til 1'- og 4-OH MDZ i insektmikrosomer. Siden midazolam, som i motsetning til i en fullcellemodell, her vil bli direkte eksponert for CYP3A4, er det rimelig å anta at IFN- α 2b ikke har en direkte effekt på

selve enzymet. Flere forskningsgrupper har også postulert som nevnt ovenfor at IFN- α 2b sin effekt på enzymaktivitet foreligger på transkripsjonelt nivå [34, 35].

IFN- α 2b sin effekt på CYP-aktivitet har blitt undersøkt i mindre grad enn IL-6, selv om flere studier har vist redusert clearance av legemidler ved kombinasjon med dette interferonet *in vivo* [37, 71, 72]. Administrasjon av gjentatte doser av pegylert interferon alfa-2b (PEG-IFN- α 2b) til pasienter med kronisk hepatitt C har blitt utført for å undersøke effekten på legemiddelmetaboliserende enzymer [68]. Dette ble gjennomført ved å bruke en "cocktail" av validerte prober, deriblant midazolam som probe på CYP3A4/3A5-aktivitet. Resultatene viste at ukentlig administrasjon av PEG-IFN- α 2b utviste varierende effekt på ulike CYP-enzymmer: ingen effekt på aktiviteten av CYP3A-isoenzymene, inhibering av CYP1A2-aktivitet i begrenset grad, samt økt aktivitet av CYP2D6, selv om denne effekten var variabel [68]. At det i denne studien ikke ble vist effekt av pegylert IFN- α 2b på aktivitet av CYP3A-isoenzymene *in vivo* er en interessant observasjon. En annen klinisk studie viste derimot en svak økning i CYP3A4-aktivitet [69], men forskjeller i type IFN-alfa som ble brukt (konvensjonell versus pegylert), pasientpopulasjon og administrert dose gjør at man ikke direkte kan sammenligne disse resultatene. Det ble i denne studien beskrevet at den svake økningen i CYP3A4 mRNA-ekspresjon var i samsvar med kliniske funn, på bakgrunn av at CYP3A4-aktivitet er kjent for å være redusert hos pasienter med hepatitt C, og for å øke til tilnærmet normale nivåer etter behandling med IFN- α 2b [69].

Effekten av IFN- α 2b på CYP-aktivitet er ennå ikke er fullstendig klarlagt, og det foreligger store variasjoner i denne effekten avhengig av hvilken celletype som har blitt benyttet. Det har som nevnt tidligere blitt postulert at IFN- α reduserer CYP3A4-aktivitet ved å nedregulere CYP3A4-transkripsjon via JAK-STAT-signalveien [35]. En hypotese på manglende effekt i THLE-celler kan være at denne signalveien i dette systemet ikke er intakt. Det har også blitt beskrevet over at det foreligger data som tyder på at IFN- α 2b kan påvirke Kupffer-celler som igjen påvirker ulike transkripsjonsfaktorer som er viktige i ekspresjon av CYP-enzymmer, slik at fravær av Kupffer-celler således kan være en mulig forklaring på de minimale og varierende effektene av IFN- α 2b på CYP3A4 i THLE-celler i denne oppgaven.

4.3 Midazolam som CYP3A4-modellsubstrat

Midazolam er som tidligere nevnt et validert CYP3A4-substrat som er mye brukt som probe for CYP3A4-aktivitet [43], og ble av den grunn benyttet i denne oppgaven. Det har imidlertid blitt postulert at benzodiazepiner har innvirkning på cytokinrespons, og i flere studier har det blitt undersøkt om denne effekten gjelder midazolam [73, 74]. Kim *et al.* (2006) undersøkte om midazolam hadde anti-inflammatoriske effekter og kom blant annet frem til at transkripsjonell aktivitet av NF- κ B, induisert av lipopolysakkarid (LPS), ble undertrykket av midazolam ved bruk av en makrofag-cellelinje fra mus (RAW264.7) [73]. Det har samtidig blitt observert en doseavhengig effekt av MDZ på mRNA-ekspressjon av IL-6 i mononukleære celler fra perifert blod (PBMC), der MDZ signifikant inhiberte denne ved konsentrasjoner på 1 μ g/ml ($P < 0.05$) og 10 μ g/ml ($P < 0.01$) [74]. Dette er interessant tatt i betraktning at proinflammatoriske cytokiner øker produksjonen av NF- κ B, som spiller en viktig rolle i undertrykkelse av transkripsjon av CYP3A4-enzymet [30]. På denne måten kan midazolam potensielt forhindre at IL-6 regulerer aktivitet av CYP3A4 også i THLE-celler. Av den grunn bør også andre CYP3A4-substrater vurderes ved videre metabolismeforsøk for å studere cytokiners effekt på CYP3A4-aktivitet.

4.4 Fremtidsutsikter

Eksperimenter for å undersøke om de nevnte transkripsjonsfaktorer og signalveier er tilstede i THLE-celler, som for eksempel analyse av mRNA-ekspressjon, vil først og fremst være nødvendig for å konkludere med om denne cellemodellen er egnet eller ikke for å studere effekt av cytokiner på CYP3A4. Samtidig vil det være viktig å vurdere om midazolam er et egnet CYP3A4-substrat i denne sammenheng.

For å gjelde i en klinisk situasjon er det samtidig viktig å huske på at det i en inflammatorisk sykdom foreligger et komplekst nettverk av cytokiner som påvirker et stort antall celler. Utvikling av nye biologiske produkter er stadig økende, og det blir derfor viktig med ytterligere forskning på cytokiner og effekt på CYP-enzymet i årene fremover.

5. Konklusjon

I denne oppgaven ble det etablert en metode for å studere CYP3A4-metabolisme i THLE-celler ved bruk av midazolam som probe. Metabolisme av midazolam i dette systemet viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk.

Årsaken til de minimale og varierende effektene av IL-6 og IFN- α 2b på CYP3A4-metabolisme i denne oppgaven, kan være at THLE-celler ikke er egnet til studier av regulering av CYP3A4-aktivitet eller at midazolam ikke er ideell som probe for CYP3A4-aktivitet siden det har blitt postulert at dette virkestoffet kan ha effekt på den viktige transkripsjonsfaktoren NF- κ B. Det vil være viktig med ytterligere studier for å belyse cytokiners effekt på CYP3A4-metabolisme i fremtiden, spesielt med tanke på at utvikling av nye terapeutiske proteiner er et økende satsingsområde.

6. Litteraturliste

1. *Norsk legemiddelhåndbok*, 2010, Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.
2. Spigset, O., *Grunnleggende farmakokinetikk - absorpsjon*. Tidssk Nor Lægefören, 2005. **125**(7): p. 886-7.
3. Gonzalez, F.J. and Tukey, R.H., *Drug Metabolism*. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 2006. p. 71-91.
4. Aitken, A.E., Richardson, T.A., and Morgan, E.T., *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 123-49.
5. Rooseboom, M., Commandeur, J.N., and Vermeulen, N.P., *Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs*. Pharmacological reviews, 2004. **56**(1): p. 53-102.
6. Spigset, O., *Cytokrom P-450-systemet*. Tidsskr Nor Lægefören 2001. **28**(121): p. 3296-8.
7. Li, A.P., Kaminski, D.L., and Rasmussen, A., *Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4*. Toxicology, 1995. **104**(1-3): p. 1-8.
8. Omari, A.A. and Murry, D.J., *Pharmacogenetics of the Cytochrome P450 Enzyme System: Review of Current Knowledge and Clinical Significance*. Journal of Pharmacy Practice, 2007. **20**(3): p. 206-218.
9. Spigset, O. and Molden, E., *Cytokrom P-450 3A4 - kroppens viktigste arena for legemiddelinteraksjoner*. Tidsskr Nor Legefören, 2008. **24**(128): p. 2832-5.
10. Elens, L., et al., *The new CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients*. Pharmacogenetics and genomics, 2012. **22**(5): p. 373-80.
11. Wang, D., et al., *Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs*. The pharmacogenomics journal, 2011. **11**(4): p. 274-86.
12. Cannon, J.G., *Inflammatory Cytokines in Nonpathological States*. News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 298-303.
13. Maher, J.J., *Cytokines: overview*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 109-15.
14. McNeil, J.O. and Goralski, K.B., *Drug-Cytokine Interactions*. Drug Interactions in Infectious Diseases 2011: Springer Science+Business Media.
15. Trenholme, G.M., et al., *Quinine disposition during malaria and during induced fever*. Clin Pharmacol Ther, 1976(19): p. 459-467.
16. Chang, K.C., et al., *Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness*. Lancet, 1978(1): p. 1132-1133.
17. Petrovic, V., Teng, S., and Piquette-Miller, M., *Regulation of drug transporters during infection and inflammation*. Molecular interventions, 2007. **7**(2): p. 99-111.
18. Molden, E., *P-glykoprotein - en pumpe av betydning for legemiddelrespons*. Tidsskr Nor Lægefören, 2004. **124**(22): p. 2921-3.

19. Belliard, A.M., et al., *Effect of hr-IL2 treatment on intestinal P-glycoprotein expression and activity in Caco-2 cells*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 2002. **54**(8): p. 1103-9.
20. Kulmatycki, K.M. and Jamali, F., *Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in disease and variability in drug response*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, 2005. **8**(3): p. 602-25.
21. Aitken, A.E. and Morgan, E.T., *Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2007. **35**(9): p. 1687-93.
22. Donato, M.T., et al., *Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **281**(1): p. 484-90.
23. Wacher, V.J., Wu, C.Y., and Benet, L.Z., *Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy*. Molecular carcinogenesis, 1995. **13**(3): p. 129-34.
24. Christensen, H. and Hermann, M., *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport*. Frontiers in pharmacology, 2012. **3**: p. 8.
25. Whicher, J.T. and Evans, S.W., *Cytokines in Disease*. Clinical Chemistry, 1990. **36**(7): p. 1269-1281.
26. Naito, M., et al., *Differentiation and function of Kupffer cells*. Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan, 2004. **37**(1): p. 16-28.
27. Dickmann, L.J., et al., *Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2011. **39**(8): p. 1415-22.
28. Chen, Y.L., et al., *Acute-phase response, interleukin-6, and alteration of cyclosporine pharmacokinetics*. Clinical pharmacology and therapeutics, 1994. **55**(6): p. 649-60.
29. Schmitt, C., et al., *Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2011. **89**(5): p. 735-40.
30. Yang, J., et al., *Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes*. Toxicology letters, 2010. **197**(3): p. 219-26.
31. Liptrott, N.J. and Owen, A., *The role of cytokines in the regulation of drug disposition: extended functional pleiotropism?* Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2011. **7**(3): p. 341-52.

32. Ekins, S. and Erickson, J.A., *A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2002. **30**(1): p. 96-9.
33. Administration, U.S.F.a.D. *Approved therapies for the treatment of complications of HIV/AIDS*. [cited 2012 22/4]; Available from: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118949.htm>.
34. Chen, C., et al., *Effect of interferon-alpha2b on the expression of various drug-metabolizing enzymes and transporters in co-cultures of freshly prepared human primary hepatocytes*. Xenobiotica, 2011. **41**(6): p. 476-85.
35. Flaman, A.S., et al., *The effect of interferon-alpha on the expression of cytochrome P450 3A4 in human hepatoma cells*. Toxicology and applied pharmacology, 2011. **253**(2): p. 130-6.
36. Bell, H., et al., *Behandling ved kronisk hepatitt C*. Tidsskr Nor Lægeforen 2002(122): p. 926-8.
37. Islam, M., et al., *Differential effect of IFNalpha-2b on the cytochrome P450 enzyme system: a potential basis of IFN toxicity and its modulation by other drugs*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2002. **8**(8): p. 2480-7.
38. Stewart, C.F. and Schuetz, E.G., *Need and potential for predictive tests of hepatic metabolism of anticancer drugs*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2000. **6**(9): p. 3391-2.
39. Mahalati, K., et al., *Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2001. **12**(4): p. 828-33.
40. Aghemo, A., Rumi, M.G., and Colombo, M., *Pegylated interferons alpha2a and alpha2b in the treatment of chronic hepatitis C*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 2010. **7**(9): p. 485-94.
41. Mayo, P.R., et al., *Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis*. British journal of clinical pharmacology, 2000. **50**(6): p. 605-13.
42. Lee, J.I., et al., *CYP-mediated therapeutic protein-drug interactions: clinical findings, proposed mechanisms and regulatory implications*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(5): p. 295-310.
43. Chung, E., et al., *Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2006. **79**(4): p. 350-61.
44. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
45. Hoffmann-La Roche, F. *Preparatomtale, Dormicum 5 mg/ml*. 29.10.2009.
46. Shih, P.S. and Huang, J.D., *Pharmacokinetics of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in Chinese with different CYP3A5 genotypes*. Drug

- metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2002. **30**(12): p. 1491-6.
47. Trouvin, J.H., et al., *Pharmacokinetics of midazolam in anaesthetized cirrhotic patients*. British journal of anaesthesia, 1988. **60**(7): p. 762-7.
 48. Poloyac, S.M., *Altered drug metabolism in critically ill children: a significant source of adverse effects?* Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies, 2012. **13**(1): p. 118-9.
 49. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicology and applied pharmacology, 2003. **189**(3): p. 233-46.
 50. Rodrigues, A.D., *Use of in vitro human metabolism studies in drug development. An industrial perspective*. Biochemical pharmacology, 1994. **48**(12): p. 2147-56.
 51. Pfeifer, A.M., et al., *Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5123-7.
 52. George, J., et al., *Time-dependent expression of cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1997. **129**(6): p. 638-48.
 53. Zanelli, U., et al., *Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2012. **40**(1): p. 104-10.
 54. Mace, K., et al., *Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines*. Carcinogenesis, 1997. **18**(7): p. 1291-7.
 55. Schwender, J., *Plant Metabolic Networks*, 2009: SpringerScience+BusinessMedia,LLC.
 56. Houston, J.B. and Kenworthy, K.E., *In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(3): p. 246-54.
 57. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1994. **271**(1): p. 549-56.
 58. Rowland, M. and Tozer, T.N., *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and applications*. 4. ed, 2011. p. 446-449.
 59. Tracy, T.S. and Hummel, M.A., *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug metabolism reviews, 2004. **36**(2): p. 231-42.
 60. Houston, J.B. and Kenworthy, K.E., *In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2000. **28**(3): p. 246-54.

61. Shou, M., et al., *Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of diazepam and its derivatives*. The Biochemical journal, 1999. **340 (Pt 3)**: p. 845-53.
62. Hutzler, J.M. and Tracy, T.S., *Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2002. **30(4)**: p. 355-62.
63. Kapelyukh, Y., et al., *Multiple substrate binding by cytochrome P450 3A4: estimation of the number of bound substrate molecules*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2008. **36(10)**: p. 2136-44.
64. Kimoto, E., et al., *Differential modulation of cytochrome P450 activity and the effect of 1-aminobenzotriazole on hepatic transport in sandwich-cultured human hepatocytes*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2012. **40(2)**: p. 407-11.
65. Fleischer, P., *Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler*, 2012.
66. Hermann, M., et al., *Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design*. Current drug metabolism, 2006. **7(3)**: p. 265-71.
67. Postvoll, L.W., *Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro: utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter*. 2006.
68. Gupta, S.K., Kolz, K., and Cutler, D.L., *Effects of multiple-dose pegylated interferon alfa-2b on the activity of drug-metabolizing enzymes in persons with chronic hepatitis C*. European journal of clinical pharmacology, 2011. **67(6)**: p. 591-9.
69. Becquemont, L., et al., *Effect of interferon alpha-ribavirin bitherapy on cytochrome P450 1A2 and 2D6 and N-acetyltransferase-2 activities in patients with chronic active hepatitis C*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2002. **71(6)**: p. 488-95.
70. Sunman, J.A., et al., *Kupffer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2004. **32(3)**: p. 359-63.
71. Israel, B.C., et al., *Effects of interferon-alpha monotherapy on hepatic drug metabolism in cancer patients*. British journal of clinical pharmacology, 1993. **36(3)**: p. 229-35.
72. Jonkman, J.H., et al., *Effects of alpha-interferon on theophylline pharmacokinetics and metabolism*. British journal of clinical pharmacology, 1989. **27(6)**: p. 795-802.
73. Kim, S.N., et al., *Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage*. Anesthesiology, 2006. **105(1)**: p. 105-10.
74. Miyawaki, T., et al., *Effect of midazolam on interleukin-6 mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells in the absence of lipopolysaccharide*. Cytokine, 2001. **15(6)**: p. 320-7.

7. Appendiks

Utstyr

Utstyr	Produsent
Autoinjektor SIL-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Destillert vann	Bibby Aquatron A4S
Detektor massespektrometer LCMS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Forkolonne Inertsil C8-3, 5 µm, 3,0 x 10 mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc, La Joll, CA, USA
Ionebyttet vann	
Kolonne Inertsil C8-3, 5 µm, 3,0 x 50 mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
LCMSsolution programvare, Version 2.04	Shimadzu, Kyoto, Japan
Microsoft Office Excel 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
pH-meter Beckman 50 pH meter	Beckman Intstruments Inc, Fullerton, CA, USA
Pumper LC-10AP VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Sentrifuge universal 32 R	Hettlich zetrifugen, Tyskland
Switch FCV-12AH	Shimadzu, Kyoto, Japan
Systemkontroller SCL-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Vannbad	Gallenkamp, England

Vekt	Mettler Toledo, Sveits
Vekt	OHAUS PRECISION Standard, N.J, USA
Whirlimixer	Fisons Scientific Apparatus, England
Whirlmikser MS 3 basic	IKA Works Inc, Wilmington NC, USA

Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Acetonitril (ACN)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Diazepam (DIA)	Diakonhjemmet sykehus, Oslo, Norge
Fosfat-bufret saltvann (PBS)	Lonza, Verviers, Belgia
Insektmikrosomer med CYP3A4+450 reduktase+cytokrom b₅	Supersomes™, BD Gentest, Woburn, MA, USA
Kaliumklorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre (CH₂O₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Tyskland
Metanol (MeOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
MgSO₄	Merck, Darmstadt, Tyskland
Midazolam (MDZ)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Midazolam (MDZ)	F. Hoffmann-La Roche AB, Sveits
N₂-gass	AGA AS, Oslo, Norge
NADPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

THLE T5-3A4-celler	Nestlé Research Center, Sveits
Tris-H₂SO₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,25 %)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Østerrike

Løsninger for THLE-celler

Sammensetning av dyrkningsmediet benyttet for THLE-celler (Løsning 1)

Løsning		Mengde
Dulbeccos Modified Eagles' s medium (DMEM) m/GLUTAMAX	Gibco, no.21885-108	500 ml
FCS (Føtalt kalveserum)	Gibco, no.10108-165	50 ml
Penicillin/Streptomycin 10 000 IU/ml	Gibco, no. 15140-114	2,5 ml
Fungizone (250 µg/ml Amfotericin)	Gibco, no. 1529-026	2,5 ml

Trypsinløsning 0,25 % - THLE-celler (Løsning 2)

Løsning		Mengde
Trypsin-EDTA 0,5 %	PAA Lab. GmbH, no. L00410-0749	1 ml
HBSS u/Ca ²⁺ og Mg ²⁺	Gibco, no. 20115-155	1 ml

Høstebuffer pH 7,4 (Løsning 3)

Stoff		Mengde
0,154 M KCL (isoton)	Merck, no. 6328879	11,5 g
50 mM Tris HCL	Sigma-Aldrich, Lot 115H5730	6,05 g
Destillert vann	Aquatron A4S	ad 1000 ml

Løsninger for LC-MS

Mobilfase A:

0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4

<u>Løsning</u>	<u>Mengde</u>
Ammoniakk (NH ₃) 25%	4,036 ml
Kons. maursyre (CH ₂ O ₂)	2,2125 ml
Ionebyttet vann	ad 1000 ml

Mobilfase B:

Acetonitril 95 %: Metanol 5 %

<u>Løsning</u>	<u>Mengde</u>
Acetonitril (ACN)	950 ml
Metanol (MeOH)	50 ml

Poster NSFT Vintermøte, Beitostølen 2012

Cytokiners effekt på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler

Tor Arne Hotvedt*, Philip Fleischer*, Espen Molden, Anders Åsberg og Hege Christensen
 Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo
 *Delt førsteforfatter

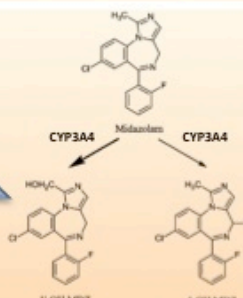


Introduksjon

Flere kliniske studier indikerer at inflammatoriske tilstander hos pasienter kan endre farmakokinetikken til mange ulike legemidler. Det er vist nedsatt clearance og økt systemisk eksponering av legemidler i forbindelse med infeksjoner, vevsskade, operasjoner, kreft og autoimmune sykdommer.

Interferoner, interleukin-1 og -6, samt TNF- α ser ut til å være sentrale mediatorer i denne sammenheng, og noen av disse cytokinene er vist å nedregulere ekspressjon og aktivitet av CYP-enzymmer *in vitro*. Immunologisk respons hos pasienter antas derfor å være en av årsakene til individuell variasjon i evnen til å metabolisere legemidler, men det er mye ukjent vedrørende effekten av spesifikke cytokiner på de enkelte CYP-enzymene.

Hensikten med denne studien var å 1) etablere en cellemodell for å studere cytokiners effekt på CYP3A4- metabolisme og 2) studere effekten av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme *in vitro*.



Figur 1: Metabolisme av midazolam til 1-OH MDZ og 4-OH MDZ

Metode

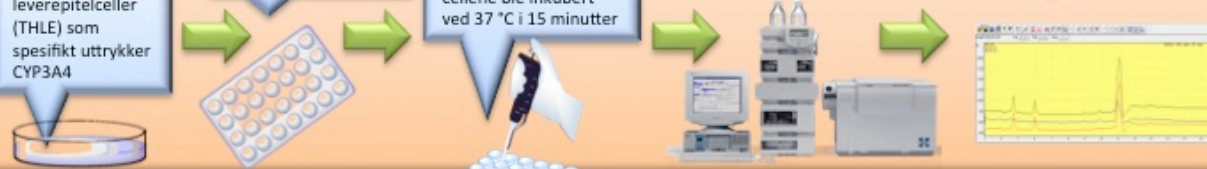
Dyrket transfekterte humane leverepitelceller (THLE) som spesifikt uttrykker CYP3A4

Interleukin-6 (IL-6) ble tilsatt 48, 72 og 96 timer før forsøksdagen (0,5 og 2 ng/mL).

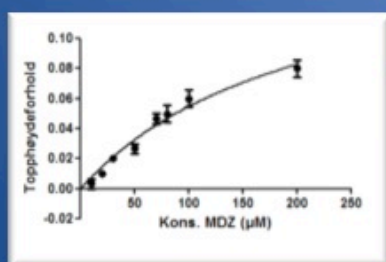
CYP3A4-proben midazolam (MDZ, 50 μ M) ble tilsatt i brønnene på forsøksdagen og cellene ble inkubert ved 37 °C i 15 minutter

Metabolittene 1-OH og 4-OH MDZ ble analysert med en validert LC-MS-metode.

Metabolismeaktiviteten mellom kontrollprøver og prøver med IL-6 ble sammenlignet.



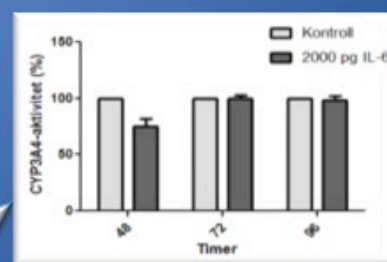
Resultater



Figur 2: Dannelse av 4-OH MDZ som funksjon av MDZ-konsentrasjon

Det ble etablert en fullcellemodell for undersøkelse av regulering av CYP3A4- metabolisme. Midazolam viste en konsentrasjonsavhengig metabolisme via CYP3A4 til 4-OH MDZ (Fig. 2).

Tilsetning av IL-6 førte til en 25 \pm 5% redusert CYP3A4-aktivitet etter 48 timers inkubering, mens etter 72 og 96 timer var det ingen nedsatt enzymaktivitet (Fig. 3). Dette antyder at IL-6 kan nedregulere CYP3A4-aktiviteten i THLE-celler etter 48 timer, og dette er i samsvar med studier i humane primære hepatocytter [1].



Figur 3: CYP3A4-aktivitet etter 48, 72 og 96 timers inkubering med IL-6 (n=2)

Konklusjon

Preliminære data indikerer at IL-6 har en tidsavhengig påvirkning på CYP3A4-mediert metabolisme. Dette kan potensielt ha betydning for intra- og interindividuell variasjon i farmakokinetikk for mange legemidler i forhold til pasienters inflammasjonstilstand.

Referanse

[1] Dickman et al, Drug metabolism and disposition 39(8): p. 1415-22 (2011)