



## **METABOLISM TESTING METHODS AS EXEMPLIFIED BY SELECTED NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES (NPSs)**

Małgorzata PIECHACZEK<sup>1</sup>, Magdalena SMOLIK<sup>1</sup>, Sebastian ROJEK<sup>2</sup>, Beata BYSTROWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland*

<sup>2</sup> *Chair and Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland*

<sup>3</sup> *Department of Biochemical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland*

### **Abstract**

Detailed assessment of the biotransformation of compounds and the activity of their metabolites is an extremely important element in the safety evaluation of a substance, both in preclinical and clinical studies. It should be noted that the metabolite may differ from the parent compound in terms of physicochemical properties and consequently pharmacological and toxicological properties.

The purpose of the biotransformation of xenobiotics is to increase their hydrophilicity, which allows excretion in the urine. The metabolites of biotransformation phase I show undesirable pharmacological or toxic effects much more often. According to U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidance, if a metabolite in the human body accounts for more than 10% of the total amount of metabolites, its safety should be thoroughly assessed. Metabolites can interact more strongly or weakly, or to the same degree, with the same or a different molecular target as the parent compound. They can also display non-specific effects by, for example, damaging macromolecules (e.g. proteins, nucleic acids) in the way that free radicals do.

In the case of new psychoactive substances (NPSs), the pharmacological properties, including metabolism, are largely unknown until they are traded illegally and their users begin to appear in departments of toxicology or forensic medicine. It is in this way that the activity profile and probable metabolic pathways of NPSs are determined. To determine the metabolites of NPSs is also an important toxicological skill in the forensic testing of biological samples (blood/urine/tissue) collected from victims, in which metabolites, not parent compounds, are usually found.

Using examples from the authors' research and the available literature, the article aims to present alternative methods of metabolism testing for NPSs. *In vitro* methods (application of microsomes, S9 fraction, hepatocytes, cytosol) are discussed and comparisons are made between the results of *in vivo* tests on animals and analyses of autopsy material.

The experiments and the literature review demonstrate that by using *in vitro* methods the metabolism of NPSs can be predicted with high probability. By improving existing methods of metabolism research and creating new and alternative ones it will be possible to better understand metabolic pathways and better identify the NPS metabolites formed in the human body. This will contribute not only to the development of better methods of treating NPS poisoning, but will also be of use when compiling forensic and medical reports for the judiciary.

### **Keywords**

Metabolism; *In vitro* methods; NPSs.

*Received 2 November 2021; accepted 10 December 2021*

## 1. Introduction

Metabolism is defined as the totality of biochemical reactions occurring in cells. It can be divided into primary metabolism, which is responsible for the conversion and further use of substances that perform specific functions in the body, and the metabolism of xenobiotics, whose purpose is to excrete beneficial alien substances (medicines) or harmful ones (narcotics, designer drugs) from the body (mainly with the urine, but also with the bile, sweat or milk) by increasing their hydrophilicity (Fig. 1). Only very few substances are not metabolised: highly polar substances that are excreted in the urine, including oxalic acid and phthalic acid, very volatile compounds excreted by the kidneys or lungs, including ethers and inhalational anaesthetics, and highly lipophilic compounds, which tend to accumulate in adipose tissue (some dioxins). There are two phases in the biotransformation of xenobiotics: functionalisation and conjugation. In the functionalisation phase, compounds undergo oxidation, reduction and hydrolysis reactions that reduce their lipophilicity by increasing the number of hydrophilic functional groups in the molecule (e.g. hydroxyl, amine, and carbonyl hydrophilic functional groups). During the conjugation phase, the newly-formed polar functional groups of xenobiotics are conjugated with large polar residues, such as glucuronic acid, sulfate, acetic acid,

and glutathione. Many xenobiotics can only be excreted in this way.

Biotransformation proceeds with greatest intensity in the liver, but also takes place in the small intestine, the lungs, the blood plasma, the skin, and the gonads. At the cellular level, the greatest concentration of the enzymes responsible for biotransformation occurs in the area of the smooth endoplasmic reticulum, but some of these enzymes also occur in the cytoplasm. Some enzymes produced by the liver, such as amidases and esterases, are secreted into the circulating blood, where they catalyse biotransformation reactions (Correia, 2012; Murray, 1995; Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Menzel, Ruth, Schäfer-Korting, 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007). Based on examples from the authors' own research and from the available literature, the aim of the paper is to present an overview of the commonest alternatives to *in vivo* testing of the metabolism of NPSs.

## 2. Metabolism phase I: Functionalisation

The first phase of metabolism, whose aim is to increase the polarity of xenobiotics, mainly involves oxidation, reduction, and hydrolysis reactions. It is precisely in this phase that toxic metabolites are most often formed.

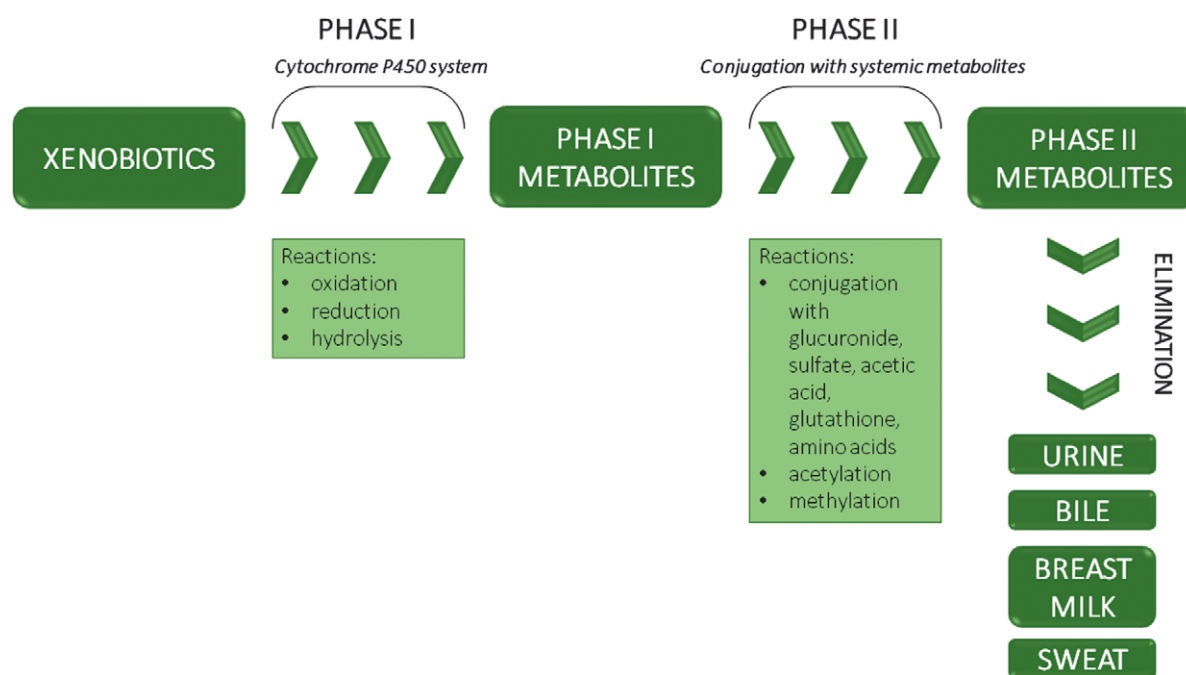


Figure 1. Phase I and phase II of xenobiotic metabolism.

## 2.1. Oxidation

The majority of reactions in phase I biotransformation are reactions of oxidation, which are catalysed by enzymes known as oxidases, which catalyse an oxidation reaction by removing hydrogen or its electron, and by enzymes known as oxygenases, which introduce one oxygen atom (monooxygenase) or two oxygen atoms (dioxygenases) into the xenobiotic molecule. Monooxygenases of the cytochrome P450 type, which contain iron protoporphyrin IX as a prosthetic group, play the dominant role here. They catalyse a very broad range of NADPH- and oxygen-dependent reactions, including hydroxylation, epoxidation, dealkylation, N-/S-/O-oxidation, and dehalogenation reactions of both aliphatic and aromatic compounds. P450 cytochromes occur in the form of a number of families and sub-families of isoenzymes that are present in cells both constitutively and as synthesised under the influence of induction by a specific xenobiotic. P450 cytochromes are responsible for the metabolism of very many groups of NPSs, which can be tested using liver microsomes (human or animal) containing most cytochrome P450 isoforms or using microsomes prepared from insect cells transfected with the human gene of the relevant cytochrome P450 isoform (Gaunitz et al., 2019; Sauer, Peters, Schwaninger, Meyer, Maurer, 2009; Teksin et al., 2009; Theobald, Maurer, 2007).

Flavin monooxygenases (FMO) also catalyse oxidation reactions – especially with heteroatoms – for example the oxidation of tertiary amines to amine oxides and of primary and secondary amines to N-hydroxylamines. They differ, however, in respect of the prosthetic group (flavin dinucleotide). Flavin monooxygenase isoforms are classified in five groups according to substrate and organ variation; the predominant isoforms in humans are FMO1, FMO2, and FMO3. Unlike in the case of cytochrome P450, they are not induced under the influence of xenobiotics; they are marked, however, by lower substrate specificity. Thanks to insect cells transfected with the human gene, specific isoforms can also be obtained for flavin monooxygenases. Flavin monooxygenase is far less important for the biotransformation of NPSs than cytochromes; in practice it is only taken into consideration for compounds possessing heteroatoms, such as those derived from amphetamine (Hong et al., 2021; Lee et al., 2009).

Monoamine oxidases (MAO) are enzymes that catalyse the oxidative deamination reaction of primary, secondary, and tertiary amines – mainly endogenous catecholamines and those derived from tryptamine.

Though this reaction may appear to be of little physiological significance, drugs based on this system are sufficiently important to the pharmacotherapy of many diseases that a whole group of drugs known as monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) has emerged. Studies of their involvement in NPS biotransformation are few and only concern a small group of compounds, such as those of the 2C family or that derive from the NBOME group (Nielsen, Holm, Leth-Petersen, Kristensen, Olsen, Linnet, 2017; Theobald, Maurer, 2007).

Catechol-O-methyltransferases (COMT) are enzymes of the methyltransferase group that are physiologically involved in the degradation of catecholamines. They exist in two forms: MBCOMT (associated with the cell membrane) and SCOMT (the soluble form in the cytosol). Methylation of the hydroxyl groups is not an important NPS biotransformation pathway and the metabolites do not usually require additional analysis for toxicological risk. The literature therefore lacks data selectively analysing the metabolism effected by COMT. However, methylated derivatives, including MDMA, have been identified in many studies of metabolism that use liver microsomes or cytosol (Meyer, Maurer, 2009).

Even though it does not play a significant role during NPS biotransformation, epoxide hydrolase (EH) is another enzyme worth noting. This enzyme is very important from a toxicological point of view, as it neutralises epoxide compounds formed during the attachment of the oxygen atom to double bonds or during the transformation of aromatic compounds by cytochrome P450. The epoxide derivatives that then arise (e.g. carbamazepine → 10,11-epoxide) are often highly toxic. This is why they are degraded to biphenolic derivatives by epoxide hydrolase.

Alcohol dehydrogenase (ADH), which oxidises alcohols to aldehydes and is especially important in ethanol metabolism, and aldehyde oxidase (AO), which converts aldehydes to acids, are two further enzymes.

## 2.2. Reduction

The reduction reaction occurring under anaerobic conditions is of much less importance in metabolic transformations. Reduction plays a significant role in the metabolism of azo compounds and of aromatic nitro compounds to primary amines, which are catalysed respectively by NADPH-cytochrome P450 reductase and nitroreductase. Reactions of reductive dehalogenation also play an important role in the biotransformation of xenobiotics, such as halothane or DDT.

### 2.3. Hydrolysis

Hydrolysis reactions occur mainly under the influence of non-specific amidases/esterases to acids and alcohols, or amines, occurring intra- and extracellularly, in the circulating blood, the liver, the kidneys or the spleen. Esterases catalyse the degradation of both esters and amidases, but at different rates (as a rule, amidases show greater persistence). They are divided into four groups depending on substrate type: arylesterases (degradation of aromatic esters), carboxylesterases (aliesterases degrading aliphatic esters), cholinesterases (enzymes specialised in degrading esters, in which choline is the alcohol), and acetylerases (acetic acid esters).

Enzymes produced by bacteria of the large intestinal flora are also important in the metabolism of xenobiotics. They can cause hydrolysis of phase II metabolites, which are reabsorbed via the hepatic and intestinal circulations (Correia, 2012; Murray, 1995; Mutschler et al., 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007).

### 3. Metabolism phase II: Conjugation

During biotransformation phase II (thanks to the functional group formed in phase I) metabolites are conjugated with endogenous compounds, which usually cause their bioinactivation. Apart from methylated and acylated metabolites, most of the products of conjugation are acidic and ionise, which greatly facilitates their excretion in the urine and bile. Phase II metabolites are usually biologically inactive, though exceptions, such as morphine-6-glucuronide, occur. Conjugation proceeds in two phases: activation influenced by a high-energy compound, followed by the transfer of the conjugated group onto the molecule of the xenobiotic under the influence of transferases.

The most important phase II reaction in humans is conjugation with glucuronic acid in the form of active glucuronic acid (UDP-glucuronic acid), which is catalysed by UDP-glucuronosyltransferase (UGT). This enzyme belongs to two families, which together contain 19 enzymes. Many endogenous compounds and xenobiotics are subject to glucuronidation, including NPSs, such as AB-CHMINACA (Erratico et al., 2015), 25B-NBF (Kim et al., 2019), and designer benzodiazepines (Pettersson Bergstrand, Richter, Maurer, Wagmann, Meyer, 2019).

Conjugation with active sulfate (PAPS) by sulfotransferase (SULT), an enzyme with more than a dozen isoforms of differing substrate and organ specificity that is only slightly prone to induction,

is a further important phase II reaction. As a route of phase II metabolism, sulfonation has been described, for example, for the following amphetamine derivatives: 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), 3,4-dihydroxyethylamphetamine (DHEA) and 4-hydroxy-3-methoxyethylamphetamine (HMEA) (Schwaninger, Meyer, Zapp, Maurer, 2012).

Other phase II reactions include conjugation with acetylcyste catalysed by glutathione-S-transferases (GSTs) and with  $\alpha$ -amino acids (mainly glycine, but also glutamine, serine, and lysine) catalysed by N-acyltransferases. These two enzymes are present in both the microsomal and cytosolic fractions. Acetylation catalysed by N-acetyltransferase (NAT) and methylation [thiol methyltransferase (TMT) and thiopurine S-methyltransferase (TPMT)], which is of marginal importance, are further reactions belonging to phase II biotransformation (Correia, 2012; Murray, 1995; Mutschler et al., 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007).

### 4. Standards in metabolism testing

A detailed and rigorous assessment of pharmacokinetic parameters (ADME processes: absorption, distribution, metabolism, excretion) – particularly of the biotransformation pathways and the activity of information metabolites – is a very important aspect of evaluating the safety of new substances. Increased knowledge of metabolism and the potential properties of metabolites, which can differ significantly from parent compounds and have a significant impact on the safety of therapy has, when combined with significant advances in instrumentation, made it possible to detect even trace amounts of metabolites. This prompted the question of which metabolites require separate risk analyses. Should some quantitative limit be set on the metabolite or should the risk be estimated based on its chemical structure? These are the questions to which the FDA responded in 2008 when it began issuing the metabolites in safety testing (MIST) guidance [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration & (CDER), 2016], which sets out principles and procedures for testing the safety of metabolites in the context of the biotransformation of small non-biological compounds (excluding drugs obviously harmful to healthy individuals, e.g. chemotherapeutics). The latest edition of the guidance, which is published regularly, appeared in 2020 [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, & (CDER), 2020].

A test using a C-14-radiolabelled compound followed by determination in blood plasma, urine, and faeces, and in the case of laboratory animals, sometimes also in tissue, is regarded as the gold standard for pharmacokinetic studies. The guidance recommends conducting tests of ADME processes as early as possible – both in preclinical (using two appropriate animal species) and clinical testing.

Much attention is devoted to the question of how to manage disproportionate drug metabolites, where the biotransformation in laboratory animal species differs quantitatively or qualitatively from that in humans. Because the interpretative spectrum is here fairly broad, all unstraightforward cases should be considered separately based on current guidelines, the available literature, and individual findings. For example, if a metabolite that has not been identified in a human, or has been identified in very small quantities in a human, is present in large quantities in an animal, there is no need to study its toxicity in detail. However, if a metabolite not detected in animals is present in high amounts in humans, a separate toxicity analysis of that metabolite should be performed – either by changing the laboratory animal species or by synthesising the metabolite and administering it to the animal [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, & (CDER), 2020].

It should not be forgotten that the disproportionality of a metabolite can only be determined by a full ADME study – it may turn out that the metabolites are formed in similar ratios but follow different distribution or elimination pathways.

One of the cases addressed in a publication on unstraightforward cases arising in ADMET trials in the ten years following the introduction of the FDA

guidance is that of compound R483, which was intended to be an anti-diabetic drug. In vitro testing conducted on human and animal cells showed that the metabolism is qualitatively comparable, while in vivo studies on animals and humans detected significant, quantitative inter-species differences (a rat and a cynomolgus monkey *Macaca fascicularis*, Fig. 2). It has been emphasised that quantitative discrepancies between species could result not only from quantitatively disproportionate metabolism but also from disproportionate elimination pathways (Schadt et al., 2018).

Metabolites, although they have a similar chemical structure to their parent compounds, can differ from them in a number of physicochemical and, consequently, pharmacological and toxicological, properties. It is for this reason that a metabolite should always be considered as an independent substance during implemental research and testing. Metabolites can have a stronger, weaker, or equal impact with the same or a different molecular target as the parent compound or interact non-specifically with macromolecules.

Toxic properties or undesirable pharmacological activity are much more often exhibited by phase I metabolites due to the presence of a reactive functional group, but unfortunately they are often difficult to determine in vivo due to their short half-life in the body. Phase II metabolites are much more frequently identified, but show toxic properties far more rarely; acyl derivatives are the exception here. Federal Drug Administration guidance stipulates a full, separate safety assessment where a metabolite in humans constitutes more than 10% of the total drug amount (the parent compound and its metabolites).

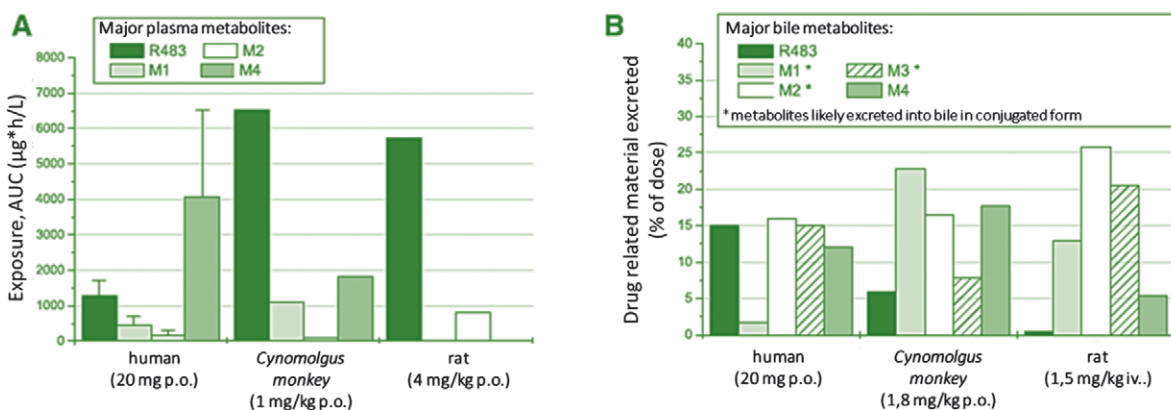


Figure 2. An example of disproportionate R483 metabolism: human, cynomolgus monkey, and rat – adapted from Schadt et al. (2018).

## 5. In vitro tools used in biotransformation testing

The tools on which in vitro metabolism analyses most often rely are microsomes, cytosol, and S9 fraction. All are formed by homogenising a selected tissue, which is usually, since it is responsible for the majority of biotransformation processes, from the liver (human or animal), although homogenates from other tissues can equally well serve the same purpose.

Centrifugation at  $9,000 \times g$  produces a supernatant known as S9 fraction, which contains the majority of the enzymes present in the cell (as discussed in section 1). Further differential centrifugation of the supernatant (S9 fraction) at acceleration ranges of  $10,000 \times g$  to  $100,000 \times g$  (depending on standardisation) yields a cytosolic fraction (HLC) and a pellet which, washed and re-centrifuged, constitutes the microsomal fraction (Fig. 3).

The microsomal fraction (microsomes) mainly contains the enzymes located on the smooth endoplasmic reticulum, namely cytochromes P450 (CYP), flavin monooxygenases (FMO), and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). Because these are the phase I and phase II enzymes that play the major role in the biotransformation of xenobiotics, this is a widely-used testing tool that is also applied to analyses of the metabolism of many structurally, pharmacologically, and functionally different NPSs, which include methamphetamine (Hong et al., 2021) and MeOPP (Staacck, Theobald, Paul, Springer, Kraemer, Maurer, 2004) as well as the following aminoindan derivatives: 2-AI, NM-2AI (Manier, Felske, Zapp, Eckstein, Maurer, 2020), AMB-FUBINACA (Xu et al. 2019), JWH-018 (Wintermeyer et al. 2010), AB-CHMINACA (Erratico et al., 2015), Cumyl-CH-MEGACLONE (Haschimi et al. 2021), 25I-NBOMe/25I-NBOH (Nielsen et al., 2017), 4-HO-MET (Bruni, Grafinger, Nussbaumer, König, Schürch, Weinmann, 2018), and U-47700/U-49900 (Krotulski, Mohr, Papsun, Logan, 2018). To initiate the phase I reaction, it is necessary to add NADPH as a cofactor for the P450 cytochromes. However, in order to continue phase II, it is necessary to use UDPGA (uridine diphosphate glucuronic acid – active

glucuronic acid), which is a cofactor for the UGT enzyme, and additional reagents to enable the reaction, such as alamethicin or  $MgCl_2$  (Table 1).

The use of cytosol fraction is an important complement to the microsomal fraction. The cytosol of the cell contains sulfotransferases (SULT) and the cytosolic form of catechol-O-methyltransferase (SCOMT). Experiments using only cytosol are rarely found in the literature, as it lacks most of the pertinent enzymes. Far more often, cytosol is combined with microsomal fraction, such as MDMA and its derivatives (Richter, Flockerzi, Msurer, Meyer, 2017),  $\alpha$ -PVP/MDPV (Ne-greira et al. 2015), and diphenidine (Wink, Michely, Jacobsen-Bauer, Zapp, Maurer, 2016).

S9 fraction contains a set of metabolising enzymes that is most similar – both qualitatively and quantitatively – to the set of enzymes contained in the cell. These enzymes therefore also require the use of appropriate cofactors: NADPH and UDPGA S9 fraction is used in analyses of the metabolism of the following NPSs: 4-EA-NBOMe (Caspar, Westpahl, Meyer, Maurer, 2018), N-ethyl-N-propyltryptamine (Manier et al., 2021) and aminoindan derivatives: 2-AI and NM-2-AI (Manier et al., 2020), XLR-11, AB-PINACA, FUB-PB-22, 4-methoxy- $\alpha$ -PVP, 25I-NBOMe, and meclonazepam (Richter et al., 2017).

Table 1  
The occurrence of enzymes involved in the metabolism of xenobiotics in subcellular fractions of the liver

Metabolic enzymes	Human liver microsomes	Liver S9 fractions	Liver cytosol
cytochromes P450 (CYP)	✓	✓	
flavin monooxygenase (FMO)	✓	✓	
glutathione-S-transferase (GST)		✓	
monoamine oxidase (MAO)		✓	

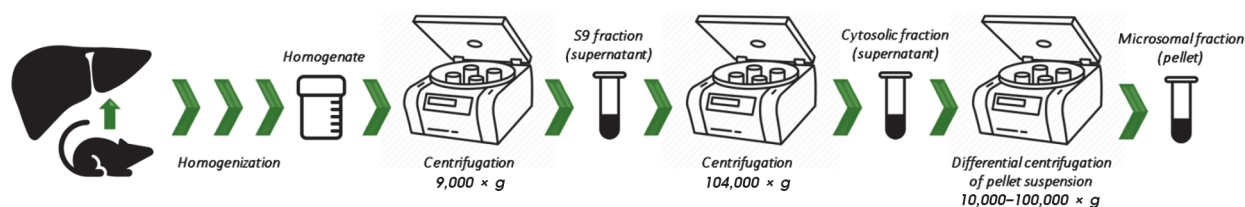


Figure 3. Differential centrifugation of liver homogenate.

Metabolic enzymes	Human liver microsomes	Liver S9 fractions	Liver cytosol
sulfotransferase (SULT)		✓	✓
uridine glucuronide transferase (LIGT)	✓	✓	
catechol-O-methyltransferase (COMT)	✓	✓	✓
alcohol dehydrogenase (ADH)		✓	✓
epoxide hydrolases (EH)	✓	✓	
aldehyde oxidase (AO)		✓	✓

During the experiments, when incubating the synthetic opioid U-47700 using human liver microsomes (HLM) and the human S9 fraction as set out in Figure 4., the authors too became convinced of the significant difference in enzyme content and, consequently, of the significant difference in the metabolites obtained.

The compound was incubated separately with the S9 fraction (Graph A) and with HLM (Graph B) at five time points in the manner set out in Figure 4. and the metabolite concentrations shown in the graphs were obtained (Fig. 5).

Cell lines, such as HepG2, Hep3B or PLC/PRF/5, constitute another method of testing metabolism. It used to be used mainly for potential drugs but is now being used more and more often to test NPSs also. They are usually cancer cell lines, which means that they have an infinite potential to proliferate and possess a stable metabolism. It should not be forgotten,

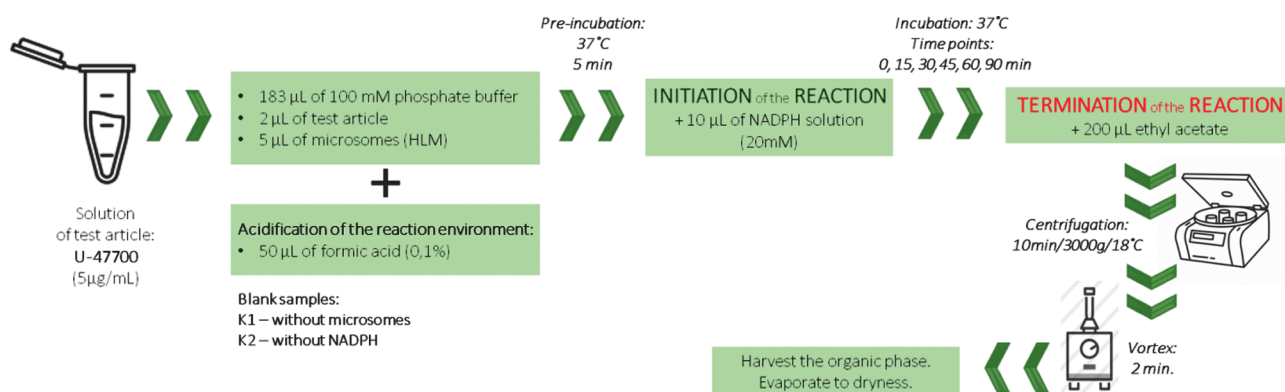


Figure 4. The workflow of the experiment.

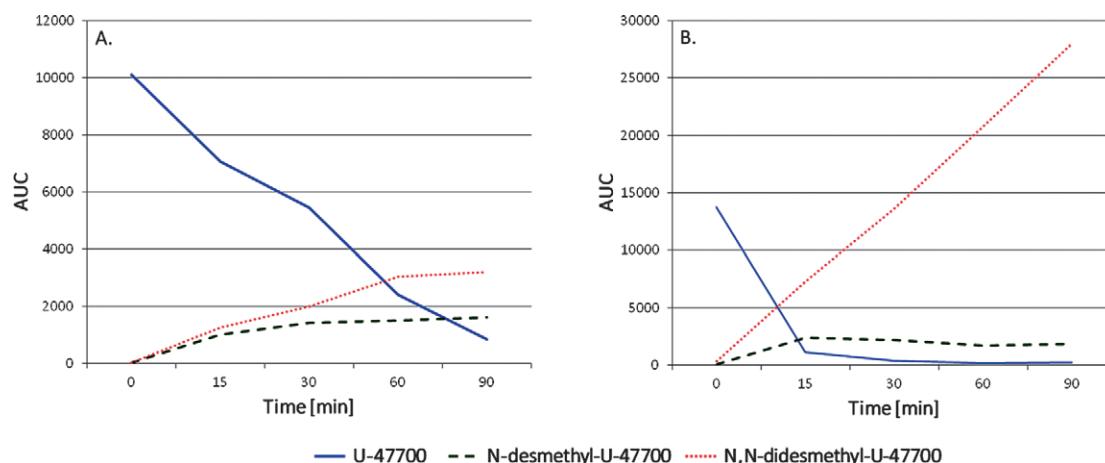


Figure 5. Results of in vitro experiment with the application of S9 fraction (A) and HLM (B) to evaluate the progress of the biotransformation of the compound U-47700 with simultaneous formation of the metabolites N-desmethyl-U-47700 and N,N-didesmethyl-U-47700.

however, that their metabolism can differ in certain ways from the metabolism of physiological cells.

Primary liver cell cultures and the use of liver sections are considered the gold standard for in vitro metabolism studies. These methods allow for the most faithful representation of the metabolism occurring in the body. However the material is very impermanent as the primary cultures begin to lose their properties after only 24 hours (Klaś, Guzy, Piska, Wójcik-Pszczola, Koczurkiewicz-Adamczyk, Pękala, 2018).

### 5.1. The advantages of in vitro testing

In vivo animal metabolism testing makes it possible to assess the overall metabolism of a test substance, but it should be borne in mind that biotransformation in animals and humans can differ quantitatively and qualitatively. That it is possible to assess the adequacy of a model and to select the most appropriate laboratory animal species when compared with metabolism in human cells and cell fractions is therefore one of the most frequently mentioned advantages of in vitro testing. This means of analysis also produces preliminary information and makes it possible to optimise experiments.

While in vivo methods used to investigate biotransformation only provide an understanding of this process as a whole, the use of their in vitro counterparts permits an evaluation of fragments, because each cell fraction (microsomes, S9 fraction, cytosol) contains a different set of enzymes. Modern biotechnological tools even make it possible to obtain microsomes containing only one isoform of cytochrome P450, making it possible to establish which isoforms are responsible for the appearance of the metabolite in question. Insect cells transfected with the human genes of our desired protein, in which heterologous expression is effected, are good examples of these tools (Robak, Walczak, 2009). Finally, by proceeding in accordance with the 3Rs when using in vitro methods they produce another, ethical advantage: reducing the number of animals used in the experiments.

## 6. The importance of metabolism testing (NPSs)

While no one questions the necessity for pharmacokinetic analyses and metabolite safety assessments in studies of new drugs, some may question their importance and relevance in the case of NPSs. Leaving aside the purely cognitive dimension, knowledge of the biotransformation of NPSs can find very real

applications. In fact, compiling correct toxicology reports for consideration by a court can depend on knowledge of their metabolism. Cases arise in which it is not possible to determine the parent compound in the autopsy (or vital) material. It is then that the metabolites are determined instead.

The understanding that metabolites can be pharmacologically active, and that their properties can differ significantly when compared with parent compounds, means that metabolites and their activity have begun to be considered as intrinsic to the dynamics of poisoning and its effective treatment. The classic example is administering ethanol, which has a higher affinity for alcohol dehydrogenase and thus blocks methanol metabolism, as an antidote to methanol poisoning, in which the potent poison is in fact its metabolite: formaldehyde. This is an old but excellent example of how knowledge of metabolism and the properties of metabolites permitted the development of increasingly effective treatment algorithms.

In addition, knowledge of the metabolites and elimination pathways of NPSs can help to establish the consumption of drugs with metabolites/biomarkers common to a particular group or skeletal structure of NPSs and be used to devise rapid diagnostic tests to identify the ingestion of an illicit substance. Tests of this kind can be applied not only in hospital emergency departments, but also among non-medical personnel such as police officers, teachers, sports coaches, and parents.

## References

1. Bruni, P. S., Grafinger, K. E., Nussbaumer, S., König, S., Schürch, S., Weinmann, W. (2018). Study of the in vitro and in vivo metabolism of 4-HO-MET. *Forensic Science International*, 290, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.06.037>.
2. Caspar, A. T., Westphal, F., Meyer, M. R., Maurer, H. H. (2018). LC-high resolution-MS/MS for identification of 69 metabolites of the new psychoactive substance 1-(4-ethylphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]propane-2-amine (4-EA-NBOMe) in rat urine and human liver S9 incubates and comparison of its screening power wit. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 897–912. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0526-0>.
3. Correia, M. A. (2012). Drug biotransformation. (In) G. B. Katzung, B. S. Masters, J. A. Trevor, *Basic and Clinical Pharmacology* (pp. 53–68). The McGraw-Hill Companies, Inc.



4. Erratico, C., Negreira, N., Norouzizadeh, H., Covaci, A., Neels, H., Maudens, K., van Nuijs, A. L. N. (2015). In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Testing and Analysis*, 7(10), 866–876. <https://doi.org/10.1002/dta.1796>.
5. Gaunitz, F., Thomas, A., Fietzke, M., Franz, F., Auwärter, V., Thevis, M., Mercer-Chalmers-Bender, K. (2019). Phase I metabolic profiling of the synthetic cannabinoids THJ-018 and THJ-2201 in human urine in comparison to human liver microsome and cytochrome P450 isoenzyme incubation. *International Journal of Legal Medicine*, 133(4), 1049–1064. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1964-8>.
6. Haschimi, B., Giorgetti, A., Mogler, L., Nagy, T. Z., Kramer, S., Halter, S., Boros, S., Dobos, A., Hidvégi, E., Auwärter, V. (2021). The novel psychoactive substance cumyl-CH-MEGACLONE: Human phase-I metabolism, basic pharmacological characterization and comparison to other synthetic cannabinoid receptor agonists with a  $\gamma$ -carboline-1-one core. *Journal of Analytical Toxicology*, 45(3), 277–290. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa065>.
7. Hong, Y., Kim, Y. H., Lee, J. M., Yoo, H. H., Choi, S. O., Kang, M. S. (2021). Characterization of in vitro phase I metabolites of methamphetamine in human liver microsomes by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1471–1476. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02594-z>.
8. Kim, J. H., Kim, S., Lee, J., In, S., Cho, Y. Y., Kang, H. C., Lee, J. Y., Lee, H. S. (2019). In vitro metabolism of 25B-NBF, 2-(4-bromo-2, 5-dimethoxyphenyl)-N-(2-fluorobenzyl)ethanamine, in human hepatocytes using liquid chromatography–mass spectrometry. *Molecules*, 24(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24040818>.
9. Kłaś, K., Guzy, P., Piska, K., Wójcik-Pszczola, K., Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Pękala, E. (2018). Zastosowanie modeli in vitro w przedklinicznych badaniach bezpieczeństwa nowych kandydatów na leki. *Farmacja Polska*, 74(1), 45–51.
10. Krechniak, J. (2007). Absorbacja, dystrybucja, biotransformacja i wydalanie trucizn. (In) W. Seńczuk (red.), *Toksykologia współczesna* (pp. 55–153). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
11. Krotulski, A. J., Mohr, A. L. A., Papsun, D. M., Logan, B. K. (2018). Metabolism of novel opioid agonists U-47700 and U-49900 using human liver microsomes with confirmation in authentic urine specimens from drug users. *Drug Testing and Analysis*, 10(1), 127–136. <https://doi.org/10.1002/dta.2228>.
12. Lee, S. K., Kang, M. J., Jin, C., In, M. K., Kim, D. H., Yoo, H. H. (2009). Flavin-containing monooxygenase 1-catalysed N,N-dimethylamphetamine N-oxidation DMA. *Xenobiotica*, 39(9), 680–686. <https://doi.org/10.1080/00498250902998699>.
13. Manier, S. K., Felske, C., Eckstein, N., Meyer, M. R. (2020). The metabolic fate of two new psychoactive substances – 2-aminoindane and N-methyl-2-aminoindane – studied in vitro and in vivo to support drug testing. *Drug Testing and Analysis*, 12(1), 145–151. <https://doi.org/10.1002/dta.2699>.
14. Manier, S. K., Felske, C., Zapp, J., Eckstein, N., Meyer, M. R. (2021). Studies on the in vitro and in vivo metabolic fate of the new psychoactive substance N-ethyl-N-propyltryptamine for analytical purposes. *Journal of Analytical Toxicology*, 45(2), 195–202. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa060>.
15. Meyer, M. R., Maurer, H. H. (2009). Enantioselectivity in the methylation of the catecholic phase I metabolites of methylenedioxy designer drugs and their capability to inhibit catechol-o-methyltransferase-catalyzed dopamine 3-methylation. *Chemical Research in Toxicology*, 22(6), 1205–1211. <https://doi.org/10.1021/tx900134e>.
16. Murray, K. R. (1995). Metabolizm ksenobiotyków. (In) K. D. Granner, A. P. Mayes, M. W. Rodwell, *Biochemia Harpera* (pp. 817–823). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
17. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, K. H., Menzel, S., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2012). Farmakokinetyka. Biotransformacja. (In:) *Farmakologia i toksykologia* (pp. 21–34). Wrocław: MedPharm Polska.
18. Negreira, N., Erratico, C., Kosjek, T., van Nuijs, A. L. N., Heath, E., Neels, H., Covaci, A. (2015). In vitro Phase I and Phase II metabolism of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP), methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(19), 5803–5816. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8763-6>.
19. Nielsen, L. M., Holm, N. B., Leth-Petersen, S., Kristensen, J. L., Olsen, L., Linnet, K. (2017). Characterization of the hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 25I-NBOMe and 25I-NBOH. *Drug Testing and Analysis*, 9(5), 671–679. <https://doi.org/10.1002/dta.2031>.
20. Pettersson Bergstrand, M., Richter, L. H. J., Maurer, H. H., Wagmann, L., Meyer, M. R. (2019). In vitro glucuronidation of designer benzodiazepines by human UDP-glucuronyltransferases. *Drug Testing and Analysis*, 11(1), 45–50. <https://doi.org/10.1002/dta.2463>.
21. Richter, L. H. J., Flockerzi, V., Maurer, H. H., Meyer, M. R. (2017). Pooled human liver preparations, HepaRG, or HepG2 cell lines for metabolism studies of new psychoactive substances? A study using MDMA, MDBD, butylone, MDPPP, MDPV, MDPB, 5-MAPB, and 5-API as examples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.028>.

22. Richter, L. H. J., Maurer, H. H., Meyer, M. R. (2017). New psychoactive substances: Studies on the metabolism of XLR-11, AB-PINACA, FUB-PB-22, 4-methoxy- $\alpha$ -PVP, 25-I-NBOMe, and meclonazepam using human liver preparations in comparison to primary human hepatocytes, and human urine. *Toxicology Letters*, 280, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.901>.
23. Robak, M., Walczak, E. (2009). Niekonwencjonalne drożdże w produkcji heterologicznych białek. *Biotechnologia*, 4(4), 54–73.
24. Sapota, A. (2017). Drogi wchłaniania, metabolizm i wydalanie ksenobiotyków. (In) K. J. Piotrowski (red.), *Podstawy toksykologii. Kompendium dla studentów szkół wyższych* (pp. 63–86). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
25. Sauer, C., Peters, F. T., Schwaninger, A. E., Meyer, M. R., Maurer, H. H. (2009). Investigations on the cytochrome P450 (CYP) isoenzymes involved in the metabolism of the designer drugs N-(1-phenyl cyclohexyl)-2-ethoxyethanamine and N-(1-phenylcyclohexyl)-2-methoxyethanamine. *Biochemical Pharmacology*, 77(3), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.024>.
26. Schadt, S., Bister, B., Chowdhury, S. K., Funk, C., Hop, C. E. C. A., Humphreys, W. G., Igarashi, F., Alexander, D. J., Kagan, M., Khojasteh, S. C., Nedderman, A. N. R., Prakash, C., Runge, F., Scheible, H., Spracklin, D. K., Swart, P., Tse, S., Yuan, J., Obach, R. S. (2018). A decade in the MIST: Learnings from investigations of drug metabolites in drug development under the “metabolites in safety testing” regulatory guidance. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(6), 865–878. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.079848>.
27. Schwaninger, A. E., Meyer, M. R., Zapp, J., Maurer, H. H. (2012). Investigations on the stereoselectivity of the phase II metabolism of the 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) metabolites 3,4-dihydroxyethylamphetamine (DHEA) and 4-hydroxy-3-methoxyethylamphetamine (HMEA). *Toxicology Letters*, 212(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.021>.
28. Staack, R. F., Theobald, D. S., Paul, L. D., Springer, D., Kraemer, T., Maurer, H. H. (2004). In vivo metabolism of the new designer drug 1-(4-methoxyphenyl)piperazine (MeOPP) in rat and identification of the human cytochrome P450 enzymes responsible for the major metabolic step. *Xenobiotica*, 34(2), 179–192. <https://doi.org/10.1080/00498250310001644544>.
29. Teksin, Z. S., Lee, I. J., Nemieboka, N. N., Othman, A. A., Upreti, V. V., Hassan, H. E., Syed, S. S., Prisinzano, T. E., Eddington, N. D. (2009). Evaluation of the transport, in vitro metabolism and pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.01.002>.
30. Theobald, D. S., Maurer, H. H. (2007). Identification of monoamine oxidase and cytochrome P450 isoenzymes involved in the deamination of phenethylamine-derived designer drugs (2C-series). *Biochemical Pharmacology*, 73(2), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.022>.
31. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, & (CDER). (2016). *Safety Testing of Drug Guidance for Industry Metabolites: Vol. Revision 1* (Issue November). Retrieved 20 October 2021 from: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
32. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, & (CDER). (2020). *Safety Testing of Drug Metabolites. Guidance for Industry*. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(09\)04422-4](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(09)04422-4).
33. Wink, C. S. D., Michely, J. A., Jacobsen-Bauer, A., Zapp, J., Maurer, H. H. (2016). Diphenidine, a new psychoactive substance: metabolic fate elucidated with rat urine and human liver preparations and detectability in urine using GC-MS, LC-MSn, and LC-HR-MSn. *Drug Testing and Analysis*, 8(10), 1005–1014. <https://doi.org/10.1002/dta.1946>.
34. Wintermeyer, A., Möller, I., Thevis, M., Jübner, M., Beike, J., Rothschild, M. A., Bender, K. (2010). In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(5), 2141–2153. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4171-0>.
35. Xu, D. Q., Zhang, W. F., Li, J., Wang, J. F., Qin, S. Y., Lu, J. H. (2019). Analysis of AMB-FUBINACA biotransformation pathways in human liver microsome and zebrafish systems by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Frontiers in Chemistry*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00240>.

---

**Corresponding author**

Beata Bystrowska  
Department of Biochemical Toxicology  
Chair of Toxicology  
Faculty of Pharmacy  
Jagiellonian University Medical College  
PL 30-688 Kraków, Polska  
ul. Medyczna 9  
e-mail: beata.bystrowska@uj.edu.pl

---

## METODY BADANIA METABOLIZMU NA PRZYKŁADZIE WYBRANYCH NOWYCH SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH (NSP)

### 1. Wstęp

Metabolizm definiuje się jako całokształt reakcji biochemicznych zachodzących w komórkach. Można go podzielić na metabolizm podstawowy, odpowiadający za przekształcanie i dalsze wykorzystywanie substancji pełniących określone funkcje w organizmie oraz metabolizm ksenobiotyków, mający na celu wydalenie (głównie z moczem, ale również z żółcią, potem czy mlekiem) z organizmu substancji obcych, zarówno korzystnych (leki), jak i szkodliwych (narkotyki, „dopalacze”), przez zwiększenie ich hydrofilowości (Ryc. 1). Tylko bardzo nieliczne substancje nie ulegają metabolizmowi – substancje bardzo polarne, które zostają wydalone z moczem (m.in. kwas szczawiowy, kwas fталowy), związki bardzo lotne wydalane przez nerki lub płuca (etery, anestetyki wziewne) lub związki silnie lipofilowe, które mają tendencję do kumulowania się w tkance tłuszczowej (niektóre dioksyny). Biotransformacja ksenobiotyków obejmuje dwie fazy: funkcjonalizacji i sprzęgania. W fazie funkcjonalizacji związki ulegają reakcjom utleniania, redukcji oraz hydrolizy mającym na celu zmniejszenie ich lipofilowości dzięki zwiększeniu liczby hydrofilowych grup funkcyjnych w cząsteczce (np. hydroksylowej, aminowej, karbonylowej etc.). Podczas fazy sprzęgania nowo powstałe polarne grupy funkcyjne ksenobiotyków zostają sprzęgnięte z dużymi polarnymi resztami, takimi jak kwas glukuronowy, siarkowy, octowy, glutation etc. Dopiero dzięki temu wiele ksenobiotyków może zostać wydalonych.

Biotransformacja zachodzi najintensywniej w wątrobie, ale również w jelicie cienkim, płucach, osoczu, skórze i gonadach. Z kolei na poziomie komórki największe zagęszczenie enzymów odpowiadających za biotransformację znajduje się w obrębie gładkiej siateczki śródplazmatycznej, ale niektóre z nich występują również w cytoplazmie. Niektóre enzymy produkowane przez wątrobę są wydzielane do krwi krążącej, np. amidazy i esterazy, i tam katalizują reakcje biotransformacji (Correia, 2012; Murray, 1995; Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Menzel, Ruth, Schäfer-Korting, 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007).

Celem przedstawionej pracy jest zaprezentowanie, na przykładach badań własnych autorów oraz dostępnej literatury, przeglądu najpopularniejszych metod alternatywnych badania metabolizmu NSP wobec badań *in vivo*.

### 2. Funkcjonalizacja – I faza metabolizmu

Pierwsza faza metabolizmu obejmuje głównie reakcje utleniania, redukcji oraz hydrolizy, mające na celu zwiększenie polarności ksenobiotyków. Właśnie w I fazie najczęściej powstają metabolity toksyczne.

#### 2.1. Utlenianie

Większość reakcji I fazy biotransformacji to reakcje utleniania, za które odpowiadają enzymy zwane oksydazami, które katalizują reakcję utleniania przez usunięcie wodoru lub elektronu oraz oksygenazy odpowiadające za wprowadzenie jednego (monooksygenazy) lub dwóch (dioksygenazy) atomów tlenu do cząsteczki ksenobiotyku.

Dominującą rolę pełnią monooksygenazy w typie cytochromu P450 (CYP) zawierające żelazoprotoporfirynę IX jako grupę prostetyczną. Katalizują bardzo szeroki zakres reakcji zależnych od NADPH oraz tlenu, m.in. reakcje hydroksylacji, epoksydacji, dealkilacji, N-/S-/O-oksydacji oraz dehalogenacji, zarówno związków alifatycznych, jak i aromatycznych. Cytochromy P450 występują w postaci wielu izoenzymów dzielonych na rodziny i podrodziny, występujących w komórkach zarówno konstytutywnie, jak i syntetyzowanych pod wpływem indukcji przez konkretny ksenobiotyk.

Cytochromy P450 odpowiadają za przemiany bardzo wielu grup NSP, co można badać, wykorzystując mikrosomy wątrobowe (ludzkie lub zwierzęce) zawierające większość izoform CYP lub mikrosomy przygotowane z owadnich komórek transfekowanych ludzkim genem odpowiedniej izoformy CYP (Gaunitz i in., 2019; Sauer, Peters, Schwaninger, Meyer, Maurer, 2009; Teksin i in., 2009; Theobald, Maurer, 2007).

Monooksygenazy flawinowe (FMO) również katalizują reakcje utleniania, zwłaszcza przy heteroatomach, np. utlenianiu trzeciorzędowych amin do tlenków amin oraz pierwszo- i drugorzędowych amin do N-hydroksyloamin. Różnią się jednak grupą prostetyczną (dinkleotydy flawinowy). Izomery FMO klasyfikowane są w pięciu grupach charakteryzujących się zmiennością substratową i narządową – u człowieka dominują izoformy FMO1, FMO2 i FMO3. W przeciwieństwie do CYP nie ulegają one indukcji pod wpływem ksenobiotyków, jednak charakteryzują się mniejszą specyficznością substratową. Dla monooksygenaz flawinowych również można uzyskiwać konkretne izoformy dzięki komórkom owadziom transfekowanym ludzkim genem. Znaczenie FMO dla biotransformacji NSP jest znacznie mniejsze

niż cytochromów – praktycznie rozpatruje się ją tylko dla związków posiadających heteroatomy, takich jak pochodne amfetaminy (Hong i in., 2021; Lee i in., 2009).

Monoaminoooksydazy (MAO) są enzymami katalizującymi reakcję oksydacyjnej deaminacji pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych amin, głównie endogennych amin katecholowych oraz pochodnych tryptaminy. Fizjologicznie reakcja ta ma pozornie wąskie i marginalne znaczenie, jednak działające na ten układ leki są na tyle ważne dla farmakoterapii wielu chorób, że pojawiła się cała grupa leków nazywanych inhibitorami monoaminoooksydaz (I-MAO). Badań ich udziału w biotransformacji NSP jest bardzo mało i dotyczą nielicznej grupy związków, np. związków z rodziny 2C lub pochodnych NBOMe (Nielsen, Holm, Leth-Petersen, Kristensen, Olsen, Linnet, 2017; Theobald, Maurer, 2007).

Katecholo-O-metylotransferazy (COMT) to enzymy z grupy transferaz przenoszące grupy metylowe, które fizjologicznie uczestniczą w degradacji katecholamin. Występują w dwóch formach: związanej z błoną komórkową (mbCOMT) oraz rozpuszczalnej w cytozolu (sCOMT). Metylacja grup hydroksylowych nie jest istotną drogą biotransformacji NSP, a metabolity zwykle nie wymagają dodatkowej analizy ryzyka toksykologicznego. Dlatego też w literaturze brakuje danych analizujących wybiórczo metabolizm przeprowadzany przez COMT. Jednak w wielu badaniach metabolizmu z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych lub cytozolu identyfikuje się pochodne metylowane, m.in.: MDMA (Meyer, Maurer, 2009).

Innym enzymem, o którym warto wspomnieć, mimo że nie odgrywa on znaczącej roli podczas biotransformacji NSP, jest hydroksylaza epoksydowa (EH). Jest to enzym bardzo istotny z toksykologicznego punktu widzenia, ponieważ neutralizuje on związki epoksydowe, powstające podczas przyłączania atomu tlenu do wiązań podwójnych lub podczas przemian związków aromatycznych przez CYP. Powstające wówczas pochodne epoksydowe charakteryzują się często znaczną toksycznością (np. karbamazepina → 10,11-epoksyd karbamazepiny) i dlatego hydroksylaza epoksydowa rozkłada je do pochodnych bifenolowych.

Kolejnymi enzymami są: dehydrogenaza alkoholowa (ADH), utleniająca alkohole do aldehydów, istotna zwłaszcza w kontekście metabolizmu etanolu, oraz oksydaza aldehydowa (ALDH), przekształcająca aldehydy w kwasy.

## 2.2. Redukcja

Znacznie mniejsze znaczenie w przemianach metabolicznych ma zachodząca w warunkach beztlenowych reakcja redukcji. Redukcja pełni istotną rolę w metabolizmie związków azowych oraz aromatycznych związków nitrowych do amin pierwszorzędowych, które

katalizują odpowiednio: reduktaza NADPH-cytochrom P450 oraz nitroreduktaza.

W biotransformacji ksenobiotyków takich jak halotan czy DDT ważną rolę odgrywa również reakcja reduktywnej dehalogenacji.

## 2.3. Hydroliza

Reakcje hydrolizy zachodzą głównie pod wpływem nieswoistych amidaz/esteraz do kwasów i alkoholi lub amin występujących wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo, we krwi krążącej, wątrobie, nerkach czy śledzionie. Esterazy katalizują rozkład zarówno estrów, jak i amidów, ale z różną szybkością (z reguły amidy wykazują większą trwałość). Dzieli się na 4 grupy w zależności od rodzaju substratu: aryloesterazy (rozkład estrów aromatycznych), karboksyesterazy (aliesterazy, rozkładające estry alifatyczne), cholinoesterazy (enzymy wyspecjalizowane do rozkładania estrów, w których alkoholem jest cholina) oraz acetyloesterazy (estry kwasu octowego).

Istotne w metabolizmie ksenobiotyków są również enzymy produkowane przez bakterie flory jelita grubego. Mogą one powodować hydrolizę metabolitów II fazy, które ulegają procesowi wchłaniania zwrotnego na drodze krążenia wątrobowo-jelitowego (Correia, 2012; Murray, 1995; Mutschler i in., 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007).

## 3. Sprzęganie – II faza metabolizmu

Podczas II fazy biotransformacji dzięki powstałej w I fazie grupie funkcyjnej metabolity ulegają sprzęganiu ze związkami endogennymi, co zazwyczaj powoduje ich bioinaktywację. Poza metabolitami metylowanymi i acylowanymi większość produktów sprzęgania ma charakter kwaśny i ulega jonizacji, co znacznie ułatwia wydalanie ich z moczem i żółcią. Metabolity II fazy są zazwyczaj nieaktywne biologicznie, choć zdarzają się wyjątki (np. 6-glukuronid morfiny). Sprzęganie zachodzi w dwóch fazach: aktywacja pod wpływem związku o dużej energii, a następnie przeniesienie grupy sprzęganej na cząsteczkę ksenobiotyku pod wpływem transferaz.

U człowieka najważniejszą reakcją II fazy jest sprzęganie z kwasem glukuronowym pod postacią aktywnego kwasu glukuronowego (kwas UDP-glukuronowy), którą katalizuje UDP-glukuronozylotransferaza (UGT). Enzym ten klasyfikuje się w dwie rodziny, do których należy łącznie 19 enzymów. Glukuronidacji ulega wiele związków endogennych oraz ksenobiotyków, w tym również NSP, m.in. AB-CHMINACA (Erratico i in., 2015), 25B-NBF (Kim i in., 2019) oraz pozamedyczne benzodiazepiny (Pettersson Bergstrand, Richter, Maurer, Wagnmann, Meyer, 2019).

Ważną reakcją II fazy jest również sprzężanie z aktywnym siarczanem (PAPS) dzięki sulfotransferazie (SULT), enzym ten występuje w kilkunastu izoformach różniących się specyfiką substratową i narządową i w niewielkim stopniu ulega indukcji. Sulfonowanie jako droga metabolizmu II fazy zostało opisane np. dla pochodnych amfetaminy: 3,4-metylenodiodoksyetyloamfetaminy (MDEA), 3,4-dihydroksyetyloamfetaminy (DHEA) i 4-hydroksy-3-metoksyetyloamfetaminy (HMEA) (Schwaninger, Meyer, Zapp, Maurer, 2012).

Inne reakcje II fazy to sprzężanie z acetylocysteiną, za które odpowiadają S-transferazy glutationowe (GST),  $\alpha$ -aminokwasami, głównie glicyną, ale również glutaminą, seryną i lizyną, katalizowane przez N-acetylotransferazy. Oba te enzymy występują zarówno we frakcji mikrosomalnej, jak i cytozolowej. Również acetylacja katalizowana przez N-acetylotransferazę (NAT) oraz mająca marginalne znaczenie metylacja (metylotransferaza tiolowa, TMT, oraz S-metylotransferaza tio-purynowa, TPMT) są reakcjami zaliczanymi do II fazy biotransformacji. (Correia, 2012; Murray, 1995; Mut-schler i in., 2012; Sapota, 2017; Krechniak, 2007).

#### 4. Standardy badania metabolizmu

Szczegółowa ocena parametrów farmakokinetycznych (procesy ADME), w szczególności szlaków biotransformacji oraz aktywności powstających metabolitów, jest bardzo ważnym elementem oceny bezpieczeństwa nowych substancji. Z jednej strony rozwój wiedzy na temat samego metabolizmu oraz potencjalnych właściwości metabolitów, które mogą znacząco różnić się od związków macierzystych i istotnie wpływać na bezpieczeństwo terapii, z drugiej również znaczący rozwój możliwości aparaturowych umożliwiły wykrywanie nawet śladowych ilości metabolitów. To wszystko zaczęło generować pytania: dla których metabolitów należy przeprowadzić osobną analizę ryzyka? Czy należy ustalić jakiś limit ilościowy metabolitu, czy szacować ryzyko na podstawie jego struktury chemicznej? Wszystkie te rozważania zaowocowały wydaniem przez FDA w 2008 roku instrukcji MIST [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration & (CDER), 2016] określających zasady i procedury badania bezpieczeństwa metabolitów dotyczące badania biotransformacji małych niebiologicznych związków (z wyłączeniem leków ewidentnie szkodliwych dla osób zdrowych, np. chemioterapeutyków). Wytyczne są wydawane regularnie, a ostatnia aktualizacja miała miejsce w 2020 roku [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration & (CDER), 2020].

Jako złoty standard badań farmakokinetycznych uznaje się badanie z wykorzystaniem związku znakowanego izotopem  $C^{14}$  oraz następane oznaczenie go

w osoczu, moczu oraz kale, a w przypadku zwierząt laboratoryjnych niekiedy również w tkankach. Zaleca ona, aby badania procesów ADME podejmować jak najwcześniej zarówno w badaniach przedklinicznych (z wykorzystaniem dwóch adekwatnych gatunków zwierząt), jak i klinicznych.

Wiele uwagi poświęca się zagadnieniu postępowania w przypadku tzw. metabolitu nieproporcjonalnego (*disproportionate drug metabolites*), w przypadku którego biotransformacja zachodząca u zwierząt doświadczalnych różni się ilościowo lub jakościowo w porównaniu do tej przebiegającej u człowieka. Definicja ma dość szerokie spektrum interpretacyjne, w związku z czym każdy dyskusyjny przypadek powinien być rozpatrywany osobno w oparciu o aktualne wytyczne, dostępną literaturę oraz indywidualne ustalenia. Przykładowo, jeżeli u zwierzęcia występuje w dużych ilościach metabolit, którego nie zidentyfikowano u człowieka (lub zidentyfikowano w bardzo małych ilościach), nie ma potrzeby dokładnego badania jego toksyczności. Natomiast w sytuacji gdy u człowieka w dużych ilościach występuje metabolit, którego nie wykryto u zwierząt, należy osobno przeprowadzić analizę toksyczności tego metabolitu – w tym celu rekomenduje się zmianę gatunku doświadczalnego bądź zsyntetyzowanie metabolitu i podanie go zwierzęciu [U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration & (CDER), 2020]. Warto pamiętać, że orzec o nieproporcjonalności danego metabolitu można jedynie w przypadku pełnego badania ADME – może się okazać, że metabolity powstają w podobnych stosunkach, ale ulegają innym drogom dystrybucji lub eliminacji.

W publikacji opisującej dyskusyjne przypadki badań ADMET na przestrzeni 10 lat od wprowadzenia wytycznych FDA opisano przypadek związku R483, który docelowo miał być lekiem przeciwcukrzycowym. Badania *in vitro* przeprowadzone z użyciem ludzkich i zwierzęcych komórek wykazały, że metabolizm jest porównywalny jakościowo, jednak badania *in vivo* na zwierzętach i z udziałem ludzi wykazały znaczne różnice ilościowe między gatunkami (szczur oraz makak krabożerny; Ryc. 2). Podkreślono, że niezgodności ilościowe pomiędzy gatunkami mogły wynikać nie tylko z niewspółmiernego ilościowo metabolizmu, ale również z nieproporcjonalnych dróg eliminacji (Schadt i in., 2018).

Metabolity, pomimo że posiadają zbliżoną budowę chemiczną do związków macierzystych, mogą się od nich różnić szeregiem właściwości fizykochemicznych, a w konsekwencji farmakologicznych i toksykologicznych. Dlatego podczas badań wdrożeniowych należy zawsze rozpatrywać metabolit jako niezależną substancję. Metabolity mogą oddziaływać silniej/słabiej/w równym stopniu z tym samym lub innym celem molekularnym co związek macierzysty lub oddziaływać niespecyficzenie na makromolekuły.

Właściwości toksyczne lub niepożądaną aktywność farmakologiczną znacznie częściej wykazują metabolity I fazy z uwagi na obecność reaktywnej grupy funkcyjnej, jednak niestety często trudno je oznaczyć w badaniach *in vivo* ze względu na krótki okres półtrwania w organizmie. Znacznie częściej oznacza się metabolity II fazy, te jednak wykazują znacznie rzadziej właściwości toksyczne; wyjątkiem się tu pochodne acylowe. Zgodnie z wytycznymi FDA jeżeli metabolit u ludzi stanowi więcej niż 10% ogólnej ilości leku (zw. macierzysty oraz jego metabolity), należy przeprowadzić dla niego osobną, pełną ocenę bezpieczeństwa.

## 5. Narzędzia *in vitro* wykorzystywane w badaniu biotransformacji

Najczęściej wykorzystywanymi narzędziami w badaniach metabolizmu *in vitro* są mikrosomy, cytozol oraz frakcja S9. Wszystkie powstają po homogenizacji wybranej tkanki, najczęściej wątroby (ludzkiej bądź zwierzęcej), ponieważ odpowiada ona za większość procesów biotransformacji, choć nic nie stoi na przeszkodzie, aby wykorzystać homogenaty innych tkanek.

Wirowanie przy  $9000 \times g$  skutkuje otrzymaniem supernatantu zwanego frakcją S9, która zawiera większość enzymów występujących w komórce (jak zostało omówione w rozdziale 1). Dalsze różnicujące wirowanie supernatantu (frakcji S9) w zakresach przyspieszenia  $10\ 000$  do  $100\ 000 \times g$  (w zależności od standaryzacji) pozwala otrzymać frakcję cytozolową (HLC) oraz pellet, który przemyty i ponownie zwirowany stanowi frakcję mikrosomalną (Ryc. 3).

Frakcja mikrosomalna (mikrosomy) zawiera głównie enzymy znajdujące się na siateczce śródplazmatycznej gładkiej, czyli cytochromy P450 (CYP), monooksygenazy flawinowe (FMO) oraz UDP-glukuronozylotransferazę (UGT). Ponieważ są to enzymy I oraz II fazy odgrywające największą rolę w biotransformacji ksenobiotyków, jest to narzędzie badawcze bardzo często wykorzystywane również podczas oceny metabolizmu wielu różnych (strukturalnie, farmakologicznie, funkcjonalnie) NSP, m.in.: metamfetaminy (Hong i in., 2021), MeOPP (Staack, Theobald, Paul, Springer, Kraemer, Maurer, 2004), pochodnych aminoindanu: 2-AI, NM-2AI (Manier, Felske, Zapp, Eckstein, Maurer, 2020), AMB-FUBINACA (Xu i in., 2019), JWH-018 (Wintermeyer i in., 2010), AB-CHMINACA (Erratico i in., 2015), Cumyl-CH-MEGACLONE (Haschimi i in., 2021), 25I-NBOMe/25I-NBOH (Nielsen, Holm, Leth-Petersen, Kristensen, Olsen, Linnet, 2017), 4-HO-MET (Bruni, Grafinger, Nussbaumer, König, Schürch, Weinman, 2018), U-47700/U-49900 (Krotulski, Mohr, Papsun, Logan, 2018). W celu zainicjowania reakcji I fazy

należy dodać kofaktor dla cytochromów P450 – NADPH, natomiast w celu kontynuowania II fazy – użyć kofaktora enzymu UGT – UDPGA (kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy – aktywny kwas glukuronowy) oraz dodatkowych odczynników umożliwiających zachodzenie reakcji, takich jak alometacyna czy  $MgCl_2$  (Tabela 1).

Ważnym uzupełnieniem frakcji mikrosomalnej jest użycie frakcji cytozolowej. Cytozol komórki zawiera sulfotransferazy (SULT) oraz formę cytozolową katecholo-O-metylotransferazy (sCOMT). Rzadko w literaturze spotyka się eksperymenty z wykorzystaniem wyłącznie cytozolu, ponieważ nie zawiera on większości istotnych enzymów. Znacznie częściej łączy się cytozol z frakcją mikrosomalną, np. MDMA oraz jego pochodne (Richter, Flockerzi, Msurer, Meyer, 2017),  $\alpha$ -PVP/MDPV (Negreira i in., 2015), difenidyna (Wink, Michely, Jacobsen-Bauer, Zapp, Maurer, 2016).

Frakcja S9 zawiera zestaw enzymów metabolizujących, najbardziej zbliżony zarówno jakościowo jak i ilościowo do zestawu enzymów zawartych w komórce, dlatego również wymagają użycia odpowiednich kofaktorów: NADPH i UDPGA. Frakcję S9 wykorzystano praktycznie podczas badania metabolizmu następujących NSP: 4-EA-NBOMe (Caspar, Westpahl, Meyer, Maurer, 2018), N-etylo-propylotryptamina (Manier i in., 2021), pochodne aminoindanu: 2-AI oraz NM-2-AI (Manier i in., 2020), XLR-11, AB-PINACA, FUB-PB-22, 4-methoxy- $\alpha$ -PVP, 25-I-NBOMe, meclonazepam (Richter i in., 2017).

O istotnej różnicy w zawartości enzymów oraz w konsekwencji znacznej różnicy w uzyskanych metabolitach przekonali się sami autorzy podczas eksperymentów: podczas prowadzenia inkubacji syntetycznego opioиду U-47700 z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów wątrobowych (HLM) oraz ludzkiej frakcji S9 zgodnie z ryciną 4.

Związek inkubowano osobno z frakcją S9 (A) oraz z HLM (B) w 5 punktach czasowych według schematu załączonego na rycinie 4 i otrzymano stężenia metabolitów zobrazowane na wykresach A i B (Ryc. 5).

Innymi metodami badania metabolizmu, kiedyś wykorzystywanymi głównie do badań potencjalnych leków, a dziś coraz częściej również do badań NSP, są linie komórkowe (np. HepG2, Hep3B lub PLC/PRF/5). Są to najczęściej linie komórek nowotworowych, co oznacza, że mają nieskończony potencjał do proliferacji oraz wykazują stabilny metabolizm. Należy jednak pamiętać, że ich metabolizm może się w pewien sposób różnić od metabolizmu komórek fizjologicznych.

Za złoty standard badań metabolizmu *in vitro* uznaje się pierwotne hodowle komórkowe komórek wątroby oraz wykorzystywanie skrawków wątroby. Są to metody umożliwiające najwierniejsze oddanie metabolizmu zachodzącego w organizmie, jednak jest to materiał bardzo

nietrwały, już po 24 godzinach hodowle pierwotne zaczynają tracić swoje właściwości (Klaś, Guzy, Piska, Wójcik-Pszczola, Koczurkiewicz-Adamczyk, Pękala, 2018).

### 5.1. Zalety badań *in vitro*

Badanie metabolizmu *in vivo* na zwierzętach pozwala na ocenę całościowego metabolizmu badanej substancji, jednak należy pamiętać, że biotransformacja u zwierząt i ludzi może różnić się ilościowo i jakościowo. Dlatego wśród najczęściej wymienianych zalet badań *in vitro* wskazuje się możliwość oceny adekwatności modelu oraz dobór najodpowiedniejszego gatunku doświadczalnego w porównaniu do metabolizmu przeprowadzanego przez ludzkie komórki i frakcje komórkowe. Badania *in vitro* dostarczają również informacji wstępnych i umożliwiają zoptymalizowanie doświadczenia.

Wykorzystując metody *in vivo* do badania biotransformacji, poznajemy ten proces wyłącznie całościowo, natomiast wykorzystując metody *in vitro*, mamy możliwość oceny fragmentarycznej, ponieważ każda frakcja komórkowa (mikrosomy, frakcja S9, cytozol), zawiera inny zestaw enzymów. Nowoczesne narzędzia biotechnologiczne umożliwiają wręcz otrzymywanie mikrosomów zawierających tylko jedną izoformę cytochromu P450, pozwalając ustalać, które izoformy odpowiadają za pojawienie się odpowiednich metabolitów. Przykładem takich narzędzi są owadzie komórki transfekowane ludzkimi genami pożądanego przez nas białka, ulegające heterologicznej ekspresji (Robak, Walczak, 2009). Oczywiście wśród zalet stosowania metod *in vitro* niewątpliwie wymienić należy aspekty etyczne, czyli ograniczenie liczby zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach zgodne z zasadą 3R.

## 6. Znaczenie badań metabolizmu (NSP)

O ile w przypadku badań nowych leków nikt nie podważa konieczności przeprowadzania analiz farmakokinetycznych oraz oceny bezpieczeństwa metabolitów, to w przypadku nowych substancji psychoaktywnych (NSP) pojawić może się pytanie, czy rzeczywiście są one istotne.

Pomijając aspekt czysto poznawczy, wiedza o biotransformacji NSP może znaleźć bardzo realne zastosowania. Znajomość metabolizmu NSP jest istotna dla poprawnego wydania ekspertyzy toksykologicznej na potrzeby opiniowania sądowego. Zdarzają się przypadki, w których nie ma możliwości oznaczenia w materiale sekcyjnym (czy przyżyciowym) związku macierzystego – wtedy oznacza się właśnie metabolity.

Zrozumienie, że metabolity mogą być aktywne farmakologicznie, oraz że ich właściwości mogą znacząco

różnić się w porównaniu ze związkami macierzystymi, spowodowało, że zaczęto rozpatrywać metabolity i ich aktywność w dynamice zatrucia oraz skutecznym jego leczeniu. Klasycznym przykładem jest zatrucie metanolem, w którym silną trucizną jest tak naprawdę jego metabolit – aldehyd mrówkowy. Jako odtrutkę w zatruciu metanolem podawano etanol, który ma większe powinowactwo do dehydrogenazy alkoholowej i dzięki temu blokuje metabolizm metanolu. Jest to stary, ale i znakomity przykład na to, jak znajomość metabolizmu i właściwości metabolitów pozwalały opracowywać coraz skuteczniejsze algorytmy leczenia.

Ponadto poznanie metabolitów oraz dróg wydalenia NSP może przyczynić się do ustalenia zażycia metabolitów/biomarkerów wspólnych dla danej grupy czy szkieletu strukturalnego NSP i zostać wykorzystane do opracowania szybkich testów diagnostycznych identyfikujących zażycie nielegalnej substancji. Testy takie znalazłyby zastosowanie nie tylko na szpitalnych oddziałach ratunkowych, ale również wśród personelu niemedycznego, takiego jak policjanci, nauczyciele, trenerzy sportowi czy rodzice.