

Vesiympäristön antibioottijäämien aiheuttama sytokromi P450 -entsyymien inhibitio kaloissa

→ Tea Pihlaja

Proviisori, tohtorikoulutettava
Farmasian tiedekunta,
Farmaseuttisen kemian
ja teknologian osasto,
Lääketutkimusohjelma,
Helsingin yliopisto

→ Sanna Niemissalo

Farmaseutti, proviisoriopiskelija
Farmasian tiedekunta,
Helsingin yliopisto

→ Tiina Sikanen*

Dosentti, FaT, DI, Akatemiaturkija
Farmasian tiedekunta,
Farmaseuttisen kemian
ja teknologian osasto,
Lääketutkimusohjelma,
Helsingin yliopisto
tiina.sikanen@helsinki.fi

*Kirjeenvaihto

TIIVISTELMÄ

Johdanto: Vesiympäristössä havaitaan merkittäviä määriä lääkejäämiä, jotka kertyvät ihmisten käyttämistä lääkkeistä, virheellisesti hävitetyistä lääkejätteistä sekä lääkkeiden tuotannosta. Vesiympäristöstä lääkejäämät voivat siirtyä myös muihin eliöihin, joissa ne voivat aiheuttaa paitsi toksisia myös muita pitkäaikaisvaikutuksia. Näitä haittavaikutuksia tutkitaan muun muassa kaloilla. Kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*) on standardoiduissa ekotoksisuustesteissä (OECD) tyypillisesti käytetty mallilaji. Ihmislääkkeiden jäämiä on kuitenkin mitattu myös luonnonvesissä elävistä kaloista. Lääkejäämien rikastumisen (bioakkumulaatio) kannalta keskeisessä asemassa on vierasaineiden eliminaatiota välittävien sytokromi P450 (CYP) -entsyymien aktiivisuus kaloissa. Koska kalat altistuvat vesiympäristössä yhtäaikaaisesti lukuisille eri lääkeaineille, joista monilla on taipumus inhiboida CYP-järjestelmää (ihmisessä), on CYP-välitteiseen ominaispuhdistumaan kohdistuva yhteisvaikutusriski erityisen suuri luonnonvesissä elävissä kaloissa.

Aineisto ja menetelmät: Tässä työssä tutkittiin seitsemän antimikrobisen lääkeaineen (erytromysiini, ketokonatsoli, klaritromysiini, klotrimatsoli, mikonatsoli, siprofloksasiini ja sulfametoksatsoli) vaikutusta kalan 7-etoksiresorufiinin O-de-etylaation (EROD) ja 7-bentsyylioksi-4-trifluorimetyyli-kumariinin O-debentsylylaation (BFCOD) aktiivisuuteen *in vitro*. Näiden mallireaktioiden tiedetään korreloivan kalan CYP1A- (EROD) ja CYP3A-entsyymien (BFCOD) aktiivisuuksien kanssa. Mallireaktioiden lähtöaktiivisuudet sekä kunkin lääkeaineen aiheuttama suhteellinen entsyymi-inhibitio (*engl.* half maximal inhibitory constant, IC₅₀) mitattiin fluoresenssispektrometrisesti kirjolohen maksamikrosomeissa. Kullekin lääkeaineelle määritettyä näennäistä IC₅₀-inhibitiovakiota verrattiin tunnettuihin IC₅₀-vakioihin ihmisessä sekä jätevedenpuhdistamoilla ja ympäristössä mitattuihin lääkejäämäpitoisuuksiin. Lisäksi määritettiin niin sanottu IC₅₀-siirtymä, jonka avulla tarkasteltiin, voimistuuko lääkeaineen aikaansaama entsyymi-inhibitio ajan myötä (*engl.* time-dependent inhibition). Menetelmän validointiin käytettiin kolmea tunnettua CYP-inhibiittoria (diltiatseemi, furafylliini ja verapamiili), jotka aikaansaavat ajasta riippuvan entsyymi-inhibition ihmisessä.

Tulokset ja johtopäätökset: Tutkituista antimikrobisista lääkeaineista kaikki, paitsi sulfametoksatsoli, inhiboivat kirjolohen EROD- ja/tai BFCOD-aktiivisuuksia *in vitro*. Klotrimatsolin, ketokonatsolin, mikonatsolin ja validoinnin malliaineena käytetyn furafylliinin IC₅₀-arvot olivat kalassa suurempia kuin kyseessä olevien yhdisteiden CYP-inhibitiovakiot ihmisessä. Siprofloksasiinin, klaritromysiinin, erytromysiinin ja validoinnin malliaineena käytettyjen diltiatseemin ja verapamiilin IC₅₀-arvot olivat saman suuruisia kuin ihmisessä. Erytromysiinin sekä diltiatseemin ja furafylliinin havaittiin lisäksi aiheuttavan ajasta riippuvaa entsyymi-inhibitiota. Ympäristöpitoisuuksiin verrattuna kaikkien tutkittujen yhdisteiden IC₅₀-pitoisuudet olivat kerta- luokkaa suuremmat kuin niiden vesistöistä mitattujen jäämäpitoisuuksien keskiarvot UBA-tietokannassa. Inkuboitessa lääkeaineita seoksena (kukin jätevesissä tyypillisesti esiintyvässä pitoisuudessaan), tutkituilla lääkeaineilla havaittiin kuitenkin additiivinen BFCOD-aktiivisuuden inhibitio, jonka biologista merkitystä olisi syytä tutkia tarkemmin.

Avainsanat: lääkeinemetabolia, sytokromi P450, entsyymi-inhibitio, bioakkumulaatio, ympäristöriskin arviointi

JOHDANTO

Lääkejäämiä esiintyy lähes kaikkialla vesiympäristössä (Boxall ym. 2012, Vasquez ym. 2014, Aus der Beek ym. 2016, Burns ym. 2018). Ympäristön lääkekuorma kertyy useista eri lähteistä, kuten ihmisten käyttämistä lääkkeistä, virheellisestä lääkejätteen käsittelystä sekä lääkkeiden tuotannosta (Boxall 2004). Ihmisten käyttämien lääkkeiden erittyminen jäteveteen muodostaa arviolta jopa 88 prosenttia ympäristön kokonaislääkejäämäkuormasta (Astra Zeneca 2018). Erittymisen seurauksena lääkeaineet sekä niiden metaboliitit päätyvät vedenpuhdistamoiden kautta jokiin, järviin ja meriin (Unesco & HELCOM 2017). Vain murto-osa lääkejäämistä poistuu tyypillisissä puhdistamoprosesseissa (Vieno 2015). Vesiympäristöstä lääkejäämät voivat siirtyä myös muihin eliöihin aiheuttaen niissä paitsi välittömiä toksisia vaikutuksia myös muita kroonisia haittavaikutuksia, kuten lisääntymis- tai käyttäytymishäiriöitä (Jobling ym. 2006, Brodin ym. 2013). Ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden jäämiä on mitattu muun muassa luonnonvesissä elävistä kaloista sekä kudospitoisuuksien että lääkejäämien aiheuttamien haittojen osalta (Muir ym. 2017, Simmons ym. 2017).

Vuodesta 2006 lähtien uusien vaikuttavien aineiden ympäristöriskinarviointi on tullut tehdä osana myyntilupahakemusta. Riskinarviointi tehdään Euroopan lääkeviraston ohjeistuksen (EMA/CHMP/SWP/4447/00 corr 2) mukaisesti usealla eri trofiatasolla (levä, vesikirppu ja kala), mittaamalla pääasiassa kasvun tai lisääntymisen häiriöitä standardoiduilla testeillä (OECD). Kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*) on standardoiduissa ekotoksisuustesteissä tyypillisesti käytetty korkeamman trofiatason mallilaji. Lääkejäämien kertymistä (engl. bioaccumulation) pyritään ennustamaan elävillä kaloilla kontrolloidun altistuksen kokeilla, jotka ovat kuitenkin verrattain kalliita ja muiden eläinkokeiden tapaan eettisesti haasteellisia. Tästä syystä ekotoksisuusmääritykset tehdään usein vasta kliinisen lääkekehitysvaiheen lopussa eikä niiden tuloksella siten ole juurikaan vaikutusta uusien lääkeainekandidaattien kehitykseen. *In vitro* tutkimusmenetelmien soveltaminen in vivo ympäristövaikutusten ennustamiseen kaloilla on tällä hetkellä vielä verrattain vähäistä, vaikka ne voisivat tarjota kustannustehokkaan työkalun esimerkiksi uusien lääkeainekandidaattien haittavaikutusten preliminääriseen seulontaan jo prekliinisessä vaiheessa tai markkinoilla jo olevien, mutta toistaiseksi testaamattomien ihmislääkkeiden (noin 90 %) priorisoinniseksi ympäristöriskinarviointiin (Burns ym. 2018).

Tässä työssä tutkimme kirjolohen sytokromi P450 (CYP) -metabolian inhiboitumista valikoiduilla antimikrobisilla lääkeaineilla *in vitro*. CYP-entsyymijärjestelmä on keskeinen lääkeaineiden eliminaation kannalta paitsi ihmisessä (Zanger ja Schwab 2013), myös muissa taksonomisissa ryhmissä mukaan lukien kaloissa (Uno ym. 2012, Nelson ym. 2013). Vaikka monet antimikrobiset aineet eivät itsessään juurikaan metaboloitu ihmisessä, ne ovat usein verrattain potentteja CYP-entsyymien inhibiittoreita. Luonnonvesissä elävillä kaloilla CYP-metaboliaan kohdistuva yhteisvaikutusten riski on erityisen suuri, sillä ne altistuvat yhtäaikaaisesti ja kroonisesti lukuisille eri lääkeaineille, mikä voi pahimmillaan johtaa CYP-järjestelmän inaktivoitumiseen ja edesauttaa lääkejäämien rikastumista kaloissa.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Materiaalit

Työssä käytettiin entsyymilähteena kaupallisia kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) maksamikrosomeja, joista mitattiin 7-etoksiresorufiinin O-de-etylaation (EROD) ja 7-bentsyylioksi-4-trifluorimetyyliikumariinin O-debentsylaation (BFCOD) aktiivisuutta. Nämä mallireaktiot valittiin, koska niiden tiedetään korreloivan kirjolohen CYP1A- (EROD) ja CYP3A-entsyymien (BFCOD) aktiivisuuksien kanssa (Hegelund ym. 2004, Jönsson ym. 2006, Christen ym. 2010). CYP1A- ja CYP3A-entsyymit ovat kirjolohen maksassa eniten ekspressoituvat entsyymit (Hegelund ym. 2004, Burkina ym. 2012). Työssä käytettyjen kemikaalien tiedot on eritelty **Liitteessä 1**.

IC50-inhibitiovaktion ja IC50-siirtymän määrittäminen

Työssä tutkittiin seitsemän antimikrobisen lääkeaineen (erytromysiini, klaritromysiini, klotrimatsoli, ketokonatsoli, mikonatsoli, siprofloksasiini, ja sulfametoksatsoli) vaikutusta kirjolohen EROD- ja BFCOD-entsyymiaktiivisuuksiin **Taulukossa 1** kuvatuissa olosuhteissa. Kutakin lääkeainetta (0,5-500 µM) inkuboitettiin ensin yksittäin yhdessä malliaineen (vakiopitoisuus) kanssa 100 µl:n tilavuudessa. Lääkeaineiden aiheuttamalle CYP-inhibitiolle määritettiin niin sanottu IC50-inhibitiovakio (lääkeaineen pitoisuus, jossa puolet malliaktiivisuudesta estyy) käyttäen Graphpad Prism 8.2.1 -ohjelmiston epälineaarista sovitusta ($y = 100 / (1 + x / IC_{50})$) ilman painotuksia. Lisäksi lääkeaineille määritettiin niin sanottu IC50-siirtymä, jonka avulla on mahdollista arvioida, aiheuttaako lääkeaine ajasta riippuvaa inhibitiota (Berry ja Zhao 2008). IC50-siirtymän määrittämiseksi, lääkeai-

Taulukko 1. IC50-vakioiden määrittämisessä käytetyt, optimoidut olosuhteet kirjolohen maksamikrosomien EROD- ja BFCOD-aktiivisuuksien mittaamiseen *in vitro*.

Mallireaktio	EROD	BFCOD
Malliaine	7-etoksiresorufiini (ER), 1 µM	7-bentsyylioksi-4-trifluorimetyyliikumariini (BFC), 75 µM
Kosubstraatti	NADPH 1 mM	NADPH 2 mM
Mikrosomit	0,5 mg proteiinia/ml	0,5 mg proteiinia/ml
Reaktioaika	10 min	20 min
Inkubointipuskuri	0,1 M kaliumfosfaatti (pH 8,0)/dimetyylisulfoksidi 99,5:0,5	0,1 M kaliumfosfaatti (pH 8,0)/asetonitrili 98:2
Lämpötila	21±1 °C	21±1 °C
Lopetusreagenssi	0,5 M Tris-emäs/ asetonitrili	0,5 M Tris-emäs/ asetonitrili
Kvantitoitava metaboliitti	resorufiini	7-hydroksi-4-trifluorometyyliikumariini, HFC
Fluoresenssidetektio (λ)	ex 570 nm / em 590 nm	ex 419 nm / em 501 nm

neita esi-inkuboitettiin yhdessä kosubstraatin (NADPH) kanssa 30 minuuttia ennen malliaineen lisäämistä. Menetelmän validointiin kirjolohen maksamikrosomeilla käytettiin yhdisteitä, joiden tiedetään aiheuttavan ajasta riippuvaa CYP-inhibitiota ihmisessä: furafylliini/CYP1A sekä verapamiili ja diltiatseemi/CYP3A (Grimm ym. 2009).

Ajasta riippuvan entsyymi-inhibition määrittäminen lääkeaineseoksella

Lääkejäämien kumulatiivisten yhteisvaikutusten mallintamiseksi työssä tutkittiin myös lääkeaineseosten vaikutusta EROD- ja BFCOD-malliaktiivisuuksiin. Tässä tapauksessa lääkeaineseoksia inkuboitettiin yhdessä malliaineiden seoksen kanssa kolmen tunnin ajan optimoiduissa olosuhteissa (**Taulukko 1**), 1 ml:n kokonaistilavuudessa. Reaktioseoksesta otettiin 100 µl näyte 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 ja 180 minuutin inkuboinnin jälkeen ja näytteen EROD- ja BFCOD-aktiivisuutta verrattiin kontrolliin (ilman lääkeaineseosta).

TULOKSET JA POHDINTA

Menetelmän kehitys ja validointi

Kirjolohen luonnollisen elinympäristön lämpötila vaihtelee välillä 10–24 °C ja pH välillä 6,5–8,0 (Raleigh ym. 1984, Froese ja Pauly 2019). Laboratoriolosuhteissa kirjolohen CYP-aktiivisuuksien *in vitro* tiedetään olevan verrattain alhaisia (Han ym. 2009). Tässä työssä inkubointiolosuhteet optimoitiin ennen IC50-inhibitiovakioiden määrittäystä lämpötilan (10, 21 ja 37°C), pH:n (7,4-8,0), reaktioajan (0-60 min) ja mikrosomaalisen proteiinipitoisuuden (0,1-1,0 mg proteiinia/ml) osalta maksimaalisen entsyymiaktiivisuuden saavuttamiseksi. Kirjolohen CYP-aktiivisuuden havaittiin olevan korkeimmillaan huoneenlämpötilassa pH:ssa 8,0. Metaboliitin muodostuminen proteiinipitoisuudella 0,5 mg proteiinia/ml oli lineaarista 20 min (EROD) tai 30 min (BFCOD) asti. Malliaineiden entsyymikineettiset parametrit (K_M ja V_{MAX}) määritettiin optimoiduissa olosuhteissa (**Taulukko 1**), millä perusteella malliaineiden pitoisuus IC50-inhibitiokoikeissa säädettiin lähelle niiden K_M -vakiota (etoksiresorufiini $K_M=0,8±0,3$ µM, 7-bentsyylioksi-4-trifluoro-

metyylikumariini $K_M=47,5\pm 9,2 \mu\text{M}$). Lisäksi IC_{50} -siirtymää mittaavan menetelmän soveltuvuus kirjolohen CYP-inhibition tutkimiseen validoitiin furafylliinin (CYP1A-inhibiittori ihmisessä) sekä diltiatseemin ja verapamiilin (CYP3A-inhibiittoreita ihmisessä) avulla. IC_{50} -siirtymä (engl. IC_{50} shift) on lääkeaineiden aiheuttaman, ajasta riippuvan inhibition (engl. time-dependent inhibition, TDI) ennustamiseen käytetty *in vitro* menetelmä (Berry ja Zhao 2008), jossa lääkeainetta esi-inkuboidaan entsyymilähteen ja kosubstraatin (NADPH) kanssa ennen malliaineen lisäystä. Näin saatua IC_{50} -vakiota verrataan kontrolliin ts. IC_{50} -vakioon, joka määritetään siten, että esi-inkubointi tehdään ilman kosubstraattia. Näin pystytään havaitsemaan lääkeaineen metaboliatuotteiden aikaansaama ajasta riippuva entsyymi-inhibiatio, mikä on yksi tyypillinen mekanismi biologisesti merkittävien lääke-lääke-yhteisvaikutusten taustalla (Grimm ym. 2009). Mikäli kaavalla (1) laskettu IC_{50} -siirtymä on suurempi kuin 1,5 (raja-arvo), on syytä epäillä, että lääkeaine aiheuttaa ajasta riippuvan entsyymi-inhibiition (Berry ja Zhao 2008).

$$IC_{50} \text{ siirtymä (shift)} = \frac{IC_{50} \text{ esi-inkuboitu ilman NADPH:ta}}{IC_{50} \text{ esi-inkuboitu NADPH:n kanssa}}$$

(1)

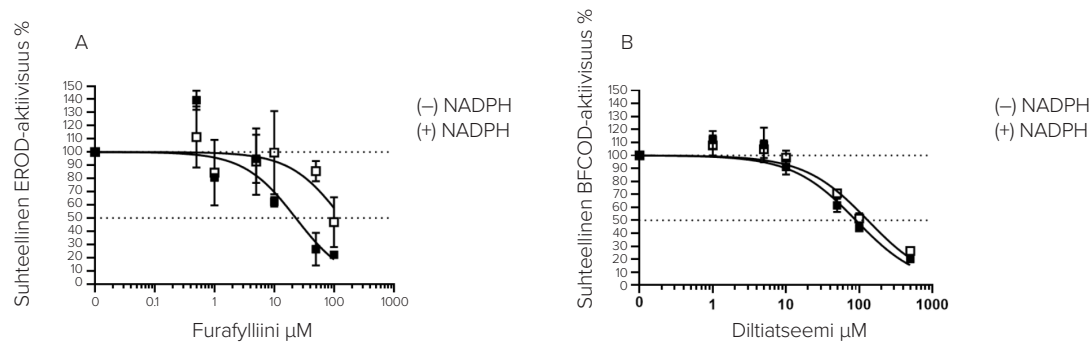
Validointiin käytetyistä yhdisteistä furafylliini (EROD) ja diltiatseemi (BFCOD) aiheuttivat ajasta riippuvan inhibition myös kalan maksamikrosomeissa *in vitro* (Kuva 1), millä perusteella menetelmän to-

dettiin soveltuvan TDI:n ennustamiseen kirjolohessa *in vitro*. Lisäksi havaittiin, että yhdisteiden sitoutuminen kirjolohen ja ihmisen entsyymeihin poikkeaa toisistaan, sillä ihmisen CYP3A-entsyymien ajasta riippuva inhibiittori, verapamiili, ei kuitenkaan aiheuttanut ajasta riippuvaa inhibitiota kirjolohessa.

Lääkeaineiden aiheuttama sytokromi P450 -inhibiatio kirjolohessa *in vitro*

Antimikrobisten lääkeaineiden aiheuttama kirjolohen maksamikrosomien EROD- ja BFCOD-aktiivisuuksien inhibiatio *in vitro* määritettiin inkuboimalla tutkittavia lääkeaineita ensin yksittäin ja näin saatuja tuloksia verrattiin kirjallisuudessa ihmisen CYP-entsyymeille raportoituun IC_{50} -arvoihin (Taulukko 2). Sulfametoksatsolia lukuunottamatta kaikki tutkitut yhdisteet inhiboivat kirjolohessa joko EROD- tai BFCOD-aktiivisuuksia tai molempia. Klotrimatsolin, ketokonatsolin ja mikonatsolin sekä validointiyhdisteenä käytetyn furafylliinin IC_{50} -arvot olivat kirjolohella selkeästi suurempia kuin ihmiselle kirjallisuudessa raportoidut arvot. Siprofloksasiinin, klaritromysiinin ja erytromysiinin sekä validointiyhdisteinä käytettyjen diltiatseemin ja verapamiilin IC_{50} -arvot sen sijaan olivat samaa suuruusluokkaa sekä kirjolohella että ihmisellä.

Määritetyistä tuloksista voidaan havaita, että lääkeaineiden aiheuttamia, kalan CYP-aktiivisuuteen *in vitro* kohdistuvia vaikutuksia ei välttämättä voida suoraan ennustaa ihmiskudoksessa mitatun aineiston avulla, mutta lääkeaineiden taipumus inhiboida kirjolohen CYP-järjestelmää korreloi verrattain hyvin



Kuva 1. A) Furafylliinin (EROD, IC_{50} -siirtymä 5,2-8,2) ja B) diltiatseemin (BFCOD, IC_{50} -siirtymä 1,4-1,53) ajasta riippuva entsyymi-inhibiatio kirjolohen maksamikrosomeissa *in vitro*. Entsyymiaktiivisuudet inhibiittorien läsnä ollessa on normalisoitu malliaineiden aktiivisuuksiin ilman inhibiittoria: A) EROD $5,4\pm 0,4$ pmol/min/mg proteiinia ja B) BFCOD 134 ± 7 pmol/min/mg proteiinia.

Taulukko 2. Tutkittujen yhdisteiden aiheuttaman CYP-inhibition mitatut IC_{50} -arvot sekä inhibition ajasta riippuva luonne IC_{50} -siirtymän perusteella kirjolohen maksamikrosomeissa *in vitro* (tämä työ) sekä vastaavat kirjallisuudesta kootut tiedot ihmisen maksamikrosomeissa *in vitro*. Symbolit (+) = lääkeaine inhiboi ko. CYP-välitteistä aktiivisuutta (-) = lääkeaine ei inhiboi ko. CYP-välitteistä aktiivisuutta. Taulukkoon on lisäksi kirjallisuuden avulla koottu lääkeaineille altistettujen kalojen *in vivo* lääkejäämäpitoisuuksia eri kudoksissa.

Yhdiste	LogKOW*	IC_{50} (μM), CYP1A		IC_{50} (μM), CYP3A		Ajasta riippuva inhibiatio		Lääkejäämäpitoisuus kaloissa <i>in vivo</i>
		Kirjolohi**	Ihminen***	Kirjolohi**	Ihminen***	Kirjolohi**	Ihminen***	Kudos (pitoisuus)
Furafylliini	3,06	140 \pm 45	0,48 \pm 0,23	170 \pm 45	>100	(+) EROD (-) BFCOD	(+) CYP1A2	n/a
Diltiatseemi	2,79	78 \pm 32	n/a	130 \pm 23	110-127	(-) EROD (+) BFCOD	(+) CYP3A4	maksa (0,7 ng/g) (Ramirez ym. 2009); munuaiset (9,7 \pm 4,2 $\mu\text{g/kg}$) (Steinbach ym. 2016)
Verapamiili	4,80	66 \pm 32	n/a	31 \pm 2	23-26	(-) EROD (-) BFCOD	(+) CYP3A4	munuaiset (*500 ng/g); maksa (*100 ng/g); kidukset (*100 ng/g) (Nallani ym. 2016)
Erytromysiini (antibiootti)	2,48	nd	n/a	69 \pm 21	33 \pm 6; 1,8	(-) EROD (+) BFCOD	(+) CYP3A4	plasma (0,22-0,79 ng/g) (Muir ym. 2017)
Ketokonatsoli (sienilääke)	4,45	9,9 \pm 3,4	60,0 \pm 12,7	1,7 \pm 0,25	0,0117-1,2	(-) EROD (-) BFCOD	(-) CYP3A4	maksa (40-60 ng/g), lihakset (20-25 ng/g), aivot (10-15 ng/g) (Liu ym. 2016)
Klaritromysiini (antibiootti)	3,18	110 \pm 40	n/a	29 \pm 6	56 \pm 5	(-) EROD (-) BFCOD	(+) CYP3A4	n/a
Klotrimatsoli (sienilääke)	6,26	71 \pm 37	n/a	1,2 \pm 0,18	0,18	(-) EROD (-) BFCOD	(-) CYP3A4	maksa (1140 \pm 700 ng/g), munuaiset (110 \pm 40 ng/g) (Burkina ym. 2016)
Mikonatsoli (sienilääke)	6,25	54 \pm 8,1	2,9	42 \pm 12	1,7 \pm 0,1; 0,0742	(-) EROD (-) BFCOD	(-) CYP1A2 (-) CYP3A4	n/a
Siprofloksasiini (antibiootti)	1,24	800 \pm 320	220 \pm 80	830 \pm 330	n/a	(-) EROD (-) BFCOD	(-) CYP1A2	maksa (*50 $\mu\text{g/l}$), sappi, 100 $\mu\text{g/l}$ (Chen ym. 2018)
Sulfametoksatsoli (antibiootti)	0,48	nd	n/a	nd	544 (CYP2C9)	(-) EROD (-) BFCOD	(-) CYP2C9	lihas (50 $\mu\text{g/kg}$) (Chen ym. 2018)

*Yhdisteiden LogKow-arvot koottu EPI Suite™-ohjelmistosta (Estimation Programs Interface Suite™ 2012, v 4.11, US Environmental Protection Agency).

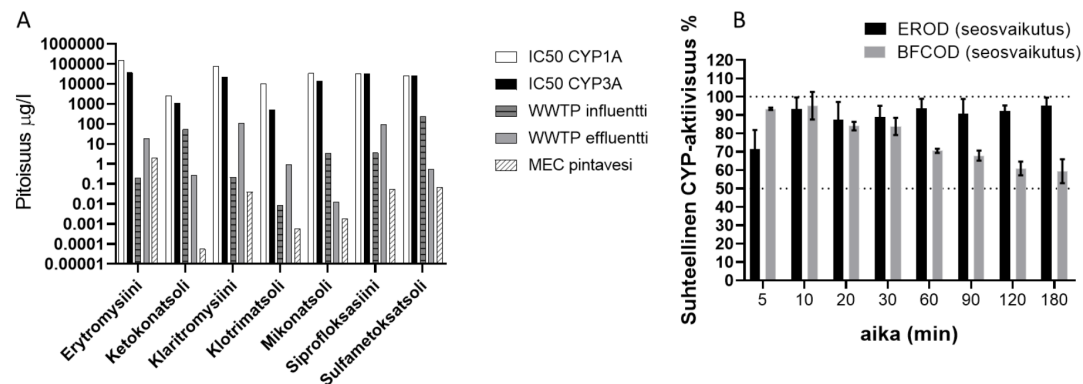
Kirjolohen CYP1A (EROD) ja CYP3A (BFCOD) inhibiitiot vakiot määritetty olettaen, että mallireaktiot ovat spesifisiä ko. entsyymeille ja inhibition ajasta riippuva luonne määritetty IC_{50} -siirtymän avulla. * Ihmisen CYP-entsyymien IC_{50} -vakiot ja inhibition ajasta riippuvaa luonnetta koskevat tiedot koottu julkaisuista Eagling ym. 1998, Zhao ym. 1999, Yeo 2001, Wen ym. 2002, Niwa ym. 2005, Sakaeda ym. 2005, Karjalainen ym. 2008, Grimm ym. 2009, Burt ym. 2010, Quinney ym. 2010, Zimmerlin ym. 2011, FDA 2016, Godamudunage ym. 2018. nd = ei havaittu. n/a = ei saatavilla.

kirjallisuudessa raportoituihin kyseessä olevien lääkejäämien kertymiseen kalan kudoksiin. Tässä työssä testatuista lääkeaineista erytromysiini (mikrobiiläike) ja diltiatseemi (validointiyhdiste, kalsiumkanavansalpaaja) aiheuttivat ajasta riippuvan inhibition kirjolohon BFCOD-aktiivisuuteen *in vitro*. Näitä yhdisteitä on määritetty ja havaittu säännöllisesti sekä vesiympäristössä että luonnonvesissä elävissä kaloissa (Ramirez ym. 2009, Muir ym. 2017), mikä voi olla yksi selittävä tekijä myös muiden, samoissa tutkimuksissa seurattujen lääkeaineiden biokertymiseen kaloissa (mikäli näiden eliminaatio tapahtuu pääasiassa CYP3A-entsyymien välityksellä). Muissa kalalajeissa esimerkiksi sitalopraamin ja sertraliinin tiedetään metaboloituvan *in vitro* (*Cyprinus carpio*, Burkina ym. 2020), ja amitriptyliinin *in vivo* (*Sparus aurata*, Ziarrusta ym. 2017), mutta silti niiden on havaittu kertyvän eläviin kaloihin, kun kalat ovat altistuneet yhtäaikaaisesti myös erytromysiinille tai diltiatseemille (Ramirez ym. 2009, Muir ym. 2017). Tämän tarkastelun valossa voidaan tehdä hypoteesi, että CYP-järjestelmään kohdistuva ajasta riippuva inhibiivivaikutus voi olla yksi selittävä tekijä kaloissa havaitulle lääkejäämien bioakkumulaatiolle, lääkeaineen kor-

kean rasvaliukoisuuden ja huonon ominaispuhdistuman (esim. sulfametoksatsoli, Connors ym. 2013, Chen ym. 2018) ohella.

Lääkejäämien sytokromi P450 -järjestelmään kohdistuvat yhteisvaikutukset kirjolohessa *in vitro*

Antimikrobisia lääkeaineita on havaittu ympäristössä kaikissa maanosissa (Aus der Beek ym. 2016). Tässä työssä tutkittujen antimikrobisten lääkeaineiden aiheuttama inhibiitio kohdistuu ihmisessä pääasiassa CYP3A4-entsyymiin, mutta kirjolohessa useimmat yhdisteistä inhiboivat sekä EROD- että BFCOD-aktiivisuuksia, mikä antaa viitteitä siitä, että työssä tutkittujen lääkeaineiden inhibiitio kirjolohessa olisi luonteeltaan epäspesifisempi kuin ihmisessä. Altistuksen kroonisen luonteen vuoksi tämä voi johtaa biologisesti merkittävään metabolisen ominaispuhdistuman laskuun luonnonvesissä elävissä kaloissa. **Kuvassa 2A** on verrattu tässä työssä määritettyjä antimikrobisten lääkeaineiden IC₅₀-pitoisuuksia UBA-tietokannasta koottuihin kyseessä olevien lääkeaineiden keskiarvoisiin jätevedenpuhdistamoilta (influentti ja effluentti) sekä pintavesistä mitattuihin ympäristöpitoisuuksiin



Kuva 2. A) Antimikrobisten lääkeaineiden EROD- ja BFCOD-malliaktiivisuuksia inhiboivat IC₅₀-pitoisuudet verrattuna ko. lääkejäämien UBA-tietokannassa raportoituihin keskiarvopitoisuuksiin jätevedenpuhdistamojen (engl. wastewater treatment plant, WWTP) influentissa ja effluentissa sekä pintavesistä otetuissa ympäristönäytteissä (engl. measured environmental concentration, MEC). B) Lääkeaineseoksen ajasta riippuva vaikutus EROD- ja BFCOD-aktiivisuuksiin kirjolohon maksamikrosomeissa *in vitro*. Lääkeaineet lisättiin seokseen niiden keskiarvoista influenttipitoisuutta vastaavan pitoisuuteen: diltiatseemi 0,58 µg/l, erytromysiini 0,20 µg/l, ketokonatsoli 52 µg/l, klaritromysiini 0,22 µg/l, klotrimatsoli 0,0089 µg/l, mikonatsoli 3,4 µg/l, siprofloksasiini 3,6 µg/l, sulfametoksatsoli 229 µg/l ja verapamiili 0,13 µg/l. Entsyymiaktiivisuudet on suhteutettu mallireaktion (EROD, BFCOD) aktiivisuuteen ilman inhibiittoreita. Entsyymiaktiivisuuden määrittämiseksi lääkeaineseosta inkuboitiin 180 min 1 ml:n tilavuudessa ja siitä otettiin näyte kuvassa esitetyissä aikapisteissä.

(UBA 2020). Muutamat tässä työssä tutkituista antimikrobisista lääkeaineista (mikonatsoli, klotrimatsoli, siprofloksasiini ja sulfametoksatsoli) on nostettu vuonna 2020 myös EU:n vesiympäristölle vaarallisia ja haitallisia aineita koskevalle WATCH-tarkkailulistalle (Euroopan komissio 2020). **Kuvasta 2A** voidaan havaita, että määritetyt IC₅₀-pitoisuudet olivat ympäristöpitoisuuksiin verrattuna keskimäärin monta kertaluokkaa suuremmat. Tällä perusteella tutkitut lääkeaineet eivät todennäköisesti yksinään aiheuta biologisesti merkittävää CYP-inhibitiota luonnonvesistä mitatuilla pitoisuuksilla. Ympäristöpitoisuudet kuitenkin vaihtelevat paikallisesti hyvin paljon, sillä lääkejäämien määrään vaikuttaa esimerkiksi alueella käytetyt jätevedenpuhdistusmenetelmät sekä käytettyjen lääkkeiden kirjo (määrät ja antotavat). Esimerkiksi kehittyvissä maissa antimikrobijäämät voivat paikallisesti nousta hyvinkin korkeiksi (Kairigo ym. 2020a, Kairigo ym. 2020b). Toisaalta pääasiassa topikaalisesti käytettyjen lääkeaineiden (ketokonatsoli, klotrimatsoli, mikonatsoli) humaanin metabolia on usein merkityksetön ja näiden pitoisuudet siksi usein korkeampia kuin oraalisesti käytettyjen lääkeaineiden. Lisäksi eläinlääkinnällä (esim. sulfametoksatsoli) tai lääkkeiden teollisen tuotannon päästöillä (erityisesti Aasiassa) (Larsson 2014) voi olla paikallisesti suuri vaikutus antimikrobiaineiden ympäristöpitoisuuksiin. Esimerkiksi Intiassa muun muassa siprofloksasiinia on esiintynyt huomattavan suurilla pitoisuuksilla (6,5 mg/l, Aus der Beek ym. 2016), jotka lähentelevät tässä työssä mitattuja inhibitorisia (CYP) pitoisuuksia.

Vaikka kemikaalijäämien (ml. lääkeaineet) seosvaikutukset ovat keskeisiä todellisten ympäristövaikutusten ymmärtämisen kannalta, on niitä yleisesti ottaen tutkittu vain vähän (Boxall ym. 2012, Vasquez ym. 2014). Esimerkiksi ympäristötoksikologiassa lääkeaineiden seosvaikutuksia tutkitaan useimmiten vain kahden yhdisteen seoksilla (Vasquez ym. 2014). Myös CYP-järjestelmään kohdistuvat lääkeainejäämien yhteisvaikutukset voivat olla merkittäviä jo hyvin alhaisilla ympäristöpitoisuuksillakin. Esimerkiksi erytromysiinin on havaittu kertyvän kalan sappiin *in vivo* ympäristöpitoisuuksilla yhteisaltistuksessa ketokonatsolin kanssa, mikä heikentää erytromysiinin metabolista ominaispuhdistumaa (Liu ym. 2017). Ketokonatsolin on myös havaittu lisäävän estrogeeni-altistusta kirjolohessa vähentäen hormonitoiminnan häiriöitä aiheuttavien kemikaalien eliminaatiota kaloissa (Hasselberg ym. 2008). Vastaavasti myös mikonatsolilla ja klotrimatsolilla on seoksissa havaittu additiivista EROD-aktiivisuuden inhibitiota kirjolo-

hen kiduksissa *ex vivo* (Beijer ym. 2018). Tässä työssä antimikrobiaineiden yhteisvaikutuksia EROD- ja BFCOD-aktiivisuuksiin tutkittiin inkuboimalla lääkeaineita seoksena niiden influenttipitoisuuksilla (keskiarvo jätevedenpuhdistamoilla UBA-tietokannasta) kirjolohon maksamikrosomeissa yhteensä kolmen tunnin ajan. Myös validointiyhdisteinä käytetyt verapamiili ja diltiatseemi sisällytettiin seokseen, mutta ei furafylliiniä, joka ei ole lääkkeellisessä käytössä ja jolla siksi ei ole ympäristörelevanssia. **Kuvasta 2B** havaitaan, että lääkeaineiden seoksen yhteisvaikutukset tulevat esiin myös huomattavasti IC₅₀-pitoisuutta pienemmillä pitoisuuksilla, erityisesti BFCOD-aktiivisuuden osalta, jonka inhibiitio on kolmen tunnin *in vitro* kokeen perusteella palautumaton. Tämä tulos on linjassa yksittäisillä lääkeaineilla tehtyjen inhibiitiotutkimusten kanssa, sillä seos sisältää kaksi ajasta riippuvan BFCOD-inhibition aikaansaavaa yhdistettä (diltiatseemi ja erytromysiini). Sen sijaan EROD-aktiivisuuden kohdistuva inhibiitio on seoksen kaikkien yhdisteiden osalta ajasta riippumaton ja myös seoksen EROD-aktiivisuuteen kohdistuva inhibiitio huomattavasti vähäisempää (**Kuva 2B**). EROD-aktiivisuus myös palautuu kontrollin tasolle pian.

Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että CYP-järjestelmän inhibitiota aiheuttavien lääkeaineiden seos estää entsyymiaktiivisuutta *in vitro* jo huomattavasti alhaisemmilla pitoisuuksilla kuin mikään tutkituista yhdisteistä yksinään. Vastaava seosvaikutus voi teoriassa lisätä saman entsyymien kautta eliminoituvien yhdisteiden bioakkumulaatiota kalassa *in vivo*, erityisesti silloin, kun mukana on ajasta riippuvan entsyymi-inhibition aiheuttavia yhdisteitä. Jotta CYP-järjestelmään kohdistuvan ajasta riippuvan inhibition biologista merkittävyyttä ja todellisia ympäristövaikutuksia luonnonvesissä elävissä kaloissa olisi mahdollista arvioida, tulisi seosvaikutuksia kuitenkin selvittää usealla eri ympäristöpitoisuustasolla ja ajasta riippuvan inhibition luonnetta (pysyvä/palautuva) tutkia tarkemmin. CYP-järjestelmään kohdistuvien yhteisvaikutusten biologinen merkittävyys on aiemmin osoitettu muun muassa altistamalla kalan alkioita CYP1A-inhibiittoreille, minkä havaittiin lisäävän muun muassa polyaromaattisten hiilivetyjen toksisuutta ja epämuodostumia syntyneissä kaloissa (Wassenberg ja DiGiulio 2004).

JOHTOPÄÄTÖKSET

Lääkeainejäämien aiheuttamien ympäristövaikutusten ennustaminen on vaikeaa ja perustuu pääasiassa työläisiin ja eettisesti haasteellisiin eläinkokeisiin.

Lääkeaineiden CYP-välitteinen metabolia ja siihen kohdistuvat yhteisvaikutukset ovat keskeisessä roolissa vierasaineiden eliminaation kannalta ja voivat edesauttaa lääkejäämien bioakkumulaatiota kaloissa. Tässä työssä selvitettiin, voisiko prekliinisessä *in vitro* lääkekehityksessä humaani riski/hyöty-suhteen arvioinnissa rutiinisti käytetyt *in vitro* -menetelmät, kuten IC₅₀-inhibitiovakion ja IC₅₀-siirtymän määrittäminen, soveltua myös kaloihin kohdistuvien ympäristövaikutusten preliminääriseen arviointiin ja *in vivo* vaikutusten ennustamiseen. Työssä havaittiin, että kaikki tutkitut lääkeaineet, sulfametoksatsolia lukuunottamatta, inhiboivat joko EROD- tai BFCOD-malliaktiivisuuksia tai molempia, kirjolohen maksamikrosomeissa *in vitro*. CYP-inhibition selektiivisyydessä ja aikariippuvuudessa havaittiin kuitenkin eroja ihmisen ja kirjolohen välillä, mistä syystä suora riski-inhiteeraus prekliinisessä lääkekehityksessä käytettyjen lajien välillä ei todennäköisesti ole mahdollista ympäristövaikutusten ennustamisen osalta. Esimerkiksi tunnetuista ihmisen CYP-entsyymien ajasta riippuvista inhibiittoreista diltiazem, erytromysiini ja furafylliini aiheuttivat ajasta riippuvan inhibition (IC₅₀-siirtymän) myös kirjolohen maksamikrosomeissa *in vitro*, mutta verapamiili ja klaritromysiini eivät. Yksittäin tutkittuna tässä työssä käytettyjen yhdisteiden IC₅₀-pitoisuudet kirjolohessa olivat monta kertaluokkaa suuremmat kuin ko. lääkeaineiden keskiarvoiset ympäristöpitoisuudet, mutta seoskoikeissa CYP-järjestelmään kohdistuva inhibitio tuli esiin jo huomattavasti alhaisemmalla, jätevedenpuhdistamojen keskiarvoista influenttipitoisuutta vastaavalla tasolla. *In vitro* kokeen perusteella seoksen BFCOD-aktiivisuuden kohdistuva inhibiatiovaikutus oli palautumaton ja voimakkaampi kuin vastaavan seoksen vaikutus EROD-aktiivisuuteen, mikä voi selittyä sillä, että diltiazem ja erytromysiinin ajasta riippuva inhibitio kohdistui nimenomaan BFCOD-aktiivisuuteen. Seoskoikeista saatujen tulosten perusteella IC₅₀-siirtymän määrittäminen jo yksittäisillä aineilla voi jossain määrin ennustaa CYP-järjestelmään kohdistuvia, bioakkumulaatiota lisääviä yhteisvaikutuksia kalan maksamikrosomeilla *in vitro*.

Tällä hetkellä lääkeaineiden metaboliaa ei erikseen arvioida testieliöillä ympäristöriskinarvioinnin yhteydessä (esimerkiksi Euroopan lääkeviraston ohjeistus EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 2), mutta valikoitujen lajien, kuten ekotoksisuustesteissä yleisesti käytetyn kirjolohen, metabolian selvittäminen jo varhaisessa prekliinisessä *in vitro* tutkimusvaiheessa voisi tarjota kustannustehokkaan työkalun uusien lääke-

ainekandidaattien preliminääriseen ympäristövaikutusten arviointiin ja seosvaikutusten mallintamiseen.

SUMMARY

Cytochrome P450 enzyme inhibition in fish by aquatic antimicrobial contaminants

→ Tea Pihlaja

MSc (Pharm), doctoral student
Faculty of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Drug Research Program, University of Helsinki

→ Sanna Niemissalo

BSc (Pharm), MSc student
Faculty of Pharmacy, University of Helsinki

→ Tiina Sikanen*

PhD (Pharm), Academy Research Fellow
Faculty of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Drug Research Program, University of Helsinki
tiina.sikanen@helsinki.fi

*Correspondence

Introduction: Significant concentrations of pharmaceutical residues are found in the aquatic environment. These result from human and veterinary use, incorrect disposal of unused medicines, and manufacturing. Pharmaceuticals uptake in non-target species can cause both acute toxicity, and other long-term effects in aquatic organisms, for example. The ecotoxicity risks are being evaluated with the help of standardized tests (OECD) in fish, among other species, with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a typical model organism. Residues of human pharmaceuticals have also been measured in wild fish. Cytochrome P450 (CYP) enzyme family has a critical role in bioaccumulation of pharmaceutical residues in fish as it mediates majority of the xenobiotic metabolism. As the fish are chronically and simultaneously exposed to multiple pharmaceuticals, inhibition of the CYP mediated metabolic clearance by one another is a particular risk.

Materials and methods: In this study, the effect of seven antimicrobials (ciprofloxacin, clarithromycin, clotrimazole, erythromycin, ketoconazole, miconazole, and sulfamethoxazole) on fish ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin-O-debenzyloxylase (BFCOD) activity was studied *in vitro*. These model reactions are known to correlate well with the CYP1A and CYP3A activities in fish. The initial enzyme activity, and the half maximal inhibitory constant (IC₅₀) of the selected pharmaceuticals was measured by fluorescence with the help of the model reactions in rainbow trout liver microsomes. The apparent IC₅₀ concentration was defined for each pharmaceutical and these were compared to corresponding constants in human and to the pharmaceutical concentrations measured at the wastewater treatment plants and in the environment. In addition, we determined the IC₅₀ shift for each compound to enable examination of the time-dependent nature of the inhibition. The method was validated with the help of three known time-dependent human CYP inhibitors (diltiazem, furafylline, and verapamil).

Results and discussion: All tested antimicrobials, except sulfamethoxazole, inhibited EROD and/or BFCOD activities in rainbow trout liver microsomes *in vitro*. The IC₅₀ concentrations of clotrimazole, furafylline, ketoconazole, and miconazole were considerably higher in fish than in human. The IC₅₀ concentrations of ciprofloxacin, clarithromycin, erythromycin, diltiazem, and verapamil were somewhat similar to those in human. Time-dependent enzyme inhibition in fish was exhibited by erythromycin, as well as by diltiazem and furafylline used as the method validation compounds. Compared to the environmental concentrations, the IC₅₀ concentration were many orders of magnitude greater than the measured environmental concentrations on the average. However, as a mixture, the selected pharmaceuticals resulted in additive BFCOD inhibition even at much lower concentrations, which would deserve further examination to be able to predict the biological relevance of the finding.

Keywords: Drug metabolism, cytochrome P450, enzyme inhibition, bioaccumulation, environmental risk assessment

SIDONNAISUUDET

Ei sidonnaisuuksia.

KIITOKSET

Tämä tutkimus on saanut rahoitusta Suomen Akatemian yhteydessä toimivalta Strategisen tutkimuksen neuvostolta (SUDDEN-hanke, päätösno 320210) ja Suomen Akatemialta (pätösno 309608). Kirjoittajat kiittävät Lauri Äystöä, Suomen ympäristökeskuksesta, avusta ympäristöstä mitattujen lääkejäämätasuuksien kokoamisessa, ja Vera Kouhia, Helsingin yliopistosta, avusta *in vitro* -koeolosuhteiden alustavassa kartoituksessa.

KIRJALLISUUS

Astra Zeneca: Pharmaceuticals in the Environment. 2018 (viitattu 24.5.2020).

https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/PDF/2018/A2E303_Pharmaceutical%20in%20the%20environment_A4_Final_V4.pdf

Aus der Beek T, Weber F-A, Bergmann A ym.: Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 823-835, 2016

Beijer K, Jönsson M, Shaik S ym.: Azoles additively inhibit cytochrome P450 1 (EROD) and 19 (aromatase) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 198: 73–81, 2018

Berry LM ja Zhao Z: An examination of IC50 and IC50-shift experiments in assessing time-dependent inhibition of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in human liver microsomes. *Drug Metabolism Letters* 2: 51-59, 2008

Boxall ABA: The environmental side effects of medication. *EMBO Rep* 5: 1110-1116, 2004

Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW ym.: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ Health Perspect* 120: 1221-1229, 2012

Brodin T, Fick J, Jonsson M ym.: Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339: 814–815, 2013

Burkina V, Zamaratskaia G, Randak T ym.: Verapamil does not modify catalytic activity of CYP450 in rainbow trout after long-term exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 148-152, 2012

Burkina V, Zamaratskaia G, Oliveira R ym.: Sublethal effects and bioconcentration of the human pharmaceutical clotrimazole in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere* 159: 10-22, 2016

Burkina V, Sakalli S, Giang PT ym.: *In Vitro* Metabolic Transformation of Pharmaceuticals by Hepatic S9 Fractions from Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Molecules* 25: 2690, 2020

Burns EE, Carter LJ, Snape J ym.: Application of prioritization approaches to optimize environmental monitoring and testing of pharmaceuticals. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 21: 115-141, 2018

Burt HJ, Galetin A, Houston BJ: IC50-based approaches as an alternative method for assessment of time-dependent inhibition of CYP3A4. *Xenobiotica* 40: 331-343, 2010

Chen H, Liu S, Xu X-R ym.: Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area. *Journal of Hazardous Materials* 343: 140–148, 2018

Christen V, Oggier DM ja Fent K: A microtiter-plate-based cytochrome P450 3A activity assay in fish cell lines. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2632–2638, 2009

Connors KA, Bowen D, Fitzsimmons PN ym.: Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1810-1818, 2013

Eagling VA, Tjia JF ja Back DJ: Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 45: 107-114, 1998

Euroopan komissio: Täytäntöönpanopäätös (EU) 2020/1161 (viitattu 18.8.2020). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1161&from=EN>

FDA. US Food and Drug Administration: Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. 2016 (viitattu 24.5.2020). <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers#table1-2>

Froese, R. ja D. Pauly (Ed.): FishBase. 2019 (viitattu 18.8.2020). www.fishbase.org

Godamudunage MP, Grech AM ja Scott EE: Comparison of Antifungal Azole Interactions with Adult Cytochrome P450 3A4 versus Neonatal Cytochrome P450 3A7. *Drug metabolism and disposition* 46: 1329-1337, 2018

Grimm SW, Einolf HJ, Hall SD ym.: The conduct of *in vitro* studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: A perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug metabolism and disposition* 37: 1355-1370, 2009

Han X, Nabb DL, Yang C-H ym.: Liver microsomes and S9 from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Comparison of basal-level enzyme activities with rat and determination of xenobiotic intrinsic clearance in support of bioaccumulation assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 481-488, 2009

Hasselberg L, Westerberg S, Wassmuth B ym.: Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 α -ethynylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology* 86: 256-264, 2008

Hegelund T, Ottosson K, Råding M ym.: Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1326-1334, 2004

Jobling S, Williams R, Johnson A ym.: Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114: 32-39, 2006

Jönsson M, Abrahamson A, Brunström B ym.: Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo(a)pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology* 79: 226-232, 2006

Kairigo P, Ngumba E, Sundberg RL ym.: Contamination of surface water and river sediments by antibiotic and antiretroviral drug cocktails in low and middle-income countries: Occurrence, risk and mitigation strategies. *Water* 12:1376, 2020a.

Kairigo P, Ngumba E, Sundberg RL ym.: Occurrence of antibiotics and risk of antibiotic resistance evolution in selected Kenyan wastewaters, surface waters and sediments. *Sci. Total Environ.* 720: 137580, 2020b

Karjalainen MJ, Neuvonen PJ ja Backman JT: *In vitro* Inhibition of CYP1A2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids: Predictability of in vivo interactions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103: 157-165, 2008

Larsson DGJ: Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Phil Trans R Soc B* 369: 20130571, 2014

Liu J, Lu G, Yang H ym.: Bioconcentration and metabolism of ketoconazole and effects on multi-biomarkers in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 150: 145-151, 2016

Liu J, Lu G, Cai Y ym.: Modulation of erythromycin-induced biochemical responses in crucian carp by ketoconazole. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 5285-5292, 2017

Muir D, Simmons D, Wang X ym.: Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland. *Scientific Reports* 7: 16999, 2017

Nallani GC, Edziyie RE, Paulos PM ym.: Bioconcentration of two basic pharmaceuticals, verapamil and clozapine, in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 593-603, 2016

Nelson DR, Goldstone JV ja Stegeman JJ: The cytochrome P450 gene locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120474, 2013

Niwa T, Shiraga T ja Takagi A: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 1805-1808, 2005

Niwa T, Inoue-Yamamoto S, Shiraga T ym.: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 1813-1816, 2005

Quinney SK, Zhang X, Lucksiri A ym.: Physiologically based pharmacokinetic model of mechanism-based inhibition of CYP3A by clarithromycin. *Drug metabolism and disposition* 38: 241-248, 2010

Raleigh, RF, Hickman T, Solomon RC ym.: Habitat suitability information: Rainbow trout. U.S. Fish and Wildlife Service, FWS/OBS-82/10.60, 1984

Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S ym.: Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2587-2597, 2009

Sakaeda T, Iwaki K, Kakumoto M ym.: Effect of micafungin on cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1 activities, and its comparison with azole antifungal drugs. *Journal of pharmacy and pharmacology* 57: 759-764, 2005

Simmons DBD, Miller J, Clarence S ym.: Altered expression of metabolites and proteins in wild and caged fish exposed to wastewater effluents in situ. *Scientific Reports* 7:17000, 2017

Steinbach C, Grabic R, Fedorova G ym.: Bioconcentration, metabolism and half-life time of the human therapeutic drug diltiazem in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere* 144: 154-159, 2016

UBA. Umweltbundesamt. Database - Pharmaceuticals in the environment 2020 (viitattu 24.5.2020). <https://www.umweltbundesamt.de/en/database-pharmaceuticals-in-the-environment-0>

Unesco & HELCOM. Pharmaceuticals in the Aquatic Environment of the Baltic Sea Region – A status Report. Baltic Sea Environment Proceedings, No. 149, 2017

Uno T, Ishizuka M ja Itakura T: Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 1-13, 2012

Vasquez MI, Lambrianides A, Schneider M ym.: Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials* 279: 169-189, 2014

Vieno N. Haitta-aineet puhdistamo- ja hajalietteissä. Vantaanjoen ja Helsingin seudun vesiensuojeluyhdistys ry. *Julkaisu* 73, 2015

Wassenberg DM ja Di Giulio RT: Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ Health Perspect* 112: 1658-1664, 2004

Wen X, Wang J-S, Backman JT ym.: Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug metabolism and disposition* 30: 631-635, 2002

Yeo K ja Yeo W: Inhibitory effects of verapamil and diltiazem on simvastatin metabolism in human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 51: 461-470, 2001

Zanger UM ja Schwab M: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138: 103-141, 2013

Zhao XJ, Koyama E ja Ishizaki T: An *in vitro* study on the metabolism and possible drug interactions of rokitamycin, a macrolide antibiotic, using human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition* 27: 776-785, 1999

Ziarrusta H, Mijangos L, Izagirre U ym.: Bioconcentration and biotransformation of amitriptyline in gilt-head bream. *Environmental Science and Technology* 51: 2464-2471, 2017

Zimmerlin A, Trunzer M ja Bernard Faller B: CYP3A Time-dependent inhibition risk assessment validated with 400 reference drugs. *Drug metabolism and disposition* 39: 1039-1046, 2011

Liite 1. Tutkimuksessa käytettyjen kemikaalien tiedot.

Kemikaali	Toimittaja	Käyttötarkoitus
7-bentsyylioksi-4-trifluorimetyyliikumariini	Apollo Scientific Ltd, Stockport, UK	CYP3A-substraatti
7-hydroksi-4-trifluorimetyyliikumariini	Toronto Research Chemicals, North York, ON	metaboliitti
7-etoksiresorufiini	Toronto Research Chemicals, North York, ON	CYP1A-substraatti
Resorufiini	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	metaboliitti
β -nikotiiniamidi-adeniiniidinukleotidi-2'-fosfaatti (pelkistetty tetranatrium-hydraattisuola)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	kosubstraatti
Dikaliumpyrofosfaatti (K ₂ HPO ₄)	Amresco, Solon, OH	puskuriliuoksen suola
Kaliumpyrofosfaatti (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de-Haën, Seelze, Germany	puskuriliuoksen suola
Diltiatseemi (hydrokloridisuola)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Erytromysiini	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Furafylliini	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Ketokonatsoli	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Klaritromysiini	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Klotrimatsoli	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Mikonatsoli (nitraattisuola)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Siprofloksasiini	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Sulfametoksatsoli	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lääkeaine
Verapamiili (hydrokloridisuola)	Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI	lääkeaine
Asetoni	Riedel-de-Haën, Seelze, Germany	liuotin
Asetonitrili	Riedel-de-Haën, Seelze, Germany	liuotin, lopetusreagenssi
Ionivaihdettu Milli-Q-vesi	Millipore, Molsheim, France	liuotin
Dimetyylisulfoksidi	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	liuotin
Kloorivetyhappo	Riedel-de-Haën, Seelze, Germany	liuotin
Metanoli	Riedel-de-Haën, Seelze, Germany	liuotin
Trishydroksi-metyyliaminometaani (Trizma)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	lopetusreagenssi