BÀI NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu điều kiện xác định hoạt độ CYP2E1 trong microsom phân lập từ gan chuột thực nghiệm

Nguyễn Xuân Bắc[1]*, Nguyễn Thị Lập[1], Mai Văn Hiên[1], Nguyễn Trịnh Quỳnh Anh[2], Đào Thị Mai Anh[1]

[1]Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại Học Dược Hà Nội

[2]SVK72, Trường Đại học Dược Hà Nội

**Tác giả liên hệ: bacnx@hup.edu.vn*

(Ngày gửi đăng: 12/01/2022 – Ngày duyệt đăng: 25/02/2022)

SUMMARY

Regarding the activity of CYP450 enzymes has enjoyed considerable attention in recent years as a major source of variability in drug pharmacokinetics and biological response, and consequently, CYP450 activity assays have gained crucial applications in drug development, ... conditions for determining the activity of CYP2E1 as the highest expressed CYP enzyme in the human liver were evaluated. In this context, concentrations of the substrate (aniline), cofactor (NADPH) and incubation time were investigated on rat liver microsomes (0.4 mg microsome/ml). To obtain the maximum reaction rate, the minimum required concentration of aniline and NADPH for experiments was 250 µmol/L and 0.4 mmol/L, respectively. Besides, the average reaction rate was reduced due to the reaction duration being over 20 minutes. As thus, the conditions proper for the CYP2E1 activity assay using 0.4 mg microsome/ml were established as follows: 250 µmol/L of aniline - 0.4 mmol/L of NADPH and reaction duration - 20 minutes. In this study, DMSO served as the selective inhibitor of CYP2E1, i,e. a proof of concept for demonstration of the validity of the proposed experimental methodology.

Từ khóa: *microsom, gan chuột cống, xác định hoạt độ CYP2E1, anilin, NADPH, thời gian phản ứng.*

Đặt vấn đề

Các mô hình *in vitro,* trong đó mô hình sử dụng microsom để nghiên cứu ảnh hưởng của chất nghiên cứu/dược liệu đến hoạt tính các enzym cytochrom P450 (CYP450) có vai trò quan trọng trong nghiên cứu tương tác thuốc [1]. Trong một nghiên cứu trước [2] chúng tôi đã phân lập được microsom chứa các CYP450 từ gan chuột cống. Xác định hoạt độ của các CYP450 chứa trong microsom là bước tiếp theo để đánh giá chất lượng của microsom thu được cũng như thực hiện các nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các chất/dược liệu đến hoạt tính các CYP450. Trong các CYP450, CYP2E1 là enzym được biểu hiện nhiều nhất (chiếm 21 % tổng protein CYP450) và có vai trò chuyển hóa nhiều thuốc như paracetamol, isoniazid, ciplatin, và lidocain [3]. Nhiều nghiên cứu sử dụng cơ chất anilin và NADPH để xác định hoạt độ CYP2E1 [4, 5] nhưng chưa có nghiên cứu công bố về nồng độ cần thiết của các chất này để phản ứng có tốc độ cực đại (điều kiện cần thiết để xác định hoạt độ của enzym). Bên cạnh đó, tốc độ phản ứng cũng có thể thay đổi theo thời gian do sự thay đổi

các điều kiện phản ứng. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ anilin, nồng độ nicotinamid adenin dinucleotid 2 -phosphat và thời gian phản ứng tới tốc độ phản ứng hydroxyl hóa anilin dưới sự xúc tác của CYP2E1 có trong microsom phân lập từ gan chuột thực nghiệm, từ đó xác định điều kiện để xác định hoạt độ của CYP2E1 cho các nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các chất nghiên cứu đến hoạt tính enzym này.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Microsom: được phân lập từ gan chuột cống 7 tuần tuổi theo phương pháp bổ sung calci [2] chứa CYP2E1 có hoạt độ riêng > 0,5 nmol/phút.mg protein.

Hóa chất: Nicotinamid adenin dinucleotid 2 -phosphat (NADPH), anilin (dạng muối hydrochlorid), dimethyl sulfoxid (DMSO), natri carbonat, calci chlorid, p-aminophenol, acid trichloacetic, phenol, sucrose, glycerol, đệm phosphat pH 7,4, Tris-HCl, BCA kit (Sigma-Aldrich, Mỹ).

Trang thiết bị: Máy ly tâm Mikro 220R (Hettich, Đức), máy ly tâm Supra R22 (rotor 6x50 ml) (Hanil, Hàn Quốc), máy nghiền đồng thể WiseStir (B. Braun, Đức), máy đọc đĩa iMark (Bio-Rad, Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định tốc độ phản ứng

Tốc độ phản ứng hydroxyl hóa anilin được biểu thị bằng số nmol p-aminophenol tạo thành trong 1 phút dưới sự xúc tác của CYP2E1. Tốc độ phản ứng được tính là tốc độ trung bình trong khoảng thời gian phản ứng. Hỗn hợp gồm dung dịch đệm phosphat (0,7 ml), microsom (0,1 ml nồng độ 4 mg/ml) và anilin (0,1 ml nồng độ 160 – 120000 µmol/L) được ủ 5 phút ở 37 °C trước khi bổ sung NADPH (0,1 ml nồng độ 1 – 16 mmol/L). Sau khi bổ sung NADPH, hỗn hợp phản ứng tiếp tục được ủ trong các khoảng thời gian khác nhau (10 - 40 phút) (thời gian phản ứng) ở 37 °C rồi bổ sung 0,5 ml acid trichloacetic 20 % để kết thúc phản ứng. Hỗn hợp được lắc (vortex) và ly tâm 8000 g trong 5 phút để thu dịch nổi. Lượng p-aminophenol trong dịch nổi được xác định theo phương pháp được mô tả trong mục "Phương pháp định lượng p-aminophenol".

Phương pháp định lượng p-aminophenol

Dịch nổi từ hỗn hợp phản ứng (0,1 ml) được ủ với Na_2CO_3 10 % (0,05 ml) và phenol 2 % (0,1 ml) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng rồi tiến hành đo độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch thu được ở bước sóng 630 nm. Dựa vào đường chuẩn p-aminophenol (2 – 250 µmol/L) để xác định nồng độ p-aminophenol tạo thành trong hỗn hợp phản ứng. Từ đó xác định được tốc độ phản ứng hydroxyl hóa anilin tạo thành p-aminophenol (nmol/phút).

Phương pháp xác định ảnh hưởng của DMSO

DMSO được hòa tan trong dung dịch đệm phosphat được ủ 5 phút ở 37 °C cùng với 0,1 ml microsom nồng độ 4 mg/ml, 0,1 ml dung dịch anilin trước khi bổ sung 0,1 ml NADPH. Tổng thể tích của hỗn hợp phản ứng là 1 ml và nồng độ DMSO trong hỗn hợp phản ứng này là 0 – 1 %. Nồng độ anilin, nồng độ NADPH và thời gian phản ứng thích hợp được xác định trong nghiên cứu. Tốc độ phản ứng khi có mặt và khi không có mặt (nồng độ DMSO bằng 0) được sử dụng để xác định khả năng ức chế hoạt tính xúc tác phản ứng hydroxyl hóa anilin của CYP2E1. Nồng độ DMSO ức chế 50 % hoạt tính CYP2E1 (IC50) được xác định bằng phần mềm Graphpad prism 8.0 (San Diego, Hoa Kỳ).

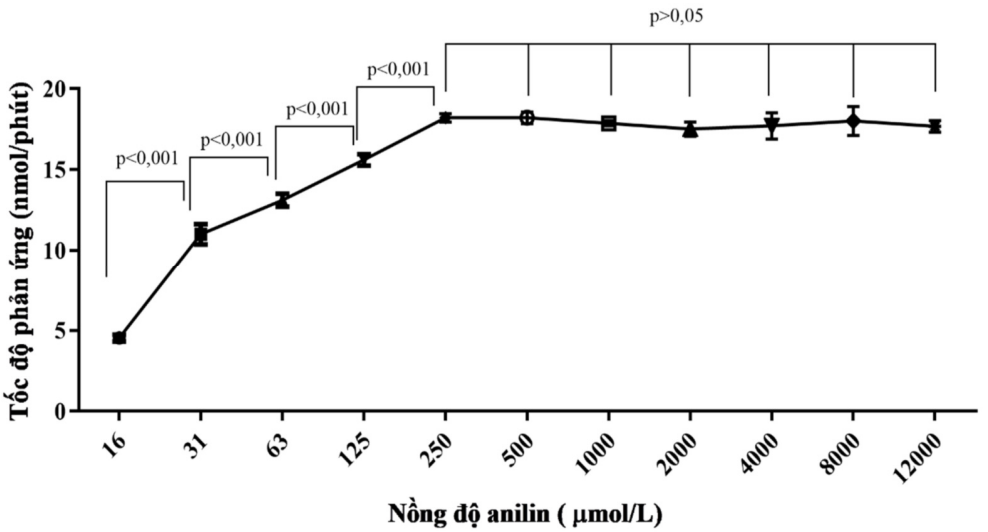
Phương pháp xử lý số liệu

Kiểm định t-test hoặc one-way ANOVA được sử dụng để so sánh tốc độ phản ứng trong các nhóm khác nhau. Sự khác nhau có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Ảnh hưởng của của nồng độ anilin

Các nghiên cứu về CYP2E1 thường áp dụng thời gian phản ứng là 20 phút, nồng độ



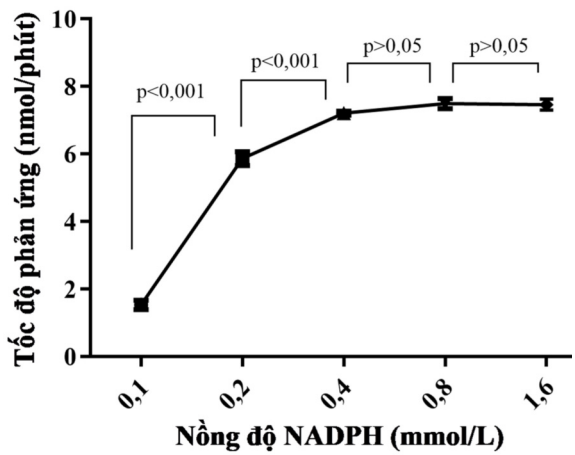
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ anilin trong khoảng 16 – 500 µmol/L đến tốc độ phản ứng.

NADPH là 1 mmol/L [4-6]. Trong một số nghiên cứu (chưa được công bố) chúng tôi không thấy có sự khác biệt đến tốc độ phản ứng khi sử dụng NADPH nồng độ 1 mmol/L so với 0,4 mmol/L. Vì vậy chúng tôi thực hiện khảo sát ảnh hưởng của nồng độ anilin trong khoảng 16 – 12000 µmol/L đến tốc độ phản ứng ở điều kiện thời gian phản ứng là 20 phút, nồng độ NADPH là 0,4 mmol/L. Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ 16 – 250 µmol/L, tăng nồng độ anilin làm tăng đáng kể tốc độ phản ứng ($p < 0,001$). Tuy nhiên, tăng gấp đôi nồng độ anilin trong khoảng 250 - 12000 µmol/L không làm tăng tốc độ phản ứng ($p > 0,05$) (hình 1).

Giá trị trung bình ± SD được biểu thị trên biểu đồ dựa trên 3 thí nghiệm lặp lại, sử dụng phần mềm Graphpad 8.0, phân tích one-way ANOVA, sự khác biệt có ý nghĩa khi $p<0,05$.

Ảnh hưởng của nồng độ nicotinamid adenin dinucleotid 2'-phosphat

Từ kết quả của nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ anilin, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NADPH trong khoảng nồng độ 0,1 – 1,6 mmol/L ở điều kiện nồng độ anilin tối thiểu (250 µmol/L) để phản ứng đạt tốc độ cực đại; thời gian phản ứng là 20 phút. Kết quả cho thấy tăng nồng độ NADPH trong khoảng 0,1 – 0,4 mmol/L làm tăng đáng kể tốc độ phản ứng ($p<0,001$). Cụ thể, tăng nồng độ NADPH từ 0,1 mmol/L lên 0,2 mmol/L làm tốc độ phản ứng tăng gần 4 lần và tăng thêm gần 25 % khi tăng nồng độ NADPH từ 0,2 mmol/L lên 0,4 mmol/L. Tuy nhiên, trong khoảng 0,4 – 1,6 mmol/L, tăng nồng độ NADPH không làm tăng tốc độ phản ứng ($p>0,05$) (hình 2).



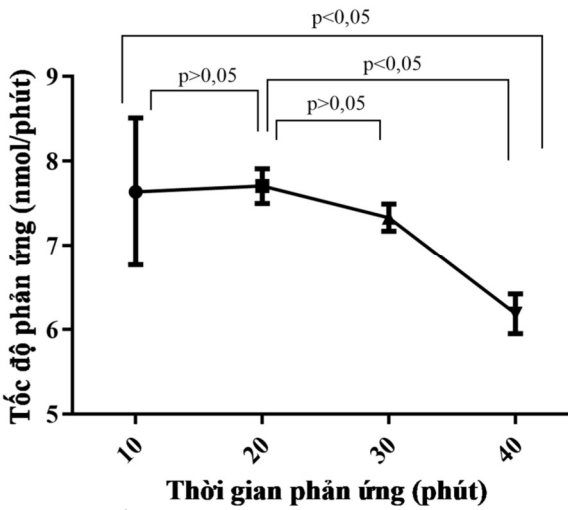
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ NADPH đến tốc độ phản ứng.

Giá trị trung bình ± SD được biểu thị trên biểu đồ dựa trên 3 thí nghiệm lặp lại, sử dụng phần mềm Graphpad 8.0, phân tích one-way

ANOVA, sự khác biệt có ý nghĩa khi p<0,05.

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Từ kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ anilin và nồng độ NADPH, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng trong khoảng 10 – 40 phút ở điều kiện nồng độ anilin tối thiểu (250 µmol/L) và nồng độ NADPH tối thiểu (0,4 mmol/L) để phản ứng đạt tốc độ cực đại. Kết quả cho thấy tăng thời gian phản ứng từ 10 phút lên đến 30 phút không làm thay đổi tốc độ phản ứng (p>0,05). Khi thời gian phản ứng là 10 phút thì tốc độ phản ứng xác định được có sự chênh lệch đáng kể giữa các thí nghiệm khác nhau (biểu hiện bởi độ lệch chuẩn lớn). Đáng chú ý, tăng thời gian phản ứng từ 10 phút và 20 phút lên 40 phút lại làm giảm tốc độ phản ứng (p<0,05). (hình 3).

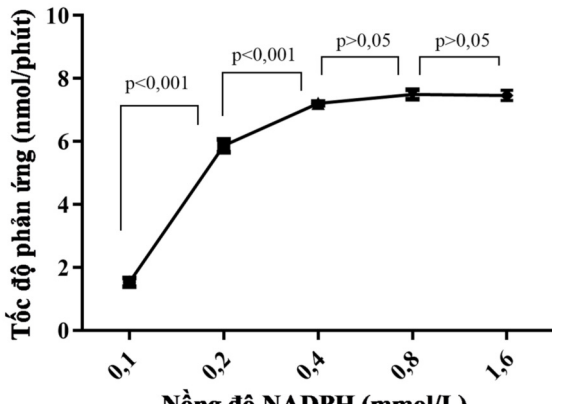


Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến tốc độ phản ứng.

Giá trị trung bình ± SD được biểu thị trên biểu đồ dựa trên 3 thí nghiệm lặp lại, sử dụng phần mềm Graphpad 8.0, phân tích one-way ANOVA, sự khác biệt có ý nghĩa khi p<0,05.

Ảnh hưởng của DMSO

Điều kiện để phản ứng đạt tốc độ cực đại được sử dụng để xác định hoạt độ enzym trong các nghiên cứu ảnh hưởng của các chất đến hoạt tính CYP2E1. Từ các kết quả trên (hình 1, 2 và 3), chúng tôi lựa chọn điều kiện nồng độ anilin là 250 µmol/L, nồng độ NADPH là 0,4 mmol/L, thời gian phản ứng là 20 phút để đánh giá ảnh hưởng của DMSO (nồng độ 0 – 1 %) đến hoạt tính CYP2E1. Kết quả cho thấy tác dụng ức chế CYP2E1 của DMSO phụ thuộc vào nồng độ DMSO sử dụng trong phản ứng với IC50 là 0,14±0,02 % (hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của DMSO đến hoạt tính CYP2E1.

Giá trị trung bình ± SD được biểu thị trên biểu đồ dựa trên 3 thí nghiệm lặp lại, sử dụng phần mềm Graphpad 8.0.

Bàn luận

Về ảnh hưởng của nồng độ anilin

Theo phương trình Michealis-Menten thì tốc độ của phản ứng enzym phụ thuộc vào nồng độ cơ chất: tăng nồng độ cơ chất làm tăng tốc độ của phản ứng, đến một nồng độ nhất định thì tốc độ phản ứng đạt giá trị cực đại và nếu tiếp tục tăng nồng độ cơ chất thì tốc độ phản ứng không tăng nữa [7]. Kết quả khảo sát nồng độ anilin trong khoảng 16 – 12000 µmol/L cho thấy tốc độ phản ứng đạt giá trị cực đại khi nồng độ anilin là 250 µmol/L. Do đó để xác định hoạt độ CYP2E1 khi sử dụng 0,4 mg microsom/ml thì cần sử dụng nồng độ anilin tối thiểu là 250 µmol/L. Chúng tôi đã sử dụng mức nồng độ này cho các thí nghiệm tiếp theo trong nghiên cứu. Nồng độ 250 µmol/L thấp hơn đáng kể so với nồng độ 15 mmol/L trong nghiên cứu của

Chatuphonprasert W. và cộng sự [5]. Nồng độ cơ chất cần thiết phản ứng enzym đạt tốc độ tối đa phụ thuộc vào hằng số Michealis-Menten (Km) và nồng độ enzym. Chatuphonprasert W. và cộng sự sử dụng CYP2E1 có trong microsom phân lập từ gan chuột nhắt với nồng độ 1,5 mg microsom/ml. CYP2E1 trong microsom phân lập từ chuột nhắt có khả năng xúc tác phản ứng hydroxyl hóa một số cơ chất có nhân benzen mạnh hơn đáng kể so với CYP2E1 trong microsom phân lập từ gan chuột cống [8]. Do có sự khác biệt về CYP2E1 và nồng độ microsom trong nghiên cứu của Chatuphonprasert W. và cộng sự với nghiên cứu của chúng tôi nên nồng độ anilin cần thiết để đạt tốc độ phản ứng tối đa trong hai nghiên cứu rất có thể là khác nhau nên cần phải xác định nồng độ cơ chất phù hợp cho mỗi nghiên cứu. Nồng độ cơ chất quá cao cũng có thể ức chế enzym và làm giảm tốc độ phản ứng [9]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy sử dụng anilin nồng độ cao (tới 12000 µmol/L) cũng không ảnh hưởng tới tốc độ phản ứng, chứng tỏ hoạt tính CYP2E1 có trong microsom phân lập từ gan chuột cống không bị ức chế bởi anilin ở nồng độ cao. Tuy nhiên việc sử dụng nồng độ cơ chất quá cao là không cần thiết và gây tốn hóa chất, tăng chi phí cho các thí nghiệm. Vì vậy, chúng tôi chỉ sử dụng anilin ở nồng độ 250 µmol/L cho các nghiên cứu tiếp theo. Mặc dù cơ chất anilin không đặc hiệu tuyệt đối với CYP2E1 [10] nhưng vẫn được sử dụng trong nhiều nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các chất đến hoạt tính CYP2E1 do phương pháp thực hiện tương đối đơn giản, phù hợp với nhiều phòng thí nghiệm.

Về ảnh hưởng của nồng độ NADPH

Trong các phản ứng có sự xúc tác của enzym CYP450, NADPH có vai trò là chất cung cấp điện tử để oxi hóa cơ chất [11]. Do vậy cần phải bổ sung NADPH cho phản ứng hydroxyl hóa anilin dưới sự xúc tác của CYP2E1. Nồng độ NADPH ảnh hưởng tới tốc độ của phản ứng oxi hóa cơ chất [11] nên cần thiết phải xác định nồng độ NADPH để phản ứng đạt tốc độ cực đại khi xác định hoạt độ enzym. Trong một số nghiên cứu, tác giả sử dụng NADPH nồng độ 1 mmol/L [5], [12], chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của tốc độ phản ứng hydroxyl hóa anilin bởi nồng độ NADPH trong khoảng 0,1 – 1,6 mmol/L. Kết quả cho thấy tốc độ phản ứng đạt giá trị cực đại khi sử dụng nồng độ NADPH từ 0,4 mmol/L trở lên. Do vậy, trong thí nghiệm của chúng tôi (sử dụng 0,4 mg microsom/ml) thì chỉ cần sử dụng nồng độ NADPH 0,4 mmol/L để xác định hoạt độ CYP2E1. Sử dụng nồng độ NADPH cao hơn (tới 1,6 mmol/L) không làm thay đổi tốc độ phản ứng. Do NADPH có giá thành cao (khoảng 7 triệu đồng/100 mg) nên sử dụng NADPH nồng độ cao sẽ làm tăng đáng kể chi phí thí nghiệm nên chúng tôi chỉ sử dụng nồng độ 0,4 mmol/L cho các nghiên cứu tiếp theo. Do NADPH có giá thành cao nên chúng tôi cho rằng việc xác định nồng độ NADPH tối thiểu để phản ứng đạt tốc độ cực đại là rất cần thiết để giảm chi phí nghiên cứu, đặc biệt là các nghiên cứu cần thực hiện nhiều thí nghiệm ví dụ nghiên cứu sàng lọc các chất có tác dụng ức chế/hoạt hóa CYP2E1.

Về ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Trong các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ cơ chất anilin và NADPH, chúng tôi đã xác định được nồng độ hai chất này cần sử dụng để tốc độ phản ứng luôn đạt giá trị cực đại trong thời gian phản ứng. Tuy nhiên tốc độ cực đại của phản ứng còn phụ thuộc vào khả năng xúc tác của enzym [13]. Để đánh giá liệu sau một thời gian nhất định khả năng xúc tác phản ứng của CYP2E1 trong microsom có thay đổi hay không, chúng tôi thực hiện phản ứng trong các khoảng thời gian khác nhau (10 – 40 phút) với điều kiện nồng độ anilin và NADPH đủ lớn để tốc độ phản ứng đạt giá trị cực đại. Kết quả cho thấy tốc độ phản ứng trung bình (hoạt độ CYP2E1) có xu hướng giảm khi thời gian phản ứng

tăng trong khoảng 20 – 40 phút. Điều này chứng tỏ rằng tốc độ phản ứng giảm khi thời gian phản ứng quá 20 phút dẫn tới tốc độ phản ứng trung bình giảm, rất có thể vì sau một thời gian phản ứng thì khả năng xúc tác của phản ứng giảm do cấu trúc của enzym hoặc cấu trúc của microsom chứa enzym thay đổi do ảnh hưởng của nhiệt độ hoặc các thành phần khác trong hỗn hợp phản ứng. Do vậy để xác định hoạt độ CYP2E1 cần lựa chọn thời gian phản ứng dưới 20 phút để tốc độ phản ứng luôn đạt giá trị cực đại trong toàn bộ khoảng thời gian phản ứng. Tuy nhiên lựa chọn thời gian quá ngắn thì lượng sản phẩm p-aminophenol tạo thành không đủ lớn để có thể định lượng được. Như kết quả cho thấy khi thời gian phản ứng là 10 phút thì độ lặp lại của kết quả giữa các lần thí nghiệm thấp hơn so với khi thời gian phản ứng là 20 phút (thể hiện ở giá trị SD cao hơn). Do đó, chúng tôi cho rằng thời gian phản ứng 20 phút là thích hợp cho các thí nghiệm cần xác định hoạt độ CYP2E1 có trong microsom do chúng tôi phân lập được từ gan chuột cống. Thời gian phản ứng này giống với một số nghiên cứu [4], [5] nhưng ngắn hơn so với một số nghiên cứu khác [12], [14]. Thời gian phản ứng thích hợp rất có thể phụ thuộc vào nồng độ microsom cũng như nguồn gốc của microsom nên theo chúng tôi cần phải xác định thời gian phản ứng thích hợp để góp phần làm tăng độ tin cậy của các thí nghiệm cần xác định hoạt độ enzym.

Từ kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ anilin, nồng độ NADPH và thời gian phản ứng, chúng tôi xác định được điều kiện thích hợp để xác định hoạt độ CYP2E1: 1 ml hỗn hợp phản ứng gồm 0,7 ml dung dịch đệm phosphat; 0,1 ml microsom nồng độ 4 mg/ml; 0,1 ml anilin nồng độ 2,5 mmol/L; 0,1 ml NADPH nồng độ 4 mmol/L; thời gian phản ứng là 20 phút. Chúng tôi đã sử dụng điều kiện này để đánh giá ảnh hưởng của DMSO – một chất ức chế chọn lọc CYP2E1 cho kết quả tương đồng với nghiên cứu của Bürenheide A. và cộng sự [15].

Kết luận

Nồng độ anilin, nồng độ NADPH và thời gian phản ứng đều ảnh hưởng tới tốc độ phản ứng hydroxyl hóa anilin xúc tác bởi CYP2E1 có trong microsom phân lập từ gan chuột cống. Khi sử dụng 0,4 mg microsom/ml, để tốc độ phản ứng đạt giá trị cực đại thì cần sử dụng anilin và NADPH có nồng độ tối thiểu lần lượt là 250 µmol/L và 0,4 mmol/L. Với điều kiện phản ứng này, thời gian phản ứng thích hợp là 20 phút. Điều kiện vừa được xác định ở trên là phù hợp để tiến hành các nghiên cứu về ảnh hưởng của các chất nghiên cứu/dược liệu trên hoạt tính CYP2E1 có trong microsom phân lập được từ gan của chuột cống của chúng tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Venkatakrishnan, K., et al., *Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of in vitro models*. Current drug metabolism, 2003. **4**(5): pp. 423-459.
2. Nguyễn Xuân Bắc, Đ.T.M.A., Nguyễn Thị Lập, *Đánh giá ảnh hưởng của tuổi chuột và điều kiện bảo quản gan chuột đến hiệu suất phân lập microsom từ gan chuột cống*. Tạp chí Y Dược học, 2020. **9/2020**(2): pp. 5.
3. Chen, J., et al., *A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism*. Drug metabolism reviews, 2019. **51**(2): pp. 178-195.
4. Yuan, F., et al., *Effects of matrine and oxymatrine on catalytic activity of cytochrome P450s in rats*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2010. **107**(5): pp. 906-913.

5. Chatuphonprasert, W. and K. Jarukamjorn, *Impact of six fruits—banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya—on murine hepatic cytochrome* P450 activities. Journal of Applied Toxicology, 2012. **32**(12): pp. 994-1001.
6. Chen, A., et al., *Evaluation of the inhibition potential of plumbagin against cytochrome P450 using LC-MS/MS and cocktail approach.* Scientific reports, 2016. **6**(1): pp. 1-12.
7. Ainsworth, S., *Michaelis-menten kinetics, in Steady-state enzyme kinetics.* 1977, Springer. pp. 43-73.
8. Tamie, N., et al., *Cytochrome P450-related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes*. Biochemical pharmacology, 1993. **45**(5): pp. 1079-1085.
9. Bisswanger, H., *Enzyme assays.* Perspectives in Science, 2014. **1**(1-6): pp. 41-55.
10. Hartman, J.H., K. Knott, and G.P. Miller, CYP2E1 hydroxylation of aniline involves negative cooperativity. Biochemical pharmacology, 2014. **87**(3): pp. 523-533.
11. Farooq, Y. and G.C. Roberts, *Kinetics of electron transfer between NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 3A4.* Biochemical Journal, 2010. **432**(3): pp. 485-494.
12. Salhab, H., D.P. Naughton, and J. Barker, *Validation of an HPLC method for the simultaneous quantification of metabolic reaction products catalysed by CYP2E1 enzyme activity: inhibitory effect of cytochrome P450 enzyme CYP2E1 by salicylic acid in rat liver microsomes.* Molecules, 2020. **25**(4): p. 932.
13. Duggleby, R.G., *Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions.* Methods, 2001. **24**(2): pp. 168-174.
14. Gao, N., D. Zou, and H.-L. Qiao, *Concentration-dependent inhibitory effect of baicalin on the plasma protein binding and metabolism of chlorzoxazone, a CYP2E1 probe substrate, in rats in vitro and in vivo.* PLoS One, 2013. **8**(1).
15. Bürenheide, A., T. Kunze, and B. Clement, *Inhibitory Effects on Cytochrome P450 Enzymes of Pentamidine and Its Amidoxime Pro-Drug.* Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2008. **103**(1): pp. 61-65.