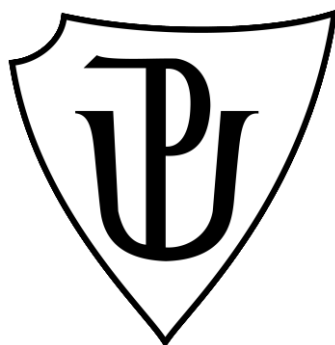


U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Molekulární mechanismy lékových interakcí
v cytochromech P450**

Bakalářská práce

Autor:	Eliška Ryšavá
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ing. Václav Bazgier
Konzultant:	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Akademický rok:	2015

P a l a c k ý U n i v e r s i t y i n O l o m o u c

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



**Molecular Mechanism of Drug-Drug Interactions
in Cytochromes P450**

Bachelor Thesis

Author:	Eliška Ryšavá
Study programme:	B1407 Chemistry
Study branch:	Applied Chemistry
Form of study:	Full-time
Supervisor:	Mgr. Ing. Václav Bazgier
Consultant:	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Academic year:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a použila jen uvedené citované zdroje.

V Olomouci dne 30. dubna 2015

Eliška Ryšavá

Děkuji Mgr. Ing. Václavu Bazgierovi za odborné vedení bakalářské práce. Děkuji RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky při zpracování a reprodukci výsledků. Děkuji Mgr. Veronice Navrátilové za ochotnou pomoc při tvorbě obrázků, Mgr. Aleně Dostálové za korekci gramatiky a všem blízkým, kteří mě při psaní i v celém studiu podporovali.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Eliška Ryšavá
Název práce	Molekulární mechanismy lékových interakcí v cytochromech P450
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	Mgr. Ing. Václav Bazgier
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

K lékovým interakcím dochází také v cytochromech P450, které hrají důležitou roli v metabolismu xenobiotik a hormonů. Tyto interakce mohou vést k vážným problémům v léčbě – zvýšenému množství vedlejší příznaků, nebo naopak k vyrušení léčebných účinků. V této práci se zaměřuji na jednu z *in silico* metod – molekulární dokování, která by mohla být prostředkem k pochopení mechanismů lékových interakcí.

Cílem této práce je seznámit čtenáře s typy lékových interakcí a funkcí cytochromů P450 v organismu. Následné hledání v literatuře přispělo k výběru programu AutoDock Vina, který jsem použila k dokování dvojic látek a porovnání výsledků s experimentálními kinetickými měřeními. Nakonec jsem vymezila další možné použití této metodiky ke studiu dalších neznámých lékových interakcí.

Klíčová slova	Lékové interakce, cytochrom P450, molekulární dokování
Počet stran	39
Počet příloh	1 CD-ROM
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Ryšavá
Title	Molecular Mechanism of Drug- Drug Interactions in Cytochromes P450
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical chemistry
Supervisor	Mgr. Ing. Václav Bazgier
The year of presentation	2015

Abstract

Drug-drug interactions can occur also in the cytochromes P450, which play an important role in the metabolism of xenobiotics and hormones. These interactions can lead to significant problems in treatment - a wide range of side effects or conversely a cancelation of the therapeutic effects. This thesis focuses on one of the *in silico* methods – molecular docking, which could lead to the understanding of the mechanisms of drug-drug interactions.

The aim of this thesis is to acquaint the reader with the types of drug-drug interactions and the function of the P450 cytochromes in organism. The docking program AutoDock Vina was chosen during literature search. It was used for the docking of pairs of substances and comparison to experimental kinetic data. Lastly, further possible uses of this method for the study of unknown drug-drug interactions were discussed.

Keywords	Drug-drug interactions, cytochrome P450, molecular docking
Number of pages	39
Number of appendices	1 CD-ROM
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Lékové interakce	2
2.1.1	Souvislost lékových interakcí s CYP	3
2.2	Cytochromy P450 (CYP)	4
2.2.1	Funkce CYP	4
2.2.2	Objevení CYP	4
2.2.3	Rodina CYP	5
2.2.4	Struktura CYP	6
2.2.5	Katalytický cyklus CYP	7
2.2.6	Alosterie CYP	7
2.2.6.1	CYP3A4	9
2.3	Srovnání s experimentálními daty	9
2.3.1	Carbamazepin (CBZ)	10
2.3.2	Progesteron (PGS)	10
2.3.3	α -naphthoflavon (ANF)	10
2.3.4	Testosteron (TST)	10
2.3.5	ANF a TST	11
2.3.6	PGS a CBZ	12
3	METODY	13
3.1	Molekulární dokování	13
3.1.1	Typy programů pro dokování do CYP	13
3.2	Softwarové vybavení	14
3.2.1	AutoDock Vina	14
3.2.2	PyMOL	14
3.3	Metodika dokování	14
3.3.1	Historie postupu	14
3.3.2	Konečné nastavení parametrů	15
3.3.3	Aktivní místo a antechamber	16
3.4	Metoda SMARTCyp	18
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	19
4.1.1	Používané programy pro dokování do CYP v letech 2011-2015	19

4.1.1.1	Rok 2011	19
4.1.1.2	Rok 2012	19
4.1.1.3	Rok 2013	20
4.1.1.4	Rok 2014	20
4.1.1.5	Rok 2015	21
4.2	Výsledky dokování.....	22
4.2.1	ANF a TST.....	23
4.2.2	CBZ a PGS.....	26
4.2.3	Predikce možných interakcí.....	28
4.2.3.1	Interakce s hormony	28
4.2.3.2	Léková interakce na modelu ANF a CBZ	28
5	ZÁVĚR.....	30
6	SUMMARY	31
7	SEZNAM LITERATURY.....	31
8	SEZNAM ZKRATEK	37
9	SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK	38

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Lékové interakce při současném podání více léčiv mohou vést ke značným problémům v léčbě – vyrušení léčebných účinků, nebo naopak k projevu vedlejších příznaků. Tento problém je o to palčivější, že otestovat při přípravě a výběru léčiv všechny kombinace předem a zohlednit i látky obsažené v dietě není experimentálně zcela možné. Proto se sbírají data o účincích léčby a případných lékových interakcích i po uvedení léku na trh. Nicméně v případě, kdy by bylo možné lékové interakce předpovědět, bylo by zapotřebí méně testů a také by byla možnost předejít alespoň některým nežádoucím vedlejším účinkům léčby.

Ale k tomu, abychom byli schopni předpovídat lékové interakce, musíme nejdřív pochopit, jakým mechanismem lékové interakce v organismu působí. Díky rozvoji technik výpočetní chemie a strukturní biologie se dnes stává racionální *in silico* návrh léčiv jedním z nástrojů, kterými se můžeme snažit pochopit, jak léčiva působí. A není tudíž zcela nemožné použít tyto nástroje i k pochopení lékových interakcí.

V této práci jsem shromáždila rešerši o známých typech lékových interakcí a zaměřila se na lékové interakce spojené s metabolismem léčiv v cytochromech P450. Následně jsem hledala v literatuře používané metody molekulového dokování v cytochromech P450, posléze jsem vybrala vhodný a rychlý program Autodock Vina ke studiu dokování dvojic látek do cytochromu P450 3A4 a porovnála jsem tyto výsledky s experimentálními zjištěními. Nakonec jsem vymezila možné budoucí využití použité metodiky k predikci zatím nezjištěných lékových interakcí včetně silných a slabých stránek tohoto přístupu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lékové interakce

Označení „*lékové interakce*“ se používá pro situace, ve kterých účinek léku ovlivní léčivo nebo i jiné látky. Zabývat se lékovými interakcemi je důležité především pro lékaře při podání nového léčiva tak, aby nedošlo ke kontraindikaci léků a zvýšení možnosti vedlejších účinků nebo naopak ke zlepšení účinků již podaných léčiv na organismus.¹ Nesmíme ovšem zapomínat i na možné reakce mezi léčivem a potravinami, které konzumujeme. Lékové interakce tedy mohou být výsledkem mnoha *farmakodynamických* vlastností léčiva – tedy jejich působení v místě účinku, i mnoha procesů ve *farmakokinetice* léčiva – tedy šíření a metabolismu léčiva shrnutých ve farmakologickém pojmu ADME (Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Exkrece).

Je až neuvěřitelné, kolik faktorů ovlivňuje jak metabolismus léčiv, tak i lékové interakce. Stárnutí a s tím spojené fyziologické změny – horší přenos nervových vzruchů, zhoršení funkce jater a ledvin, a tím pomalejší reakce a přizpůsobení se na interakce – mohou zapříčinit další nedostatky ve správném metabolismu². Dále například lék snižující srážení krve – warfarin, používaný především po komplikovaných zlomeninách končetin a při kardiovaskulárních onemocněních, je schopen dávkou pro Evropana zabít Asiata.³ Etnickou příslušnost tedy můžeme připočítat k ovlivňujícím faktorům. V neposlední řadě jde o genetické předpoklady, množství předepsaných léků či pohlaví, protože každý máme jinou skladbu genů a nemocí, a tak je i jiná odezva na léčivo.

Podle míry účinku rozeznáváme dva základní typy lékových interakcí - *synergickou*, kdy se zvýší účinek léku, a *antagonistickou*, kdy se naopak účinek sníží. Synergická interakce se vyznačuje zvýšením koncentrace jedné či obou látek.

Léčivé látky se odlišují afinitou (schopností tvořit komplexy) a aktivitou (schopností vyvolat účinek). Na základě těchto dvou vlastností se dělí na agonisty a antagonisty. Aktivita *agonisty* je nenulová a jeho afinita k cílové struktuře může být různá. Rozlišujeme úplného agonistu (vyvolá maximální možný účinek) a parciálního agonistu (vyvolá pouze částečný účinek). Naopak *antagonista* často mívá afinitu vyšší než agonista, protože chce agonistu vytlačit z vazby v cílové struktuře. Nevývolává ale žádný účinek, a tak je jeho aktivita je nulová. Antagonisté se tak používají jako protilátky při mnoha intoxikacích.⁴

Dále můžeme rozdělit interakce podle vlivu na žádoucí a nežádoucí, nebo také pozitivní a negativní. *Žádoucí interakcí* může být například podání antagonisty (lék naloxon) při předávkování agonistou (morfium). Naopak *nežádoucí účinek* může nastat například v případě užití léku na bolest hlavy a zároveň černého uhlí na průjem. Černé uhlí na sebe totiž kromě bakteriálních toxinů, které ho mohou způsobovat, váže léčivou látku, kterou jsme přijali. Ta se tedy stává neúčinnou.

Hlavní rozdělení lékových interakcí zahrnuje farmakodynamické lékové interakce a farmakokinetické lékové interakce.

Farmakodynamika popisuje působení léčiva na organismus. Zahrnuje specifický a nespecifický mechanismus účinku léčiv a sleduje změny vyvolané léčivou látkou na úrovni molekulární buněčné, tkáňové i systémové. Především se ale soustředí na interakce mezi léčivy navzájem. K takovýmto interakcím dochází při působení různých léčiv na stejný receptor, orgán či systém.

Příkladem takové vzájemné reakce může být například kombinace léků na spaní spolu s alkoholem, kdy je utlumena centrální nervová soustava, nebo podání ibuprofenu spolu s warfarinem snižujícím srážlivost krve ještě více, než je primárně zamýšleno.

Farmakokinetika popisuje, jakým způsobem a jakými cestami se léčivo pohybuje po organismu, aby dosáhlo nejvyššího účinku a následně se vyloučilo. Jde tedy o vliv organismu na lék. Tyto děje se souhrnně označují jako ADME.

K absorpci, tedy přijetí léčiva do organismu a následně do krevního oběhu lze využít mnoho cest, které jsou ovlivňovány fyziologickými a fyzikálně chemickými vlastnostmi. K interakcím léčiva může docházet při průniku přes biologické membrány, proto je dáván důraz na hydro/lipofilní vlastnosti, velikost molekuly či pH.

Po absorpci dochází k přechodu látky z krve do okolních tkání – distribuci. Probíhá pomocí navázání látky na plazmatické bílkoviny, o které navzájem často soutěží a tím se vytěsňují. V případě léčiv je nutné překonat bariéry chránící citlivé tkáně. Stane se tak, že jedna látka prostupuje lépe než druhá, dostává se tak dříve na místo metabolismu a může svým odbouráváním ovlivnit zpracovávání druhé látky.

Již zmíněný metabolismus začíná s odstraněním molekuly z těla pomocí zvýšení její polarity.⁵ K tomu přispívá oxidace probíhající na cytochromu P450 (CYP), která je první fází této biotransformace. Tento enzym může být mnohými látkami indukován nebo inhibován. To má velký vliv na vznikající vzájemné působení mezi léčivy, ale i mezi potravou a léčivem. Silnými inhibitory CYP jsou například grapefruit a pomelo, což způsobuje zvýšení koncentrace metabolizovaného léčiva, a tak možnost předávkování.⁶ Naopak induktory myslíme nikotin, třezalku či grilované maso, které sníží koncentraci metabolitů léčiva, a tak se pro někoho u životně důležitých léků nemusí vůbec projevit jejich účinek. Je třeba však dát pozor, jaká izoforma CYP dané léčivo primárně metabolizuje, protože z léku proti kašli – kodeinu lze získat dva různě účinné metabolity.⁷ Další fáze biotransformace zahrnuje vznik neaktivních, vysoce hydrofilních metabolitů, které lze dobře vyloučit z organismu.

Posledním dějem je exkrece. Při ní už k lékovým interakcím nedochází z důvodu malých koncentrací látek v cestě přes ledviny či plíce.⁸

2.1.1 Souvislost lékových interakcí s CYP

Lékové interakce mají s CYP velmi blízkou spojitost, protože jsou to právě ony, kdo jsou odpovědné za metabolismus léčiv a mnoha dalších látek, mezi kterými mohou

vznikat vzájemné interakce. Jak už bylo zmíněno výše, metabolismus je jeden z dějů farmakokinetiky. Léčiva se ovlivňují například vzájemnou inhibicí při přístupu léčiv do aktivního místa cytochromů. Ovšem pomocí CYP se nemetabolizují pouze léčiva, ale i běžně dostupné hormony v našem těle jako progesteron a testosteron.

Pokud bychom byli schopni předpovědět veškeré interakce, které mohou při metabolismu dvou léčiv nebo léčiva s potravou nastat, bylo by možné se vyvarovat mnoha nežádoucích účinků nebo naopak objevit nové interakce, které metabolismus zrychlí a například i zvýší účinek při menší dávce.

V této práci se zaměřuji zejména na interakce mezi dvěma dvojicemi látek – testosteronu s α -naphthoflavonem a carbamazepinu s progesteronem. U první zmíněné dvojice se předpokládá minimum vzájemných interakcí. Obě látky rovnoměrně soutěží o navázání do aktivního místa, ale nedochází k tomu, že by vazba jedné látky zvyšovala metabolismus látky druhé. U dvojice carbamazepinu s progesteronem už ovšem k ovlivňování dochází. V přítomnosti progesteronu i carbamazepinu se carbamazepin metabolizuje o mnoho lépe než bez progesteronu.

2.2 Cytochromy P450 (CYP)

2.2.1 Funkce CYP

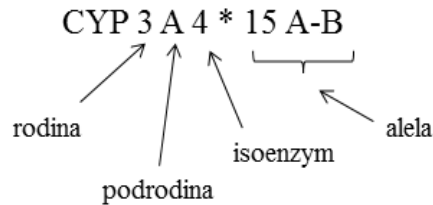
CYP patří mezi biotransformační enzymy katalyzující oxidačně-redukční a peroxidační reakce – řadíme je tedy do enzymatické třídy EC 1.14. Zajišťují odbourávání cizorodých látek – xenobiotik, u nichž zvyšují polaritu^{5,9}, aby se z těla lépe vyloučily. Účastní se také biosyntézy steroidních hormonů z cholesterolu. Na druhou stranu mají podíl i na vzniku metabolitů, které mohou být pro naše tělo toxické.

2.2.2 Objevení CYP

Objevení CYP předcházely dva z nejdůležitějších objevů v enzymologii a buněčné biologii. Navázáním na účinnou metodu pro buněčné dělení zvířecích tkání byla objevena nová část buňky nazvaná jako mikrosom¹⁰. Následným zkoumáním biochemických a morfologických vlastností mikrosomů izolovaných z myších jater byly mikrosomy identifikovány jako váčky endoplazmatického retikula hepatocytů¹¹. Další laboratorní studium mikrosomů vedlo k objevení pigmentu vážícího se na oxid uhelnatý v přítomnosti NADH, který redukuje mikrosomy, a ukazujícího významný pík při vlnové délce 450 nm¹², což vedlo ke jménu cytochrom P450.

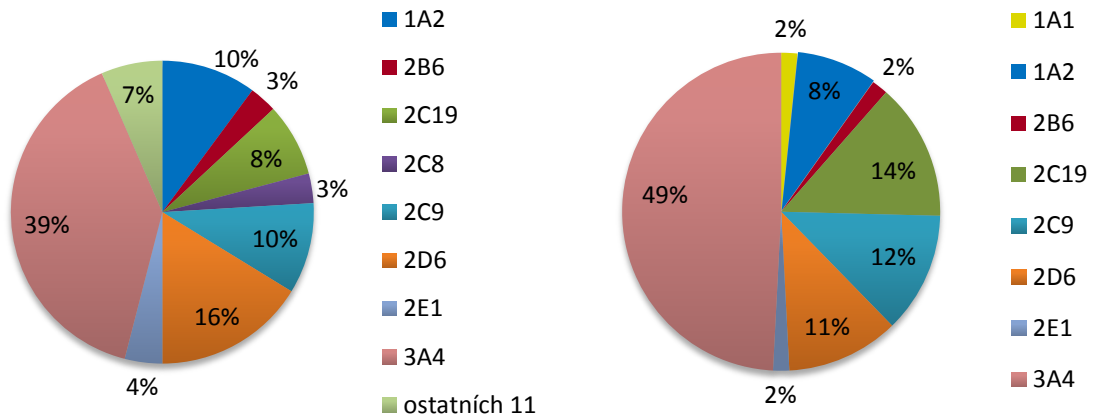
2.2.3 Rodina CYP

CYP tvoří celou superrodinu hemoproteinů, které jsou rozděleny podle biologické evoluce dané různými formami života od zvířat, rostlin, hub a bakterií.¹³ Příslušnost k superrodině se určuje na základě míry homologie sekvence aminokyselin. Název jednotlivých zástupců cytochromů P450 se skládá ze zkratky CYP, což značí příslušnost k superrodině, číslice označující rodinu, písmena pro podrodinu a poslední číslice identifikující jedinečný enzym. Dále následuje označení alely.¹⁴



Obrázek 1: Příklad označení CYP

Nejvíce léčiv je metabolizováno díky CYP3A4 a dále pak CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 a CYP2C19.¹⁵ I proto jsem si pro svůj výpočetní experiment zvolila CYP3A4, který se podílí na metabolismu asi 50% léčiv, ale i steroidních hormonů (progesteron, testosteron). Na grafu 1 je zobrazeno zastoupení jednotlivých izoforem cytochromů podle počtu metabolizovaných látek obecně a v grafu 2 pak dle počtu metabolizovaných xenobiotik.

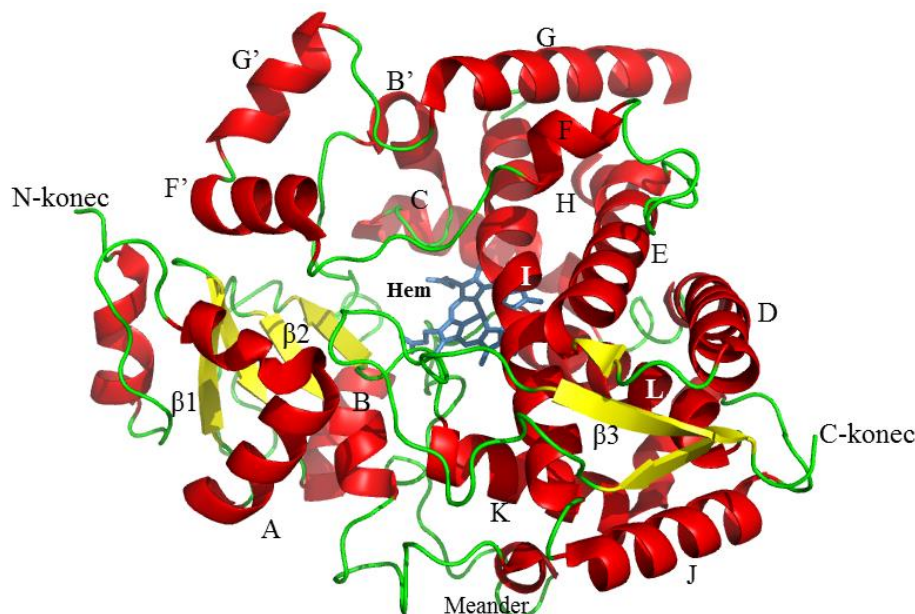


Graf 1: Zastoupení jednotlivých izoforem CYP podle počtu metabolizovaných látek¹⁶

Graf 2: Zastoupení hlavních izoforem CYP v metabolismu léčiv¹⁷

2.2.4 Struktura CYP

S vývojem rentgenografických metod a počítačového modelování máme v současnosti k dispozici trojrozměrnou strukturu 208 lidských enzymů z rodiny cytochromů P450. Tyto struktury jsou zpřístupněny na serveru Protein Data Bank (www.pdb.org) ve formátu PDB – protein databank file.



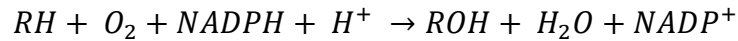
Obrázek 2: Struktura cytochromu P450 3A4 s anotovanými sekundárními prvky (PDB ID: 1W0E)

CYP je enzym s prostetickou skupinou hemem, který za své jméno vděčí původnímu objevení jako pigmentu, jenž vykazoval nejvyšší pík při hodnotě vlnové délky 450 nm. Obsahuje železo, které osciluje mezi dvojmocným a trojmocným stavem v redoxních reakcích.¹⁸ V roce 2005 však bylo objeveno železo v oxidačním stavu +IV v hlavní reaktivní formě.¹⁹

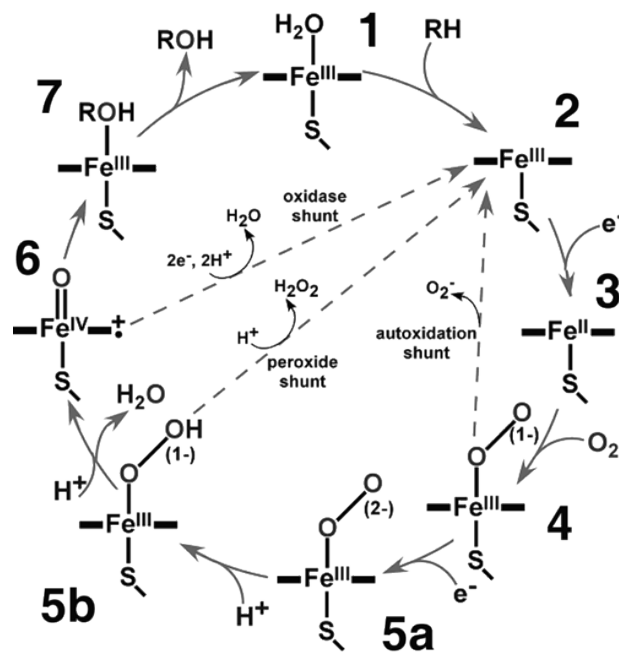
Jako každý protein i CYP obsahuje N-konec a C-konec. Dvanáct α -helixů tvořících bílkovinou složku se značí A-L a čtyři β -skládané listy jako β 1-4. Struktury, ve kterých je možné najít cystein se vzniklou thiolátovou vazbou, řadíme mezi nejkonzervativnější stejně jako část přenosového protonového systému, jenž je představován kyselinou glutamovou a oblastí okolo threoninu. Aktivní místa pro rozpoznání substrátu jsou u cytochromů P450 rozmístěna velmi podobně. Aminokyselinová sekvence se u nich ale velmi výrazně mění mezi různými formami cytochromů P450.²⁰

2.2.5 Katalytický cyklus CYP

Cytochrom P450 spolupůsobí s enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu- NADPH:cytochrom P450 reduktasou- nebo dalšími enzymy mitochondrií. Většinu reakcí začínající přenosem elektronů z NADPH na NADPH:P450 reduktasu nebo ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích a poté na vlastní cytochromy P450 lze sumárně vyjádřit jako ²¹:



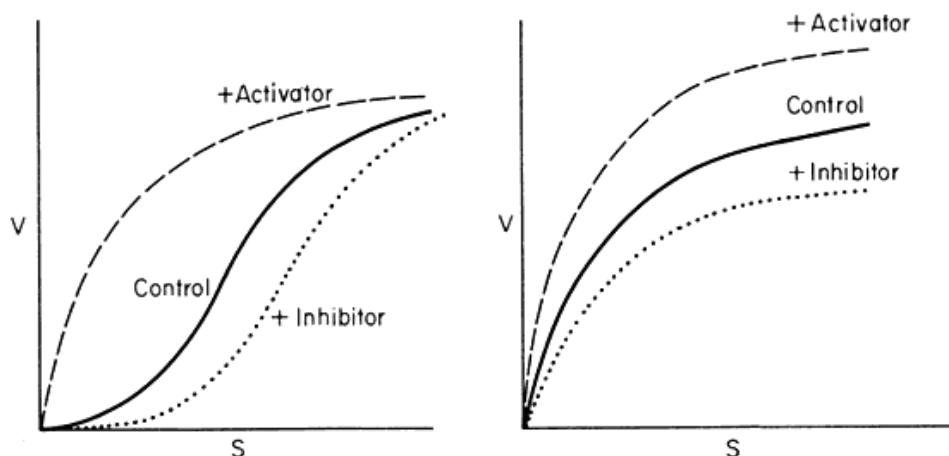
V aktivním místě enzymu se na hemové železo v oxidačním stupni Fe^{+III} naváže substrát RH. Po jednoelektronové redukci se vytvoří komplex $[Fe^{+II}\cdots RH]$, který je schopen vázat kyslík. Další komplex, který vzniká, se nazývá hemoperoxidový ($[Fe^{+IV}O_2^{-II}\cdots RH]$) a přijímá další elektron z NADPH. Tak vzniká $[Fe^{+III}OOH\cdots RH]$, jenž se rozpadá na vlastní oxidující formu $Fe^{+V}O^{-II}$. Tato forma oxiduje navázaný substrát a hemové železo se opět redukuje na Fe^{+III} . Produkt je nakonec uvolněn z komplexu za obnovy volného biokatalyzátoru. ²². Celý katalytický cyklus se skládá z nejméně 8 kroků a lze je vidět na obrázku 2.



Obrázek 3: Reakční cyklus cytochromu P450. (převzato z: ²³)

2.2.6 Alosterie CYP

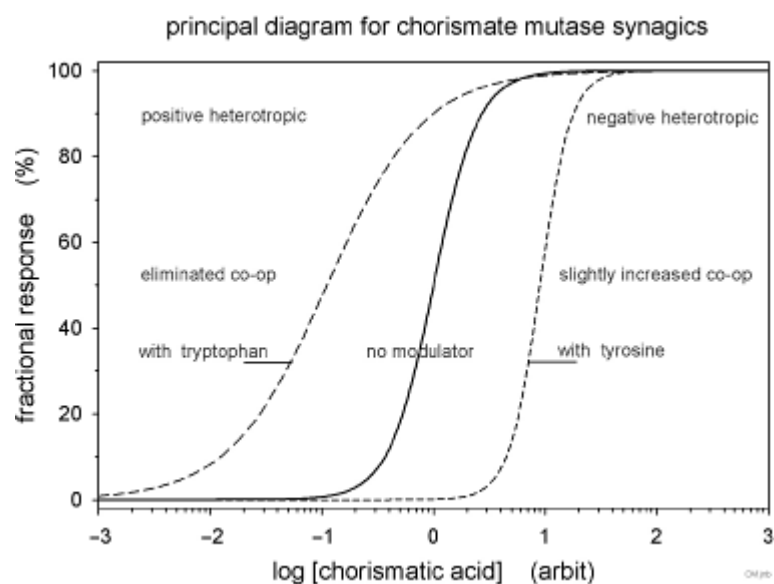
CYP můžeme také považovat za alosterické enzymy. Ty mají více aktivních míst, a tedy i více míst, kam se mohou vázat aktivátory a inhibitory. To je jeden z důvodů, proč se jejich kinetika neřídí podle rovnice Michaelise a Mentenové. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu má namísto hyperbolického charakteru charakter sigmoidní, jak je typické například u hemoglobinu.



Obrázek 4: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu pro alosterické enzymy (vlevo) a enzymy řídící se kinetikou Michaelise a Mentenové (převzato z: ²⁴)

Před 20 lety byla poprvé popsána nehyperbolická kinetika i u CYP - tzv. **homotropická kooperativita**, ²⁵ čímž byla odstartována vlna intenzivního studia alostericity CYP. Několik náznaků přivedlo vědce k vysvětlení pomocí modelu se dvěma a více ligandy. ²⁶

Další typ tzv. **heterotropické kooperativity** se liší tím, že navázáním jedné molekuly se druhá navázaná molekula začne zpracovávat rychleji. Navzájem tedy ovlivňují svoje odbourávání.

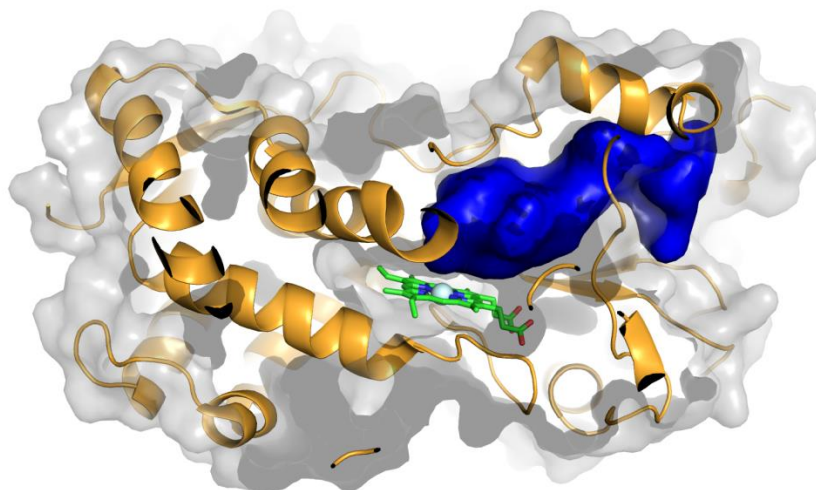


Obrázek 5: Heterotropické modifikace aktivity chorismát mutasy (převzato z: ²⁷)

2.2.6.1 CYP3A4

CYP 3A4 je cytochrom P450 s největším zastoupením v játrech, ale i ledvinách, tlustém střevě a dvanácterníku. Jak už bylo zmíněno, metabolizuje nejvíce léčiv. Substráty mohou být z hlediska karcinogeneze nejen xenobiotika, ale i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), steroidní látky, aromatické aminy, aflatoxiny, ale i fulereny. CYP3A4 je indukován např. barbituráty, rifampicinem a dexamethasonem.²⁸

Velikost vazebné kavity (Obrázek 5) se pohybuje v poměrně větších rozměrech – od 520 do 1386 Å³ v závislosti na jednotlivých krystalových strukturách, nastavení polohy aktivního místa i použitím algoritmu.^{29,30} Proto se vážou i natolik velké substráty jako je ketokonazol a erythromycin.³¹ Vzhledem k flexibilitě a velké kavitě se na CYP3A4 váže mnoho látek. To je důvod, proč se látky, které nejsou substrátem CYP3A4, často stávají jeho inhibitory.³²



Obrázek 6: CYP 3A4 (PDB ID: 1W0E) se zvýrazněnou vazebnou kavitou, upraveno v programu PyMOL

2.3 Srovnání s experimentálními daty

Jako podkladový materiál pro bakalářskou práci mi sloužil experiment od I. G. Denisova s názvem: „Mapping Drug-Drug Interactions in Human Cytochrome P450“ prezentovaný na 18th International Conference on Cytochrome P450 v Seattlu v červnu 2013. V této práci se autoři zaměřují na heterotropickou kooperativitu, kterou se vážou carbamazepin a progesteron do Cytochromu P450. K porovnání vazebné kooperativity v cytochromu P450 pomohl také článek, který předcházela tomuto posteru: „Analysis of Heterotropic Cooperativity in Cytochrome P450 3A4 Using α -naphthoflavone And Testosterone.“³³ V této vědecké práci bylo prokázáno, že v případě ANF a TST nejde o heterotropickou kooperativitu, jak se dá z názvu předpokládat, ale právě o vyvrácení této informace. Z důvodu použití těchto látek ke zkoumání interakcí jsem je použila i já.

2.3.1 Carbamazepin (CBZ)

CBZ patří mezi léčiva zabraňující křečím a výkyvům nálad. Slouží především k léčbě epilepsie, maniodepresivní psychózy a schizofrenie, protože je agonistou GABA receptorů. Bohužel je u ní ale možné pozorovat i mnoho vedlejších účinků jako malátnost, bolest hlavy, nevolnost a zvracení. Díky jeho možným interakcím se nedoporučuje jeho kombinování s jinými léčivými přípravky. Způsobuje rychlejší odbourání druhého podaného léčiva a tak i jeho neúčinnost. Asociace WHO zařadila tuto látku na seznam důležitých léčiv ve zdravotní péči.³⁴

2.3.2 Progesteron (PGS)

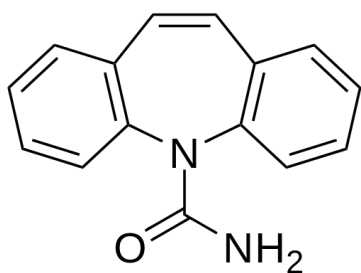
PGS je ženský pohlavní hormon. Je syntetizován z cholesterolu a řadíme ho mezi gestageny. V lidském těle plní funkci hormonu, který podporuje sekreční fázi menstruačního cyklu a v případě oplodnění i růst děložní sliznice po ovulaci. V případě neotěhotnění je jeho produkce především ve žlutém tělísku vaječnicků zastavena. Progesteron se v krevní plazmě váže na bílkovinný nosič a v játrech je poté možné ho z důvodu krátkého biologického poločasu rychle metabolizovat. Inaktivace probíhá navázáním kyseliny glukuronové v játrech. Je vylučován močí ve formě pregnandiolu¹⁸. Stejně jako u předchozí látky se na jeho metabolismu podílí CYP3A4.

2.3.3 α -naphthoflavon (ANF)

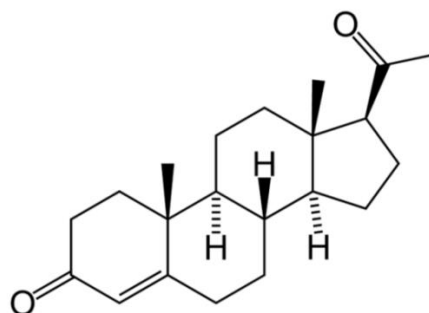
ANF je flavonoid, který se v přírodě vyskytuje v rostlině se jménem mučenka. Ta se využívá v potravinářství (plody maracuja, granadila) a medicíně (analgetické, sedativní a spasmolytické účinky). Její uplatnění je i v dochucovadlech. Tato sloučenina dokáže velmi účinně inhibovat enzym v lidských preadipocytech, který je zodpovědný za vznik estrogeneru z testosteronu.

2.3.4 Testosteron (TST)

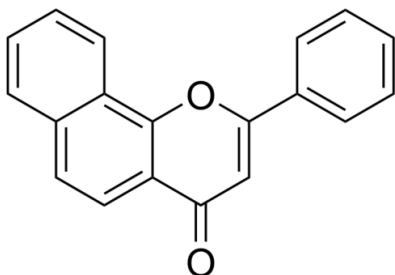
TST je mužský steroidní pohlavní hormon, který vzniká v Leydigových buňkách ve varlatech a částečně i kůře nadledvin a je odvozen od progesteronu. Řadíme jej k androgenům. U mužů zajišťuje vývoj sekundárních pohlavních znaků a spermatogenezi. Naopak brání vzniku osteoporózy díky podpoře ukládání vápníku. Regulace množství testosteronu se děje v hypotalamo-hypofyzárním systému.¹⁸ Metabolismus testosteronu probíhá díky cytochromům P450 redukcí na 5α -dihydrotestosteron. Malá část je přeměněna na estradiol.



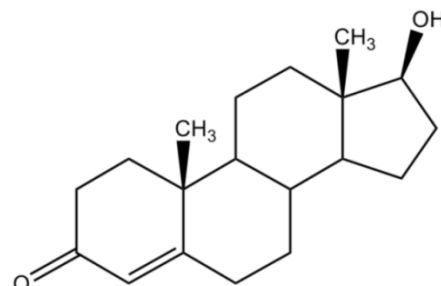
Carbamazepin (CBZ)



Progesteron (PGS)



α -naphthoflavon (ANF)

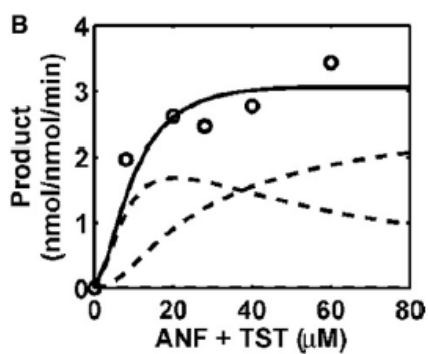


Testosteron (TST)

Obrázek 7: Struktury látek použitých ke studiu lékové interakce v cytochromech P450

2.3.5 ANF a TST

Ze zkoumání vazeb a vzájemných interakcí mezi ANF a TST bylo ve vědecké práci potvrzeno³³, že zjevná kooperativita ve směsi těchto dvou látek je srovnatelná se součtem příspěvků homotropické kooperativity obou samostatných substrátů. Není tam tedy žádná specifická heterotropická kooperativita mezi substráty.



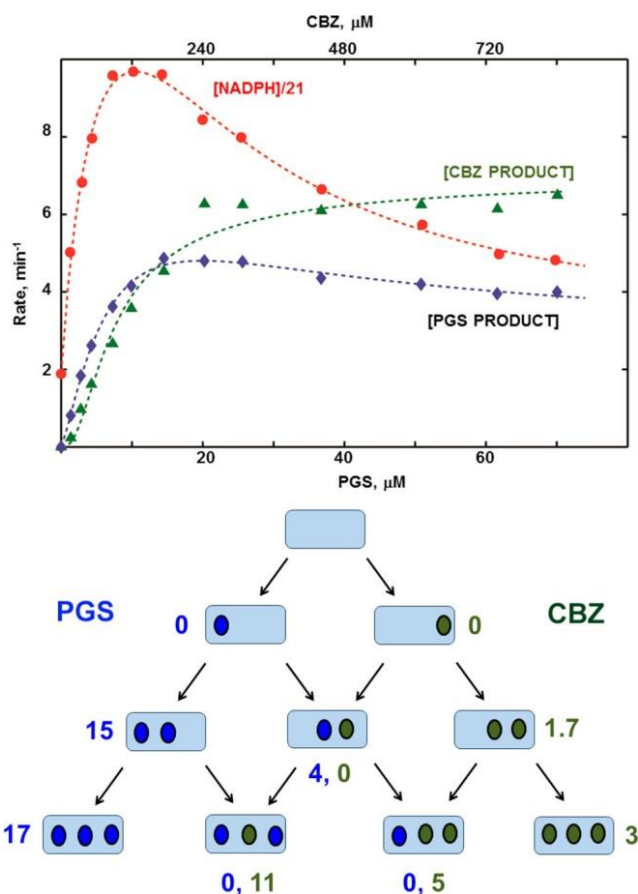
Obrázek 8: Vznik produktů ve směsi ANF a TST (převzato z:³³)

2.3.6 PGS a CBZ

Zmiňovaný poster navazuje na předchozí experimentální studii a specializuje se naopak na heterotropickou kooperativitu, kterou se v CYP3A4 vyznačují substráty CBZ a PGS. Heterotropická kooperativita se vyznačuje aktivací metabolismu jednoho substrátu a inhibicí druhého. CBZ blokuje metabolismus PGS, který ale na oplátku zrychluje metabolismus CBZ zřejmě přes alosterické místo. Celý experiment je založený na použití čistých substrátů CBZ, PGS a jejich směsí.

Výsledky pro směs CBZ a PGS v poměru 12 : 1 jsou zobrazeny na obrázku 9. Tento poměr byl zvolen na základě průměrných hodnot K_m z experimentů využívajících samostatné sloučeniny. Při nízkých koncentracích reaguje cytochrom pouze s jednou molekulou, kterou je v tomto případě PGS. Zvyšování koncentrace PGS nad určitou mez už neovlivní jeho zpracování a spolu s CBZ se tlačí o aktivní místo. Ovšem v případě přidání CBZ se tato molekula zachytí v aktivním místě a molekula PGS si najde místo ve vedlejší kavitě. CBZ se tak může rychleji metabolizovat, stoupá tak i jeho produkce, aby se udržovala daná koncentrace.

Při nízkých koncentracích budou soutěžit, která molekula se naváže dříve do aktivního místa.



Obrázek 9: Fungování metabolismu v případě směsi CBZ a PGS

Poznámka: Výsledky původně prezentované na posteru byly publikovány v době přípravy k odevzdání této bakalářské práce v článku.³⁵

3 METODY

3.1 Molekulární dokování

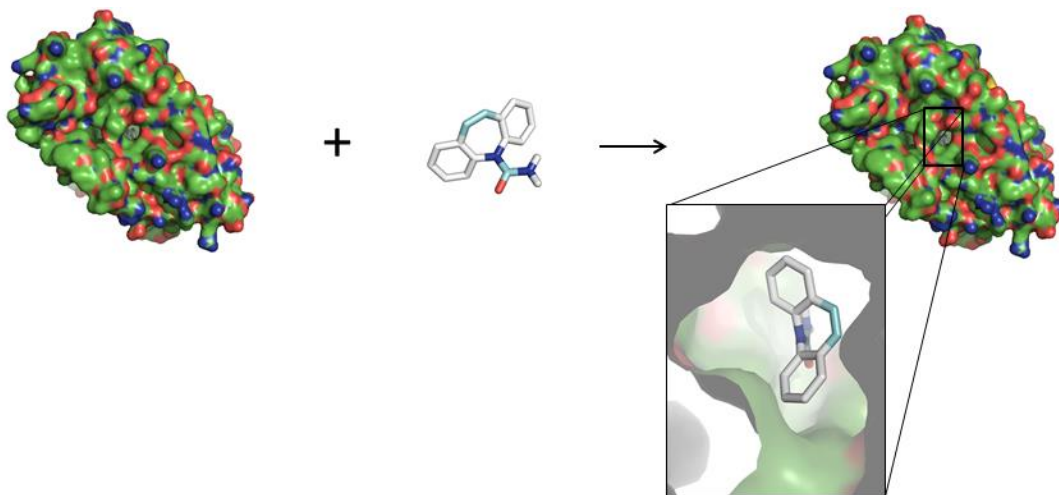
Molekulární dokování patří k tzv. structure-based racionálnímu návrhu léčiv, kde je známá struktura cíle a hledají se molekuly. Cílem dokování je nalézt nejlepší „fit“ mezi dvěma molekulami- ligandem a receptorem s aktivním místem. Metoda tedy predikuje pózu (geometrii) molekuly ve vazebném místě a také vazebnou afinitu (energií) reprezentující sílu vazby.

K vyhodnocení nekovalentních vazeb podle nejnižší hodnoty vazebné energie a „oskórování“ nejlepší vazebné pózy je využívána skórovací funkce. Ta podle svého typu využívá molekulárně-mechanická silová pole (force-field), experimentální vazebné afinity (empirical) nebo znalost celého komplexu ligand-receptor (knowledge based). Bohužel všechny typy mají nějaká omezení.³⁶

Skórovací funkce (1) může být definována jako suma přes všechny atomové páry mající více než tři kovalentní vazby a zahrnující veškeré interakční funkce dle atomového typu t_i , t_j ve vzdálenosti r .

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (1)$$

Problémem dokování bývá flexibilita ligandu, jeho různé konformace, zvolení správného aktivního místa či flexibilita receptoru. Všechny látky dokované pomocí programů AutoDock a AutoDock Vina jsou ve formátu PDBQT. Existují ale i jiné formáty jako např. mol2, které se používají pro jiné programy.



Obrázek 10: Tvorba komplexu při navázání ligandu do cytochromu P450

3.1.1 Typy programů pro dokování do CYP

Byla provedena rešerše (viz výsledky), která ukázala, že mnou používaný software AutoDock Vina sice nepatří k nejčastěji používaným jako je například AutoDock, ale je více dostupný než GOLD a patří k nejrychlejším v oblasti získání výsledků.

3.2 Softwarové vybavení

3.2.1 AutoDock Vina

AutoDock Vina patří mezi programy pro molekulární dokování a virtuální screening a využívá se především v dokování ligandů do proteinů. Vychází ze softwaru AutoDock 4 a je kompatibilní s programem AutoDock Tools³⁷, ve kterém lze nastavit velikost a umístění grid boxu (oblast pro dokování) a změnit formát proteinu i ligandu na PDBQT.³⁸ K práci s AutoDock Vina je třeba vytvářet konfigurační soubory a pracovat s příkazovým řádkem.

V mé bakalářské práci byl tento software použit jak pro celé dokování, tak k získání výsledných vazebných energií i pól ligandů.

3.2.2 PyMOL

Program PyMOL je molekulární vizualizační systém od firmy Schrödinger, který je využíván k mnoha typům zobrazení malých molekul i makromolekul. Ve své práci používám verzi 1.7.0.5 tohoto programu, v prosinci roku 2014 však byla vydána další. (www.pymol.org) PyMol umožňuje zjišťovat vzdálenosti atomů, zobrazovat pozici atomů i elektronovou hustotu, určení přítomnosti vodíkové vazby, či analyzovat okolí aktivního místa a rozeznávat jednotlivé aminokyseliny. Veškeré výsledky v experimentální části jsem vizualizovala v tomto programu.

3.3 Metodika dokování

3.3.1 Historie postupu

V úplných počátcích mé bakalářské práce bylo nejprve třeba naučit se používat veškeré programy - MarvinSketch pro nakreslení struktur ve správném 3D prostorovém zobrazení, AutoDock Tools pro úpravu sloučenin před dokováním, AutoDock Vina pro dokování a PyMOL pro zobrazení výsledků. Objevila jsem také možnosti příkazového řádku a z důvodu původního nejen manuálního dokování se učila i s prostředím Linux, které jsem nakonec nevyužila, z důvodu dobrých výsledků u manuálního experimentu.

Pro experiment jsem si s přispěním vedoucích vybrala CYP3A4 s PDB ID 1W0E, který jsme stáhli z databáze Protein Data Bank, protože jde o cytochrom P450, který váže především progesteron a metyrapon.³⁹ V celé struktuře jsem odstranila vody z důvodu zkreslování vazebných energií díky jejich přítomnosti a možnosti tvorby vodíkových můstků s ligandem⁴⁰ a přidala, opět za pomoci AutoDock Tools, vodíky, abych stabilizovala povrchový náboj.

Prvním problémem, který se v mé práci vyskytl, byla špatná struktura dvou z ligandů (ANF a PGS). Nenastavila jsem otáčivost ANF, a tak struktura nebyla rigidní. U PGS se jeden z cyklů stal aromatickým. Ovšem tyto malé nedostatky byly rychle napraveny.

Další maličkostí, se kterou jsem si nejdříve nevěděla rady, bylo přidání kladného náboje u Fe ve struktuře cytochromu. Nástroj AutoDock Tools má totiž problém s automatickým nabitím železa, ale zjistila jsem, že se hodnota náboje dá změnit

manuálně v souboru PDB či PDBQT. Po prostudování reakčního cyklu cytochromů, kde se neustále mění náboj na železe, jsem hodnotu náboje dala +II, protože molekulární kyslík se na železo v hemu váže za vzniku komplexu právě v oxidačním stavu + II.⁴¹ I přesto však byly velikosti vazebných energií neuspokojující.

Nakonec jsem vše vyřešila přidáním atomu kyslíku nad hem (přesněji 2 Å nad atom železa) do aktivního místa, kde dochází k metabolizování látek. Dokování jsem nejprve zkusila bez kyslíku, poté s kyslíkem, ale měl špatný náboj a výsledky stále nebyly uspokojivé, mnohdy až zcestné. Důvodem přidání kyslíku je lepší vaznost ligandu do aktivního místa, protože právě v 6. kroku katalytického cyklu (viz katalytický cyklus cytochromu P450) se na kyslík navázaný dvojitou vazbou na železo váže ligand. V metabolismu látek za pomoci cytochromů je tento krok zásadním reakčním krokem.⁴²

3.3.2 Konečné nastavení parametrů

Samotný experiment se skládal z několika kroků. Nejprve jsem si stáhla strukturu cytochromu P450 izoformy 3A4 s PDB ID 1W0E z databáze Protein Data Bank.³⁹ Následovalo zobrazení v programu PyMOL a úprava v podobě odstranění molekul vody a přidání kyslíku do struktury ve vzdálenosti 2 Å nad Fe. V AutoDock Tools jsem přidala vodíky a uložila ve formátu PDBQT, který je třeba při dokování v programu AutoDock Vina. V tomto formátu se ještě přepsáním změnil náboj na hemovém železe na hodnotu +II.

Příprava ligandu probíhala nejprve nakreslením molekul v programu MarvinSketch⁴³, nastavením otáčivosti, přidáním Kolmanových nábojů a uložení ve formátu PDBQT v AutoDock Tools.

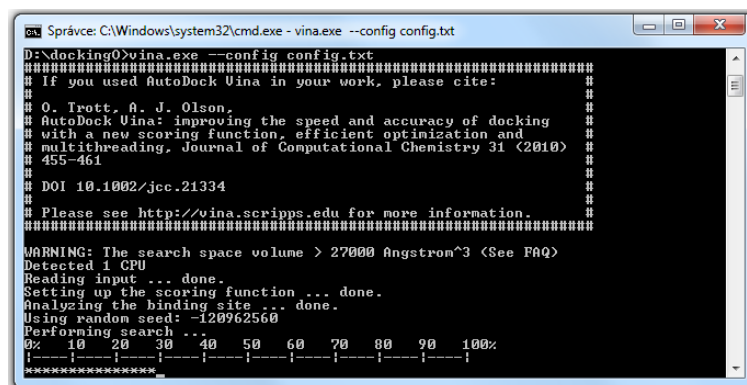
Dokování za pomoci programu AutoDock Vina verze 1.1.2 předcházelo sestavení konfiguračního souboru (Obrázek 11), který obsahoval především název receptoru a ligandu, souřadnice středu grid boxu a jeho velikost, dále pak stanovený rozdíl mezi nejlepší a nejhorší vazebnou pózou v kcal (energy_range), jak moc je zvolený prostor prohledáván (exhaustiveness), maximální počet vazebných póz ke generování a nakonec zvolené názvy pro výstupní soubory ve formátu PDB (pro zobrazení výsledků v programu PyMOL) a TXT (s hodnotami vazebných energií.)

```
receptor = 1w0Ec_o_progesterone.pdbqt
ligand = carbamazepine.pdbqt
center_x = 56.952
center_y = 77.691
center_z = 10.637
size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20
energy_range = 10
num_modes = 500
exhaustiveness = 20
out = r1w0ec_progesterone_carbamazepine.pdb
log = r1w0ec_progesterone_carbamazepine.txt
```

Obrázek 11: Konfigurační soubor pro dokování CBZ do aktivního místa cytochromu s navázaným progesteronem

Podle dokování do aktivního místa v blízkosti hemu nebo do tzv. antechamberu, byl stanoven střed a velikost grid boxu. Pro aktivní místo měl grid box tvar krychle o velikosti strany 20 Å a střed v bodě se souřadnicemi (56,952; 77,691; 10,637). Pro antechamber to byla opět krychle, avšak pro menší molekuly (ANF a CBZ) měla velikost 15 Å a pro větší molekuly (PGS a TST) potom 20 Å. Střed byl definován v bodě (65,098; 90,826; 11,022).

Zadávání příkazů pro dokování probíhá pomocí příkazového řádku v uživatelském prostředí Windows. Výpočetní proces je zobrazen na obrázku 12.

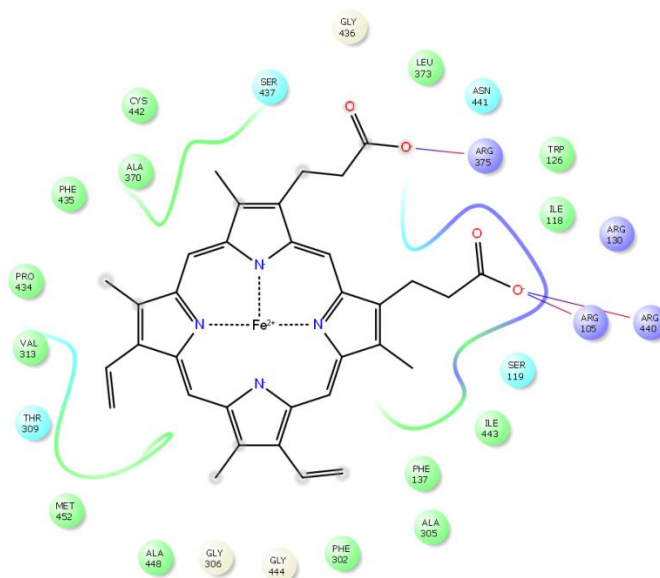


```
Správce: C:\Windows\system32\cmd.exe - vina.exe --config config.txt
D:\docking0>vina.exe --config config.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 1 CPU
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -120962560
Performing search ..
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
*****
```

Obrázek 12: Výpočetní proces dokování

3.3.3 Aktivní místo a antechamber

Aktivní místo cytochromu se nachází v kavitě, což je prostor ve vnitřní části molekuly. Kavita je zanořená hluboko v centru tohoto enzymu.⁴⁴ Aminokyseliny okolo aktivního místa tvoří jakýsi obal (Obrázek 13) a jsou schopné s metabolizující se látkou tvořit vodíkové vazby, a tak urychlovat či zpomalovat odbourávání.

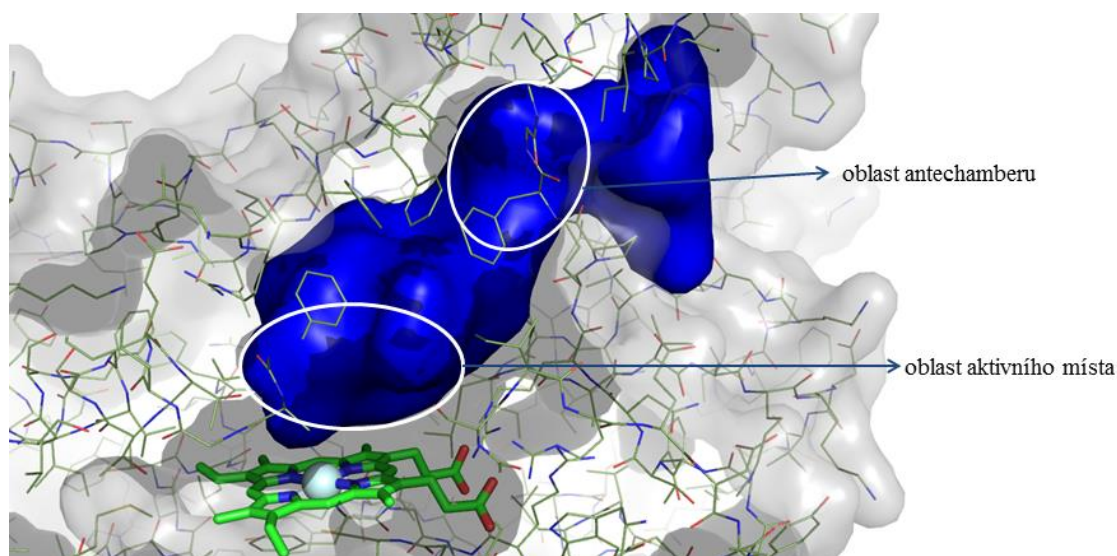


Obrázek 13: Aminokyseliny okolo aktivního místa s hemem (vytvořeno v programu Maestro od Schrödinger)

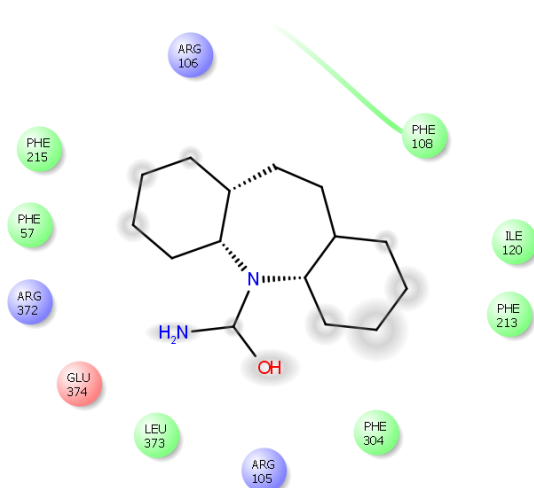
Okolí aktivního místa je dále vyplněno molekulami vody, které jsou, díky své provázanosti vodíkovými vazbami, schopné přenášet protony během katalyzované reakce.

Existuje návrh několika cest z a do aktivního místa, jejichž zkoumání začalo už při objevu první krystalové struktury cytochromu P450.⁴⁵ Tyto cesty jsou popisovány jako kanály či tunely, ze kterých se vybírají ty nejširší a nejkratší vedoucí z povrchu k aktivnímu místu.⁴⁶ Ve mnou zkoumaném CYP 3A4 tento kanál lemují B-C smyčka/ β -helix.

Místo antechamberu se pak nachází v krajní části kavity (Obrázek 14).



Obrázek 14: Umístění antechamberu a aktivního místa v kavitě cytochromu P450 3A4



Obrázek 15: Aminokyseliny okolo ligandu navázeného v antechamberu (vytvořeno v programu Maestro od Schrödinger)

3.4 Metoda SMARTCyp

V každé molekule existují místa, pozice atomů, kde začínají metabolické reakce. Odkazuje se na tzv. místo metabolismu – SoM – "site of metabolism". Pokud jsou tato místa známa, je možné optimalizovat metabolické parametry připravovaných látek a následně i upravovat zásadní parametry jako jsou toxicita, biodostupnost či bioaktivita dotyčného léčiva. Ke zjištění SoM atomu existují různé metody¹⁶, využívány jsou například hodnoty chemické reaktivity jednotlivých atomů a možnosti natočení ligandu do aktivního katalytického centra metabolizujícího enzymu. Mezi využívané výpočetní postupy řadíme kromě SMARTCypu i dokování.

SMARTCyp je software založený na předvypočtených aktivačních energiích z hustoty funkční teorie (DFT - density functional theory) pro předpovídání SoM.

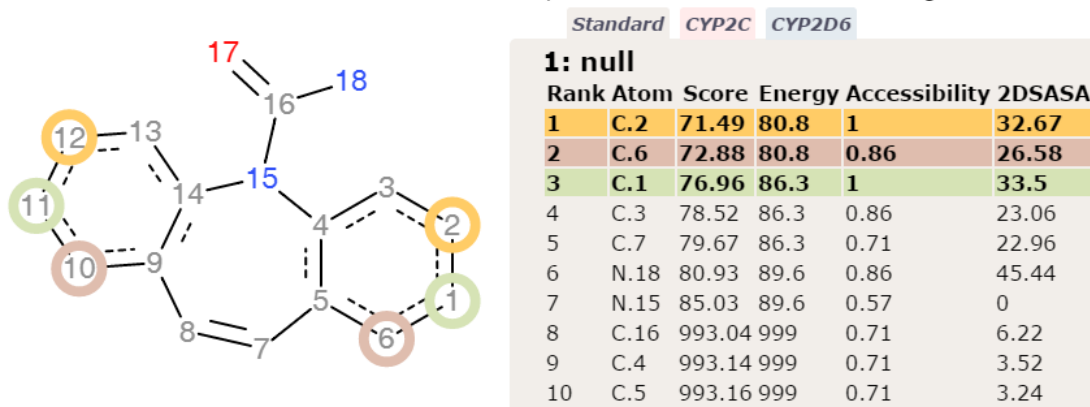
V online verzi 2.4.2 jej nalezneme na webových stránkách www.farma.ku.dk/smartyyp/. Zkoumanou molekulu máme možnost vložit třemi způsoby - nakreslením, pomocí nahrání v podporovaném formátu nebo jako SMILES. Výsledkem (Obrázek 15) jsou označené atomy na molekule, na kterých bude s největší pravděpodobností docházet k metabolickým změnám v jednotlivých cytochromech P450.⁴⁷

Ve své práci jsem SMARTCyp použila pro určení nejlepšího natočení ligandů vzhledem k poloze atomu kyslíku nad hemem.

Results from SMARTCyp version 2.4.2

These results were produced: 2015-03-24_10-47-55. The infiles were: [smiles.smi].

To alternate between heteroatoms and atom numbers, move the mouse cursor over the figure.



Obrázek 16: Výsledek metody SMARTCyp pro carbamazepin

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1.1 Používané programy pro dokování do CYP v letech 2011-2015

Na molekulární dokování lze v dnešní době použít mnoho programů od různých vývojových firem. Můžeme je rozřadit podle dostupnosti, rychlosti výsledků, či způsobu práce s nimi. A protože jsem chtěla zjistit, jak je software, který jsem pro potvrzení experimentu použila, aktuální a využívaný, sestavila jsem tuto rešerši.

Klíčová slova, která jsem využila pro hledání na webu www.webofknowledge.com: "docking" a "cytochrome P450". Zadané časové období bylo 2011- 2015. Podle knihy Drug Metabolism Prediction editované Johannesem Kirchmairem patří mezi nejvíce využívané programy pro dokování a predikci místa SoM: GOLD, Glide, AutoDock a AutoDock Vina¹⁶. Zaměřila jsem se proto na tyto čtyři programy a připojila ještě program MOE. Ostatní programy, se kterými jsem se setkala, budou zmíněny pouze okrajově. Informace jsou uváděny za sebou po jednotlivých rocích.

4.1.1.1 Rok 2011

Z roku 2011 lze nalézt asi 90 vědeckých článků. Pokud to tak lze napsat, prvním vítězem je program AutoDock, jehož zastoupení bylo v tomto roce největší. V porovnání s uplatněním ostatního softwarového vybavení se mu částečně může rovnat MOE, avšak na většinu doplňkových experimentů byly zvoleny spíše méně známé programy jako LigandFit, FlexX a SurflexDock.

Dokování bylo aplikováno především při výzkumu léků proti rakovině a HIV⁴⁸, pro predikci metabolismu různých látek, které by se mohly stát potencionálními inhibitory funkce cytochromů P450, a pro získání více informací o chování proteinů, jež zastupují funkci enzymů. Spolu s dokováním byl v několika případech použit i virtual screening, který se aplikuje na rychlé testování třeba i tisíců látek⁴⁹. Tyto látky mohou poté zaujmout roli testovací sady v užším výběru, či sloužit k další optimalizaci. Díky této metodě lze dojít i k zajímavým strukturám, které už mají potenciál stát se strukturním lešením budoucího léčiva a lze je nasyntetizovat a upravovat.

4.1.1.2 Rok 2012

Z celkového počtu asi 100 prací jich je přibližně 30% dokováno v programu AutoDock, za kterým následuje program MOE a GOLD. Mnou v této bakalářské práci použitý AutoDock Vina byl uplatněný v poměrně malé míře, ovšem vždy šlo o práci s cytochromem P450 v jeho izoforně 3A4, stejně jako u mé bakalářské práce. Pomocí AutoDock Vina byla také zkoumána enzymová kinetika z důvodu možných interakcí mezi léčivem a bylinami.

V tomto roce mě překvapily práce se studiem čínské medicíny⁵⁰, avšak více dopodrobna jsem se s nimi neseznamovala, protože využitě programy byly jiné, než které mě zajímaly. α -naphthoflavon, jako další zkoumaná látka, byl s velkým počtem dalších sloučenin zkoumán programy Dock a Glide jako jeden z inhibitorů CYP1A2⁵¹.

4.1.1.3 Rok 2013

Rok 2013 přinesl v oblasti dokování do cytochromu asi 70 prací, které byly mnohdy zaměřeny na objevy nových léčivých látek s protiplísňovými a protirakovinnými účinky, kde byly metody *in silico* zahrnuty jako součást experimentu. Připadalo mi, že větší důraz byl kladen na porovnávání lékových interakcí více substrátů než na testy s jedinou sloučeninou.⁵²

Hlavní roli v tomto roce hrál program AutoDock Vina, AutoDock a MOE, proto se mi znovu potvrdilo, že jeho volba byla správná. Mezi dalšími nejvíce figuroval GOLD, Glide, CDOCKER a Surflex-Dock.

Tento rok mě mimo jiné zaujal článek zaměřující se na princip fungování metody SMARTCyP, jako predikce SoM, a dokování s AutoDock Vina. Popisují i výpočty vazebných póz ve výsledcích pomocí os a úhlů vztažených k poloze hemu v cytochromu P450⁵². Spojení dokovacího softwaru spolu se softwarem pro predikci SoM je tak čím dál více využíváný.

4.1.1.4 Rok 2014

V roce 2014 bylo napsáno přibližně 60 prací, ve kterých bylo dokování do cytochromu P450 využito jako doplňkový či hlavní experiment. Bylo potvrzeno hlavní zastoupení nejpoužívanějších programů - Glide (11 prací), AutoDock (10 prací) a GOLD (8 prací). Mnou použitý AutoDock Vina predikoval výsledky pouze ve čtyřech případech, stejně jako MOE a CDOCKER. Ostatní programy měly malé zastoupení.

Mezi sloučeniny, jež sloužily jako ligandy a byly nejvíce zastoupené, patřily v tomto roce warfarin⁵³, léky proti tuberkulóze a HIV⁵⁴, chlorované dioxiny⁵⁵, či erythromycin a ribonavir s ketoconazolem⁵⁶. Speciální článek se zabýval také studiem efektu vody na ovlivnění výsledků v dokování.⁴⁰

Z pohledu receptorů mezi lidskými cytochromy P450 zvítězily izoformy 3A4, 1A1, 1A2, 2C9 a 2D6. Zaujaly mě však i cytochromy zebříček s izoformou CYP51⁵⁷ a moskytů 6AA3 a 6P7⁵⁸.

Experiment pro předpovídání lékových interakcí⁵⁹ prověřil dohromady 2515 léčiv v 611 cílových lidských proteinech za pomoci softwaru AutoDock Vina. Na lékové interakce se zaměřuji i já ve své práci, což mě utvrzuje ve správnosti volby programu AutoDock Vina.

4.1.1.5 Rok 2015

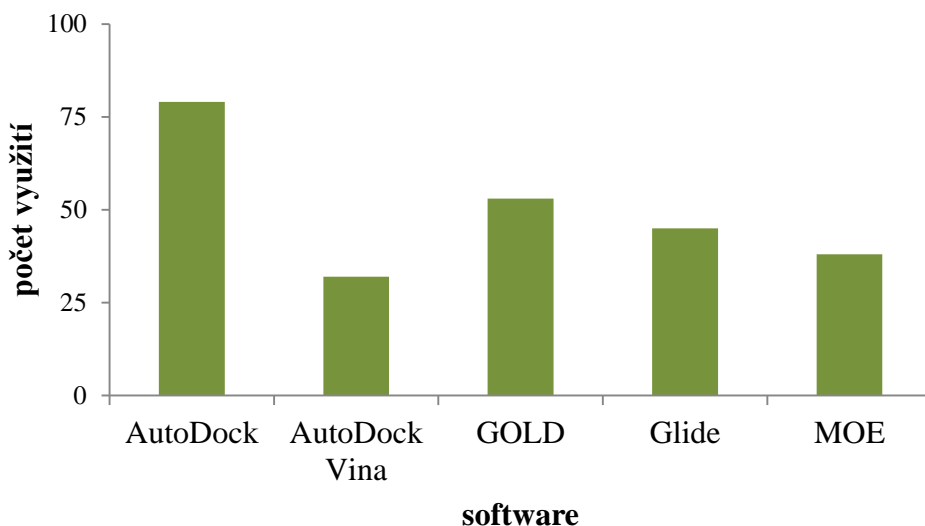
Z důvodu psaní rešerše v březnu tohoto roku nebylo vydáno velké množství článků. I přesto pět vědeckých prací použilo mnou zkoumané programy. Největší zastoupení, a to po třech pracích, mají programy Glide v různých verzích a CDOCKER v programovém balíku Discovery Studio 3.1. Větší využití tohoto programu jsem zaznamenala v roce 2013 a od té doby se neustále zvyšuje. Náš použitý software, tedy AutoDock Vina v kombinaci s metodou SMARTCyP, byl zastoupen pouze jednou.

Pokud se na část roku 2015 podíváme z pohledu receptorů, nelze jednoznačně určit, na který se vědci zaměřili nejvíce. Je zde zmíněn CYP3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1 a další. Nešlo vždy pouze o lidské cytochromy, ale jsou zde i zástupci proteobakterií a hub⁶⁰.

Překvapením byl článek studující konkurenční kooperativitu a substrátovou inhibici u epoxidace carbamazepinu.⁶¹ Tuto sloučeninu jsem v ostatních pracích objevila už pouze jednou v tomto článku.⁶²

Tato krátká rešerše se zabývala aplikací dokovacích programů v letech 2011- 2015. Úplně nejvíce se využívaly programy AutoDock a GOLD, které jsou všeobecně známy jako jedny z nejkvalitnějších, což se potvrdilo. Verze softwaru byly vždy co nejvíce aktuální v dané době psaní článku, či prezentování na konferencích.

V kontextu se zaměřením na spojení dokování s racionálním návrhem léčiv nebyla většina prací na toto téma, až na výjimky, spojena s výpočetními metodami QSAR a návrhem farmakoforů.



Graf 3: Celkové zastoupení použití jednotlivých programů v období 2011-2015

4.2 Výsledky dokování

Výstupem mého experimentu, ve kterém jsem uplatnila molekulární dokování za pomoci softwaru Auto Dock Vina, jsou hodnoty vazebných energií zaznamenané v tabulkách 1 a 2. Z důvodu predikce co nejpravděpodobnějšího chování jsou za výsledky brány pózy s natočením ligandu v aktivním místě vybraném dle metody SMARTCyp.

Tabulka 1: Výsledky dokování do antechamberu a následně do aktivního místa

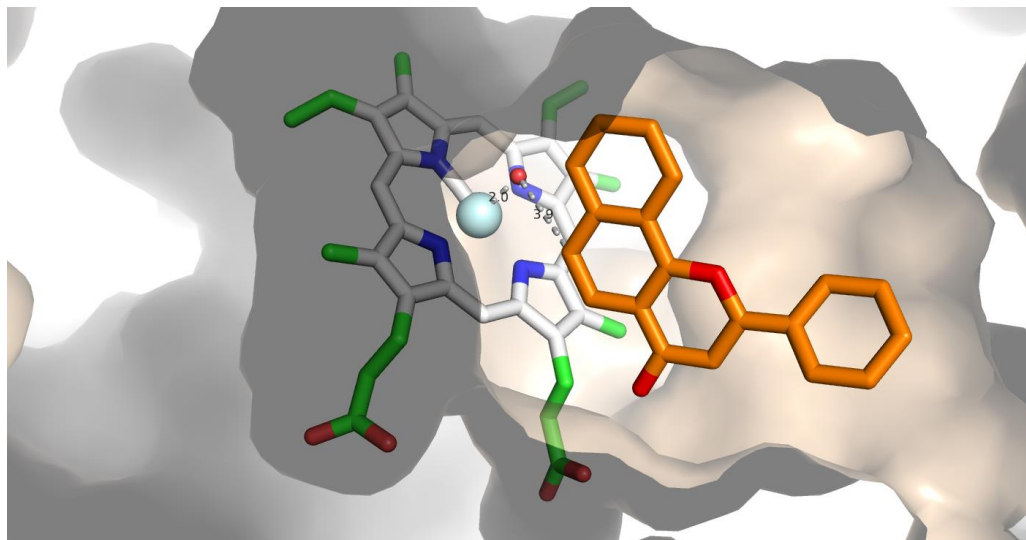
1. ligand antechamber	E [kcal/mol]	2. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]
ANF	-10,6	ANF	3	-8
		TST	5	-8,2
TST	-8,8	ANF	1	12,6
		TST	1	12,9
CBZ	-9,2	CBZ	2	-10,3
		PGS	6	-1,4
PGS	-9,8	CBZ	1	3,8
		PGS	1	19

Tabulka 2: Výsledky dokování do aktivního místa a následně do antechamberu

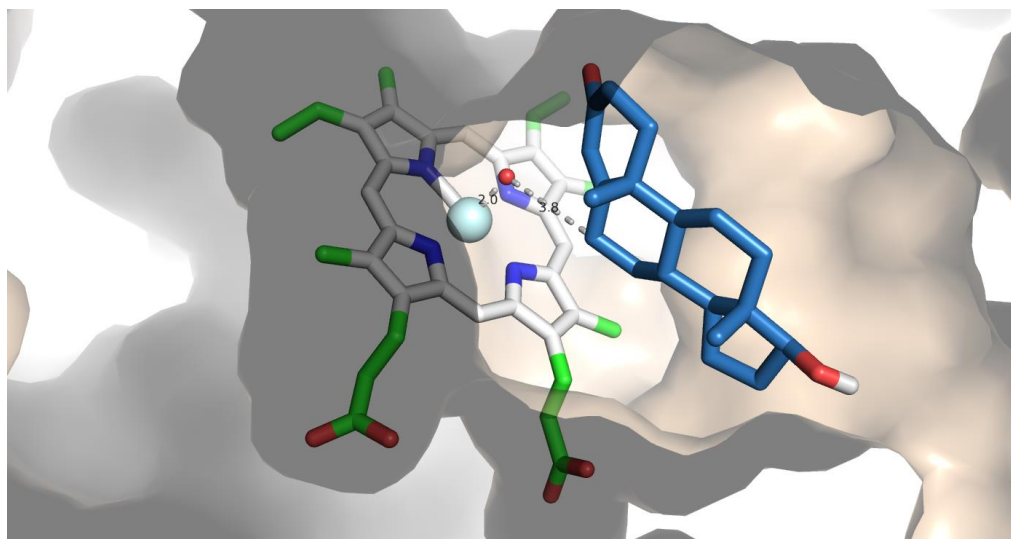
1. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]	2. ligand antechamber	E [kcal/mol]
ANF	2	-9	ANF	-8,1
			TST	-6,1
TST	3	-9	ANF	-7,9
			TST	-6,6
CBZ	5	-8,5	CBZ	-11,1
			PGS	-9
PGS	2	-9,1	CBZ	-6
			PGS	-6,3

4.2.1 ANF a TST

Při dokování do aktivního místa se podařilo identifikovat pomocí SMARTCyp produktivní vazebné pózy, které odpovídají predikci místa metabolismu (obrázek 17 pro ANF a obrázek 18 pro TST). Je zajímavé, že obě produktivní vazebné pózy mají stejnou vazebnou energii -9 kcal/mol.

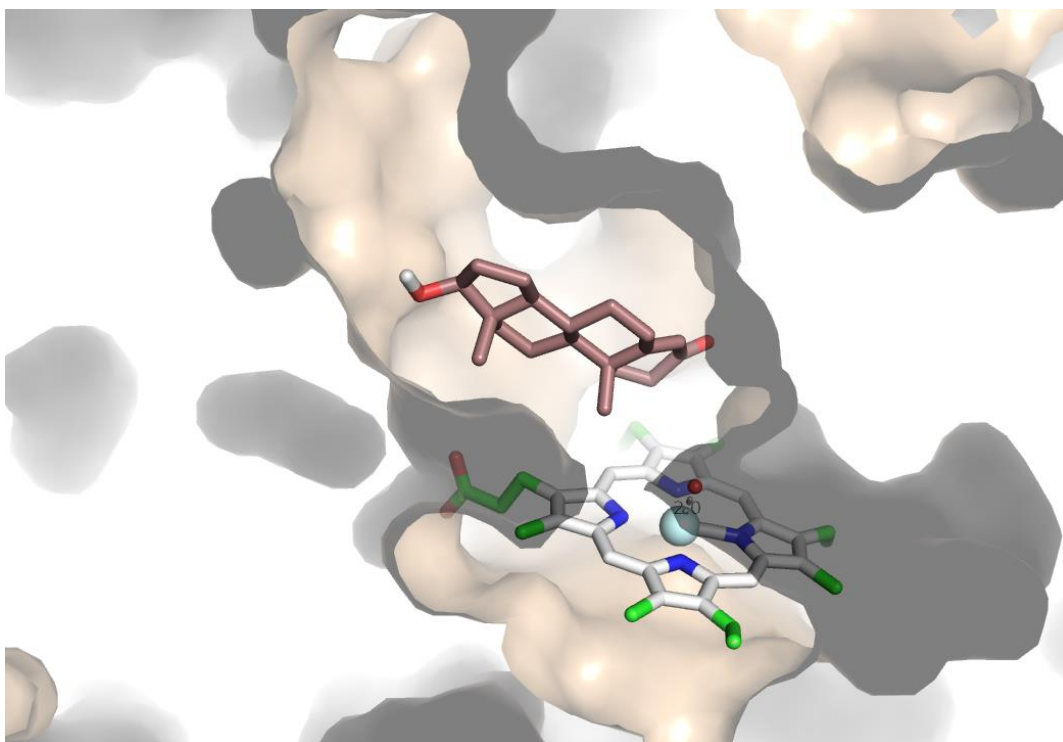


Obrázek 17: Navázání ANF do aktivního místa cytochromu P450



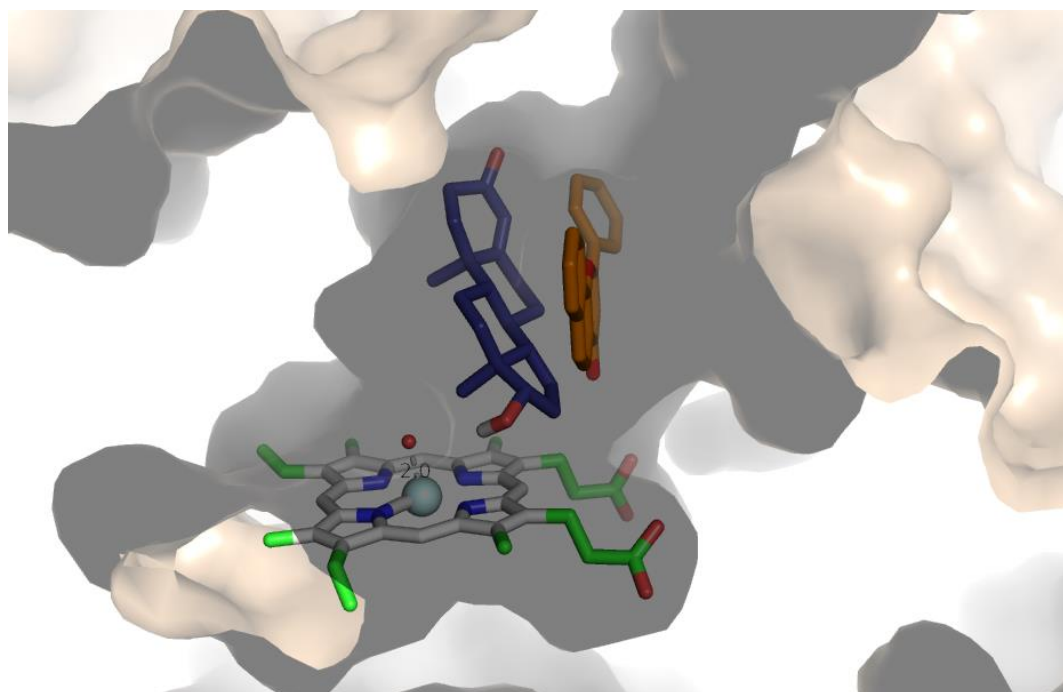
Obrázek 18: Navázání TST do aktivního místa cytochromu P450

TST navázaný do antechamberu (Obrázek 19), tedy do větší vzdálenosti od aktivního místa, je schopen kvůli své velikosti zablokovat možnost metabolismu ostatních zkoumaných látek, jejichž následné vazebné energie jsou posléze kladné.



Obrázek 19: Navázání TST do antechamberu způsobující zablokování aktivního místa

Dokování ANF do antechamberu neovlivňuje navázání ostatních látek a všechny se tam vážou s poměrně vysokou vazebnou energií. Příklad je vidět na obrázku 20.

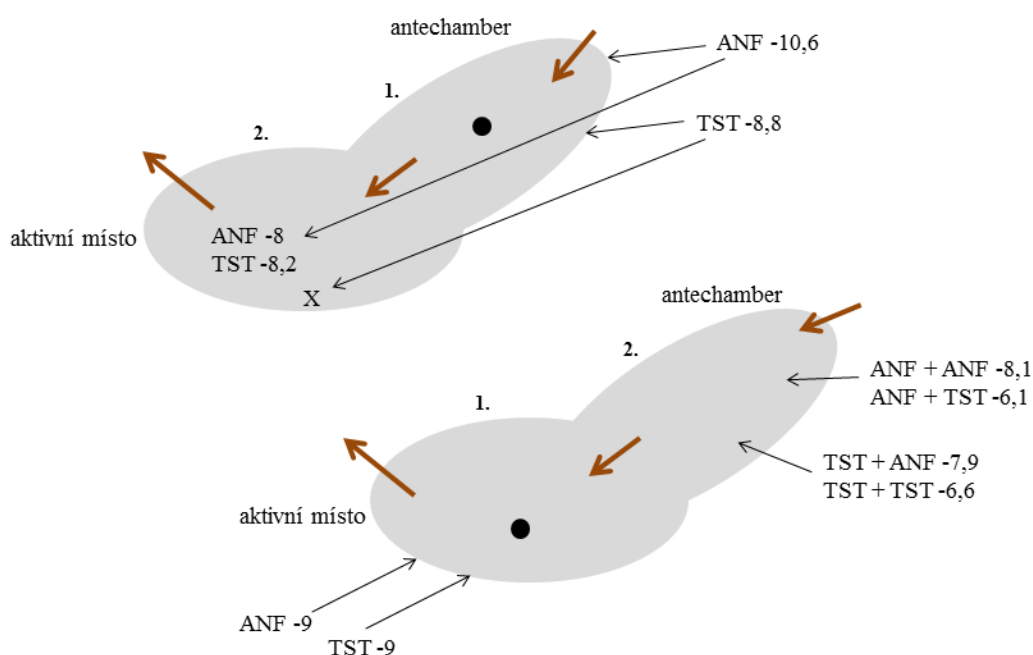


Obrázek 20: Navázání ANF do antechamberu a TST do aktivního místa

Jak ANF, tak TST se při vazbě do antechamberu vážou poměrně silně (-10,6 a -8,8 kcal/mol), přičemž z kinetické analýzy vyplývá, že navázání prvního ligandu do CYP 3A4 neindukuje urychlení reakce, nicméně u TST takto navázaný ligand vede k tvorbě produktu, jak ukazuje spinový posun.³³ Tomu může odpovídat fakt, že po navázání TST do antechamberu se již do aktivního místa nevejde další ligand, takže jej případný další ligand rovnou vytlačí do aktivního místa (a tím do reakce), zatímco se sám zachytí v antechamberu.

Jak již bylo řečeno, ANF i TST se vážou do aktivního místa se stejnou energií -9 kcal/mol. Po navázání ANF nebo TST k aktivnímu místu bude vazba dalších látek vždy probíhat s nižší vazebnou energií, přičemž ANF se bude do antechamberu vázat o něco silněji než TST. Tomu odpovídá i experimentální zjištění, že vazba ANF na CYP3A4 bude přibližně o řád silnější než u TST, silnější vazba je naopak vykoupena asi o řád pomalejší oxidací a tvorbou produktu než u TST. Po metabolizaci substrátu v aktivním místě a jeho uvolnění pak mohou látky z antechamberu přecházet do aktivního místa se stejnou vazebnou energií.

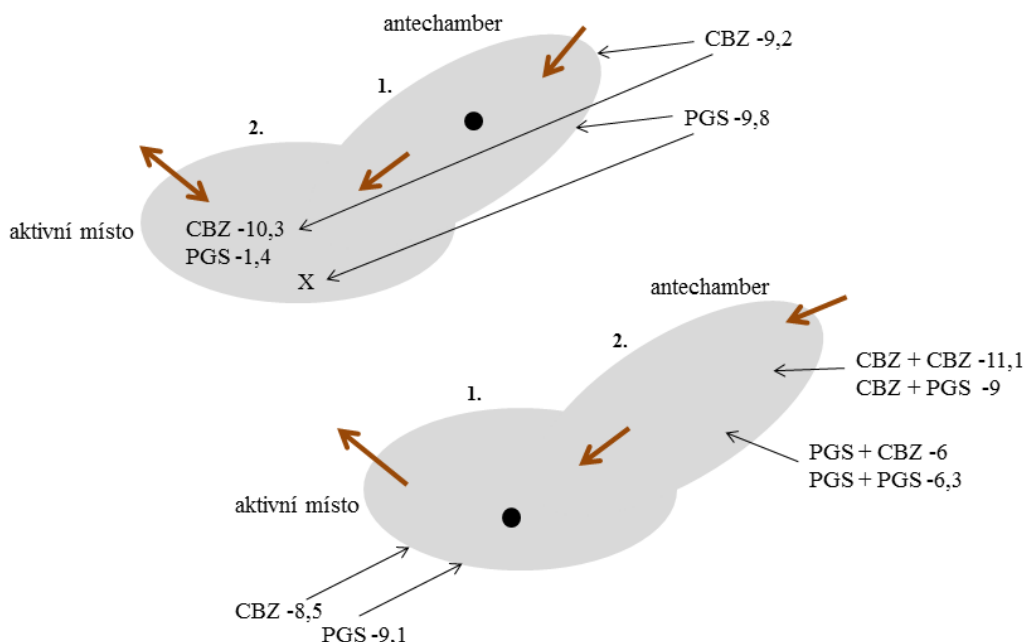
Vzhledem k tomu, že vazba ANF i TST v zásadě neovlivňuje rozdíly pro afinitu obou molekul k aktivnímu místu (rozdíl -8.2 a -8 kcal/mol u ANF je zanedbatelný), tak navázání molekuly do antechamberu upřednostní metabolismus jak ANF, tak i TST, a dojde tak k homotropické kooperativitě, kdy se oba substráty vzájemně podpoří.



Obrázek 21: Schéma možného mechanismu lékové interakce mezi ANF a TST

4.2.2 CBZ a PGS

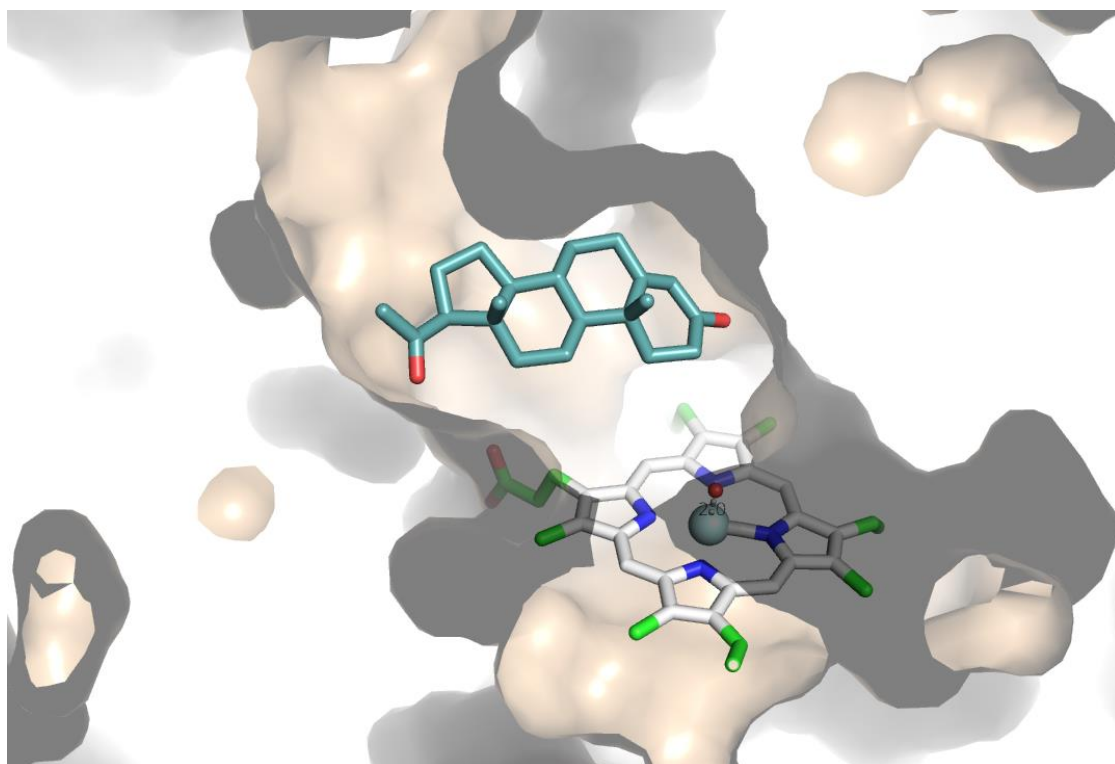
Už při pohledu na rozdílné hodnoty vazebné energie v aktivním místě pro CBZ a PGS lze předpokládat složitější obraz než v předchozím případě (schéma na obrázku 22).



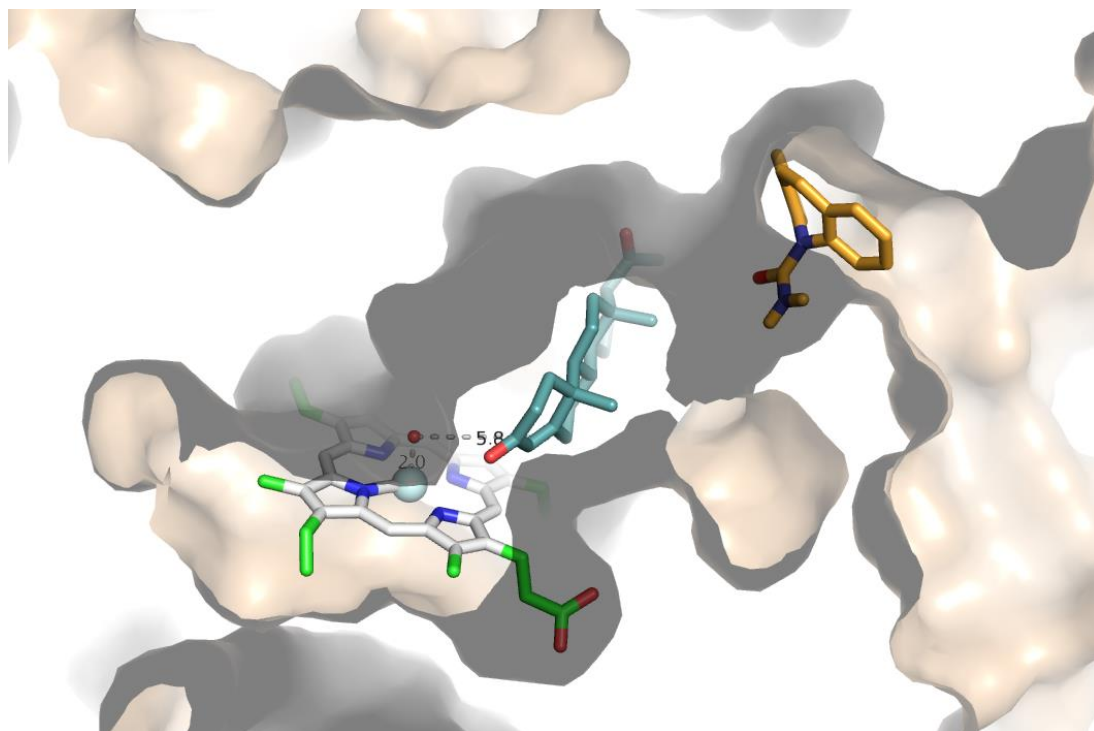
Obrázek 22: Schéma možného mechanismu lékové interakce mezi CBZ a PGS

Obě sloučeniny se do antechamberu silně vážou s podobnou hodnotou energií (-9,2 kcal/mol a -9,8 kcal/mol). Přítomnost CBZ v antechamberu však způsobí výrazně lepší uchycení další molekuly CBZ do aktivního místa ve srovnání s PGS. Dochází tedy k situaci, kdy CBZ je schopen se vázat do antechamberu i do aktivního místa, a tak katalyzovat svou biotransformaci. Ovšem v případě zvýšené koncentrace PGS, který se naváže do antechamberu a zablokuje vstup k aktivnímu místu pro další ligand (obrázek 23). Dojde tedy k posunutí PGS do aktivního místa a další ligand se následně zachytí v antechamberu (obrázek 24), což má podobný efekt jako v případě TST v předchozím případě.

Ani rozdíl vazebných energií obou látek do aktivního místa není velký. CBZ v aktivním místě zlepšuje nejen vazbu CBZ do antechamberu, ale i PGS. Může tedy začít reakce a následné odbourávání CBZ a vznikající produkt má přibližně 10x větší koncentraci než produkt PGS za stejný čas.³⁵ Ovšem navázání PGS do antechamberu a posunutí do aktivního místa toto odbourání ještě více podpoří, i přesto, že produkce produktů PGS bude menší, protože vazba CBZ do CYP3A4 je dominantnější. Tento mechanismus se opakuje a velmi záleží na koncentraci substrátů, ovšem mezikrok s reakcí PGS snižuje nutnou koncentraci CBZ k dosažení maximální rychlosti tvorby produktu CBZ.³⁵



Obrázek 23 : Navázání PGS do antechamberu



Obrázek 24: Vzájemná poloha při navázání PGS a CBZ, při které CBZ posouvá PGS do reakce v aktivním místě

4.2.3 Predikce možných lékových interakcí

Vzhledem k tomu, že nám dokování pomohlo vysvětlit mechanismus kooperativity u předchozích případů, dále jsme se věnovali aplikaci molekulárního dokování k predikci efektů lékových interakcí. U dalšího zpracování výsledků jsem se zaměřovala primárně na dvě různé spekulativní scénária (viz Tabulka 3):

4.2.3.1 Interakce s hormony

PGS a TST jsou hormony přirozeně se vyskytující v našem těle a, jak již bylo zmíněno, při navázání do aktivního místa i antechamberu zablokují přístup jiné sloučenině. Otázkou ovšem může být, zda je účinek těchto hormonů vzájemně zaměnitelný. To znamená, zda by náhrada PGS za TST u ANF, anebo naopak TST za PGS u CBZ vedla k odlišnému chování.

Sloučeniny ANF a PGS se do aktivního místa vážou se stejnou energií jako TST. Rozdílem ale je, že PGS se více než TST bude vázat do antechamberu. Zřejmě se tak bude rozdíel v afinitě mezi ANF a PGS vůči CYP3A4 na rozdíl od TST smazávat.

V případě sloučenin CBZ a TST můžeme označit energie vazby do aktivního místa opět za podobné. Ovšem CBZ přítomnost TST ať už v aktivním místě, nebo v antechamberu v porovnání s PGS výrazně zlepšuje a heterotropická kooperace se tak bude nejspíš ztrácet.

Můžeme tedy říci, že tyto dva hormony jsou z pohledu ANF a CBZ a interakcí s nimi pravděpodobně, co se týče typu interakce zaměnitelné, ale zřejmě by se změnila koncentrace, při kterých by docházelo k alosterické kooperaci.

4.2.3.2 Léková interakce na modelu ANF s CBZ

Další interakce by mohla být způsobena sloučeninami ANF a CBZ využívanými jako analgetické látky a látky proti křečím. Není příliš pravděpodobné, že by tedy byly podány najednou, ale jako možný model pro predikci lékové interakce by mohly posloužit.

Sloučenina ANF se jak do aktivního místa, tak i do antechamberu váže s trochu větší energií než CBZ, můžeme tedy předpokládat, že, i přes větší velikost, se ANF bude vázat do CYP3A4 primárně. Pokud by se však i přesto navázal do aktivního místa CBZ, do antechamberu by se ANF vázal s energií -12,3 kcal/mol, což můžeme považovat za velmi silné v porovnání všech hodnot, které máme k dispozici. Za takové přítomnosti ANF v antechamberu by docházelo k lepšímu odbourávání CBZ.

Byly by tedy nejspíš potlačeny sedativní a spasmolytické účinky ANF a naopak by byly podpořeny účinky CBZ proti křečím a výkyvům nálad.

Tabulka 3: Výsledky dokování do P450 pro další kombinace sloučenin

ANF + PGS

1. ligand antechamber	E [kcal/mol]	2. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]
ANF	-10,6	ANF	3	-8
		PGS	4	-6,8
PGS	-9,8	ANF	1	7,8
		PGS	1	19

1. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]	2. ligand antechamber	E [kcal/mol]
ANF	2	-9	ANF	-8,1
			PGS	-6,1
PGS	2	-9,1	ANF	-8
			PGS	-6,3

CBZ + TST

1. ligand antechamber	E [kcal/mol]	2. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]
CBZ	-9,2	CBZ	2	-10,3
		TST	1	-7
TST	-8,8	CBZ	1	9,7
		TST	1	12,9

1. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]	2. ligand antechamber	E [kcal/mol]
CBZ	5	-8,5	CBZ	-11,1
			TST	-10,2
TST	3	-9	CBZ	-6
			TST	-6,6

ANF + CBZ

1. ligand antechamber	E [kcal/mol]	2. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]
ANF	-10,6	CBZ	6	-9,7
		ANF	3	-8
CBZ	-9,2	ANF	4	-4
		CBZ	2	-10,3

1. ligand aktivní místo	póza	E [kcal/mol]	2. ligand antechamber	E [kcal/mol]
ANF	2	-9	ANF	-8,1
			CBZ	-6
CBZ	5	-8,5	ANF	-12,3
			CBZ	-11,1

5 ZÁVĚR

Molekulární mechanismy lékových interakcí jsou v současné době velmi zajímavé téma, protože stále stoupá množství podávaných léčiv a jiných léčivých přípravků. Podle typů rozlišujeme lékové interakce způsobené farmakokinetikou nebo farmakodynamikou. Metabolismus léčiv, za který je zodpovědný cytochrom P450, patří do farmakokinetiky. Účinek léku lze užitím s jinou látkou, ať už léčivem nebo přijatou potravou, snížit nebo zvýšit. Obě možnosti však mohou vést k fatálním následkům.

Nejprve jsme se zaměřili na zjištění, které typy molekulárního dokování se v této oblasti používají, a posléze jsme jedním z těchto programů – AutoDock Vina – prováděli dokování dvojic látek do aktivního místa a oblasti tzv. antechamberu, abychom se pokusili vysvětlit molekulární mechanismus experimentálně zjištěné kooperativity.

Podle získaných závěrů mohu konstatovat, že jsem potvrdila homotropickou kooperativitu v případě dvojice ANF a TST a heterotropickou aktivitu CBZ a PGS. ANF s TST neprojevovaly podle experimentálních ani získaných dat žádné vzájemné ovlivnění při odbourávání a biotransformaci a do aktivního místa se vázaly s přibližně stejnou energií. Naopak PGS může v případě metabolismu CBZ tento proces výrazně urychlit, protože podporuje navázání dalších molekul CBZ.

Metodika molekulárního dokování tedy může být prostředkem ke zjištění dalších lékových interakcí ještě předtím, než budou léky uvedeny na trh. Často se možné vedlejší účinky spojené s lékovými interakcemi zjistí až v průběhu užívání, což je velmi pozdě a vede to až ke stahování léčiv a tedy velkým tržním ztrátám. Bohužel nevýhodou dokování je nutnost porovnání s experimentálními daty, protože se stále jedná o teoretickou metodu, která není vždy spolehlivá.

Dalším krokem v pokračování tohoto výzkumu by bylo zjištění dalších látek vykazujících vzájemné lékové interakce již ve fázích klinického testování před uvedením na trh nebo také přesné zjištění mechanismu interakcí a vlivů, které na ně působí a nejsou ještě tolik známé. V tomto studiu se prolínají poznatky z biochemie, lékařské chemie, farmakologie, fyzikální chemie a dalších oborů, které je třeba alespoň částečně obsáhnout.

Osobně si myslím, že věnovat se této problematice má velký význam, raději nová věta Když si představím zmírnění vedlejších účinků na minimum a zároveň nesnižování účinku léků, které nám mohou například zachraňovat život každý den, tak se mi to teď zdá jako sen. Proč se ovšem nezačít o tuto problematiku ještě více zajímat a nepříčinit se, aby se sen stal skutečností?

6 SUMMARY

Molecular mechanisms of drug-drug interactions are important and hot topic, as the usage of drugs and therapeutic substances gradually increases. We can distinguish drug-drug interactions caused by either pharmacokinetic or pharmacodynamic effects. The metabolism of drugs, caused by the P450 cytochrome, falls into the pharmacokinetic category. The effect of the drug can be increased or decreased when taken with another substance, a different drug or a substance received from food.

Firstly, we have focused on the selection of molecular docking programs that are used in this field of study. AutoDock Vina program was selected and utilized for the docking of pairs of drugs into the active site and the antechamber areas, in order to explain the molecular mechanism of the experimentally established cooperativity.

Based on the results it can be said, that the homotropic cooperativity, in the case of the ANF and TST pair, and the heterotropic cooperativity, in the case of CBZ and PGS, were both confirmed and explained by means of binding energy differences in both pairs. In accordance with the experimental and acquired data, the ANF and TST did not show any mutual influence on each other's biotransformation, in addition to using approximately the same binding energy to the active site. On the other hand, PGS can accelerate the metabolism of CBZ as it supports the binding of additional CBZ molecules.

The molecular docking can be therefore used to suggestion of possible drug-drug interactions before the drugs are released on the market. As such (and after further testing against larger datasets) molecular docking can help to prevent the possible side effects in future before they would be detected during the use of the drug, which is far too late and can lead to the removal of the drug from the market and the inevitable financial losses. Unfortunately one of the main disadvantages of docking is the necessity of the comparison of the results with experimental data, as it is a theoretical method, which is not always reliable.

Another step to continue this research would be the determination of other substances showing drug-drug interaction during the clinical testing stage, before introduction of the drugs on the market, or the exact determination of the mechanism of interactions and effects, which influence the drugs and are as of yet not well known. This field study connects findings from the fields of biochemistry, medical chemistry, pharmacology, physical chemistry and others.

I personally think that this problematic is of great importance, as the thought of decreasing side effects to a minimum while not reducing the effect of the drug, which could and does save lives every day, seems like a dream to me. Of course what stops me from focusing more on this problematic and make the dream come true?

7 SEZNAM LITERATURY

1. Perlík, F. *Základy klinické farmakologie*. (Galén, 2008).
2. Merle, L., Laroche, M. L., Dantoine, T. & Charmes, J. P. Predicting and preventing adverse drug reactions in the very old. *Drugs and Aging* **22**, 375–392 (2005).
3. Tatsuno SY, T. E. 73(3):76-79. Does Ethnicity Play a Role in the Dosing of Warfarin in Hawai'i? *Hawai'i J. Med. Public Heal.* 76–79 (2014).
4. Keprtová, L. *Základy chemie léčivých látek 1*. 9–20 (Univerzita Palackého v Olomouci, 2013).
5. Berka, K., Paloncýová, M., Anzenbacher, P. & Otyepka, M. Behavior of human cytochromes p450 on lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 11556–64 (2013).
6. Bailey, D. G. & Dresser, G. K. Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **4**, 281–297 (2004).
7. Liu, Z., Mortimer, O., Smith, C. a, Wolf, C. R. & Rane, a. Evidence for a role of cytochrome P450 2D6 and 3A4 in ethylmorphine metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **39**, 77–80 (1995).
8. Perlík, F. *Základy farmakologie*. (Galén, 2011).
9. Paloncýová, M., Berka, K. & Otyepka, M. Molecular insight into affinities of drugs and their metabolites to lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2403–2410 (2013).
10. Claude, A. The constitution of protoplasm. *Science* **97**, 451–456 (1943).
11. Palade, G. E. Liver microsomes: an integrated morphological and biochemical study. *The Journal of Cell Biology* **2**, 171–200 (1956).
12. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **75**, 376–386 (1958).
13. Omura, T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 690–698 (1999).
14. Coon, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 1–25 (2005).
15. Furge, L. L. & Guengerich, F. P. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **34**, 66–74 (2006).

16. Kirchmair, J. *Drug metabolism prediction*. (Wiley- VCH, 2014).
17. Williams, J. A. *et al.* Drug-Drug Interactions for Udp-Glucuronosyltransferase Substrates: a Pharmacokinetic Explanation for Typically Observed Low Exposure (Auci/Auc) Ratios. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1201–1208 (2004).
18. Murray, R. K. *Harperova biochemie, 2. vydání*. 871 (Jinočany : H&H, 2002).
19. Bukowski, M. R. *et al.* A thiolate-ligated nonheme oxoiron(IV) complex relevant to cytochrome P450. *Science* **310**, 1000–1002 (2005).
20. Mestres, J. Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **58**, 596–609 (2005).
21. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. & Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. List.* **93**, 229–237 (1999).
22. Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology, Fifth Edition*. 103–178 (Informa healthcare, 2008).
23. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* **105**, 2253–2277 (2005).
24. Smith, H. *The Molecular Biology of Plant Cells*. 319 (University of California Press, 1978). at
<<http://publishing.cdlib.org/ucpressebooks/view?docId=ft796nb4n2;brand=eschol>>
25. Guengerich, F. P., Kim, B., Gillam, E. & Shimada, T. Mechanisms of enhancement and inhibition of cytochrome P450 catalytic activity. in *8th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 97–101 (John Libbey Eurotext, 1994).
26. Sligar, S. G. & Denisov, I. G. Understanding cooperativity in human P450 mediated drug-drug interactions. *Drug Metab. Rev.* **39**, 567–579 (2007).
27. Bindslev, N. *Drug-Acceptor Interactions*. (2008). doi:10.3402/bindslev.2008.19
28. Nelson, D. R. *et al.* The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA and Cell Biology* **12**, 1–51 (1993).
29. Walsh, A. a., Szklarz, G. D. & Scott, E. E. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J. Biol. Chem.* **288**, 12932–12943 (2013).
30. Scott, E. E. & Halpert, J. R. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 5–7 (2005).

31. Yano, J. K. *et al.* The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 38091–38094 (2004).
32. Lewis, D. F. V. *Guide to Cytochrome P450: Structure and Function*. (Taylor & Francis, 2001).
33. Frank, D. J., Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Analysis of heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4 using alpha-naphthoflavone and testosterone. *J. Biol. Chem.* **286**, 5540–5 (2011).
34. Ballard, C. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* **377**, 1019–1031 (2011).
35. Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Baylon, J. L., Tajkhorshid, E. & Sligar, S. G. Mechanism of Drug-Drug Interactions Mediated by Human Cytochrome P450 CYP3A4 Monomer. *Biochemistry* (2015). doi:10.1021/acs.biochem.5b00079
36. Berka, K. & Bazgier, V. *Racionální návrh léčiv pomocí in silico drug designu*. 71–73 (Univerzita Palackého v Olomouci, 2015).
37. Morris, G. M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
38. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina. *J. Comput. Chem.* **31**, 445–461 (2010).
39. Williams, P. A. *et al.* Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **305**, 683–6 (2004).
40. Lenselink, E. B., Beuming, T., Sherman, W., Van Vlijmen, H. W. T. & Ijzerman, A. P. Selecting an optimal number of binding site waters to improve virtual screening enrichments against the adenosine A2A receptor. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1737–1746 (2014).
41. Groves, J. T. The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3569–3574 (2003).
42. Yamazaki, H. *Fifty years of cytochrome P450 Research*. (Springer Japan, 2014). doi:10.1007/978-4-431-54992-5
43. ChemAxon. MarvinSketch. (2014). at <<http://www.chemaxon.com>>
44. Skopalík, J., Anzenbacher, P. & Otyepka, M. Flexibility of human cytochromes P450: Molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences. *J. Phys. Chem. B* **112**, 8165–8173 (2008).
45. Poulos, T. L. Cytochrome P450 flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13121–13122 (2003).

46. Cojocaru, V., Winn, P. J. & Wade, R. C. The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 390–401 (2007).
47. Rydberg, P., Gloriam, D. E., Zaretski, J., Breneman, C. & Olsen, L. SMARTCyp: A 2D method for prediction of cytochrome P450-mediated drug metabolism. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 96–100 (2010).
48. Sugiyama, M. *et al.* Sorafenib and sunitinib, two anticancer drugs, inhibit CYP3A4-mediated and activate CYP3A5-mediated midazolam 1'-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 757–762 (2011).
49. Rahnasto, M. K. *et al.* Identification of novel CYP2A6 inhibitors by virtual screening. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 7186–7193 (2011).
50. Mo, S.-L. *et al.* Pharmacophore, QSAR, and Binding Mode Studies of Substrates of Human Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Using Molecular Docking and Virtual Mutations and an Application to Chinese Herbal Medicine Screening. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 1640–1704 (2012).
51. Liu, R., Liu, J., Tawa, G. & Wallqvist, A. 2D SMARTCyp reactivity-based site of metabolism prediction for major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1698–1712 (2012).
52. Huang, T. W., Zaretski, J., Bergeron, C., Bennett, K. P. & Breneman, C. M. DR-Predictor: Incorporating flexible docking with specialized electronic reactivity and machine learning techniques to predict CYP-mediated sites of metabolism. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 3352–3366 (2013).
53. Therapeutics, E. Short Communication 1-Aminobenzotriazole Coincubated with (S)-Warfarin Results in Potent Inactivation of CYP2C9. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 5–9 (2014).
54. Mannu, J., Jenardhanan, P. & Mathur, P. P. Computational analysis of CYP3A4-mediated metabolism to investigate drug interactions between anti-TB and anti-HIV drugs in HIV/TB co-infection. *Med. Chem. Res.* **23**, 905–917 (2014).
55. Inui, H., Itoh, T., Yamamoto, K., Ikushiro, S.-I. & Sakaki, T. Mammalian Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Coplanar Polychlorinated Biphenyls. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 14044–14057 (2014).
56. Hayes, C., Ansbro, D. & Kontoyianni, M. Elucidating substrate promiscuity in the human cytochrome 3A4. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 857–869 (2014).
57. Morrison, A. M. S. *et al.* Identification, modeling and ligand affinity of early deuterostome CYP51s, and functional characterization of recombinant zebrafish sterol 14 α -demethylase. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 1825–1836 (2014).

58. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Saraputit, S. & Rongnoparut, P. Structure–function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitol. Res.* **113**, 3381–3392 (2014).
59. Luo, H. *et al.* DDI-CPI, a server that predicts drug-drug interactions through implementing the chemical-protein interactome. *Nucleic Acids Res.* **42**, 46–52 (2014).
60. Khatri, Y. *et al.* A natural heme-signature variant of CYP267A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56 executes diverse ω -hydroxylation. *FEBS J.* **282**, 74–88 (2015).
61. Müller, C. S. *et al.* Concurrent Cooperativity and Substrate Inhibition in the Epoxidation of Carbamazepine by Cytochrome P450 3A4 Active Site Mutants Inspired by Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry* **54**, 711–721 (2015).
62. Yuki, H., Honma, T., Hata, M. & Hoshino, T. Prediction of sites of metabolism in a substrate molecule, instanced by carbamazepine oxidation by CYP3A4. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 775–783 (2012).

8 SEZNAM ZKRATEK

ANF	A-naphtoflavon
CBZ	Carbamazepin
CYP450	Cytochrom P450
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
K_m	Michaelisova konstanta
NADH	Nikotinamidadeninukleotid v redukované formě
NADPH	Nikotinamidadeninukleotid fosfát v redukované formě
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PDB	Protein Data Bank file- textový formát zastupující strukturu a osahující značku atomu, pozici v prostoru a další informace
PDB ID	Protein Data Bank Identification- čtyřmístný kód pro strukturu proteinu, který je ke stažení z databáze Protein Data Bank
PDBQT	Textový formát PDB rozšířený o informace o parciálním náboji a atomární typ
PGS	progesteron
QSAR	Quantitative structure–activity relationship- model sloužící k predikování chování molekul
TST	Testosteron
WHO	World Health Organization- Světová zdravotnická organizace

9 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

Obrázek 1: Příklad označení CYP

Obrázek 2: Struktura cytochromu P450 3A4 s anotovanými sekundárními prvky (PDB ID: 1W0E)

Obrázek 3: Reakční cyklus cytochromu P450. (převzato z: ²³)

Obrázek 4: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu pro alosterické enzymy (vlevo) a enzymy řídící se kinetikou Michaelise a Mentenové (převzato z: ²⁴)

Obrázek 5: Heterotropické modifikace aktivity chorismát mutasy (převzato z: ²⁷)

Obrázek 6: CYP 3A4 (PDB ID: 1W0E) se zvýrazněnou vazebnou kavitou, upraveno v programu PyMOL

Obrázek 7: Struktury látek použitých ke studiu lékové interakce v cytochromech P450

Obrázek 8: Vznik produktů ve směsi ANF a TST (převzato z: ³³)

Obrázek 9: Fungování metabolismu v případě směsi CBZ a PGS

Obrázek 10: Tvorba komplexu při navázání ligandu do cytochromu P450

Obrázek 11: Konfigurační soubor pro dokování CBZ do aktivního místa cytochromu s navázaným progesteronem

Obrázek 12: Výpočetní proces dokování

Obrázek 13: Aminokyseliny okolo aktivního místa s hemem (vytvořeno v programu Maestro od Schrödinger)

Obrázek 14: Umístění antechamberu a aktivního místa v kavitě cytochromu P450 3A4

Obrázek 15: Aminokyseliny okolo ligandu navázaného v antechamberu (vytvořeno v programu Maestro od Schrödinger)

Obrázek 16: Výsledek metody SMARTCyp pro carbamazepin

Obrázek 17: Navázání ANF do aktivního místa cytochromu P450

Obrázek 18: Navázání TST do aktivního místa cytochromu P450

Obrázek 19: Navázání TST do antechamberu způsobující zablokování aktivního místa

Obrázek 20: Navázání ANF do antechamberu a TST do aktivního místa

Obrázek 21: Schéma možného mechanismu lékové interakce mezi ANF a TST

Obrázek 22: Schéma možného mechanismu lékové interakce mezi CBZ a PGS

Obrázek 23 : Navázání PGS do antechamberu

Obrázek 24: Vzájemná poloha při navázání PGS a CBZ, při které CBZ posouvá PGS do reakce v aktivním místě

Graf 1: Zastoupení jednotlivých izoform CYP podle počtu metabolizovaných látek ¹⁶

Graf 2: Zastoupení hlavních izoform CYP v metabolismu léčiv¹⁷

Graf 3: Celkové zastoupení použití jednotlivých programů v období 2011-2015

Tabulka 1: Výsledky dokování do antechamberu a následně do aktivního místa

Tabulka 2: Výsledky dokování do aktivního místa a následně do antechamberu

Tabulka 3: Výsledky dokování do P450 pro další kombinace sloučenin