

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Interakce jaterního mikrosomálního systému cytochromů
P450 s potenciálními léčivy – syntetickými deriváty
cytokininů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Autor: | Bc. Petr Kraus |
| Studijní program: | N1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Alena Špičáková |
| Termín odevzdání práce: | 2019 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Petr Kraus |
| Název práce | Interakce jaterního mikrosomálního systému cytochromů P450 s potenciálními léčivy – syntetickými deriváty cytokininů |
| Typ práce | Diplomová práce |
| Pracoviště | Ústav farmakologie Lékařské fakulty UP |
| Vedoucí práce | Mgr. Alena Špičáková |
| Rok obhajoby práce | 2019 |
| Abstrakt | <p>Cytochromy P450 (CYP) jsou majoritními enzymy v I. fázi metabolismu xenobiotik. Tyto hemoproteinové enzymy primárně přeměňují svou širokou škálu substrátů na polárnější produkty, které jsou snáze exkretovány z organismu. Při zablokování aktivity těchto enzymů se mohou vyskytnout nežádoucí účinky způsobené akumulací nezmětanizovaných léčiv. Z toho důvodu je studium enzymové aktivity CYP s různými substráty nezbytné pro rozvoj kvalitnější terapie, prevenci rakoviny a mnoha dalších chorob. V experimentální části práce byly testovány sloučeniny, které měly podobný strukturní motiv jako látka olomoucín (2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin). Olomoucín patří mezi inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi), jež se využívají v onkologii. Jeho strukturním analogem je např. (R)-roscovitín (selicilib), nově testovaný lék na karcinom plic, leukémii či HIV. Studované látky BPA-302, BP-21 a BP-117 tedy představují potenciální léčiva, z tohoto důvodu je nutné znát jejich farmakokinetiku. Inhibiční vliv studovaných látek <i>in vitro</i> byl studován na vybrané enzymy CYP. Aktivita byla nejvíce ovlivněna u CYP2C19 při nejvyšší koncentraci látek 250 $\mu\text{mol/l}$, v případě BPA-302 klesla</p> |

na 22 %, u BP-21 na 13 % a u BP-117 na 6 % původní hodnoty. Z výsledků lze usuzovat, že při podávání nižších dávek by nemělo dojít k signifikantnímu ovlivnění metabolismu současně podávaných léčiv. Dále bylo při identifikaci potenciálních metabolitů BPA-302 zjištěno, že tato látka podléhá biotransformaci CYP jen v malé míře. Pro podrobnější poznatky o metabolismu BPA-302 je zapotřebí provést další studie.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Cytochromy P450, inhibice, HPLC, inhibitor cyklin-dependentních kináz |
| Počet stran | 64 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Bc. Petr Kraus |
| Title of thesis | Interaction of liver microsomal system of cytochromes P450 with potential drugs – synthetic cytokinin derivatives |
| Type of thesis | Master thesis |
| Department | Department of Pharmacology, Faculty of medicine and dentistry |
| Supervisor | Mgr. Alena Špičáková |
| The year of presentation | 2019 |
| Abstract | <p>Cytochromes P450 (CYPs) are major enzymes of phase I metabolism of xenobiotics. These hemoprotein enzymes primarily convert their wide range of substrates to more polar products which are easier excreted from the body. Blocking the activity of these enzymes can cause side effects due to accumulation of non-metabolised drugs. Therefore, the study of CYP enzyme activity with various substrates is essential for the development of better therapy, cancer prevention etc. In the experimental part, compounds with similar structural motif as olomoucine (2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurine) were tested. Olomoucine belongs to cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi), which are used in oncology. Its structural analogue is e.g. (R)-roscovitine (seliciclib), a newly tested drug for lung cancer, leukemia or HIV. Thus, the studied compounds BPA-302, BP-21 and BP-117 represent potential drugs, and their pharmacokinetics need to be known. The <i>in vitro</i> inhibition effect of the compounds was</p> |

studied on selected CYP enzymes. The most affected enzyme was CYP2C19. Its activity dropped to 22 % of its original value by BPA-302, to 13 % by BP-21 and to 6 % by BP-117 at the highest concentration (250 $\mu\text{mol/l}$). The results suggest that the metabolism of concomitantly administered drugs should not be significantly affected at lower doses. Furthermore, it has been found that BPA-302 has a low biotransformation potential of CYPs. Further studies are needed to provide further insights into BPA-302 metabolism.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | Cytochrome P450, inhibition, HPLC, cyclin-dependent kinase inhibitor |
| Number of pages | 64 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně
za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Petr Kraus

Tímto bych velice rád poděkoval své školitelce Mgr. Aleně Špičákové za odborné a cenné rady, trpělivé vedení při práci v laboratoři i následném sepisování této práce.

Současně děkuji prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. a dále Mgr. Zuzaně Rácové, PhD. za jejich čas a ochotu konzultovat experimenty, výsledky a jiné připomínky.

Také bych rád poděkoval celému kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty UP za vstřícnost a příjemné pracovní prostředí. Mé poděkování dále patří Mgr. Jitce Široké, PhD. za provedení měření MS analýz a Mgr. Tomáši Guckému, PhD. za poskytnutí zkoumaných látek.

Nakonec bych rád poděkoval své manželce Karolíně a rodině za podporu a trpělivost, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk..... | 10 |
| Úvod a cíle práce..... | 12 |
| 1 Biotransformace xenobiotik..... | 14 |
| 2 Cytochromy P450 | 16 |
| 2.1 Klasifikace a nomenklatura CYP | 16 |
| 2.2 Struktura a lokalizace CYP | 17 |
| 2.3 Reakční mechanismus CYP | 18 |
| 2.4 Lidský CYP | 19 |
| 2.4.1 Rodina CYP1 | 21 |
| 2.4.2 Rodina CYP2 | 22 |
| 2.4.3 Rodina CYP3 | 25 |
| 3 Inhibitory cyklin-dependentních kináz | 27 |
| 3.1 Cyklin-dependentní kinázy..... | 27 |
| 3.2 Léčiva na bázi inhibitorů cyklin-dependentních kináz..... | 28 |
| 4 Materiály a metody | 33 |
| 4.1 Chemikálie..... | 33 |
| 4.2 Testované látky..... | 33 |
| 4.3 Enzymy..... | 34 |
| 4.3.1 Lidské jaterní mikrosomy | 34 |
| 4.3.2 Baktosomy (rekombinantní enzymy)..... | 35 |
| 4.4 Přístrojové vybavení | 35 |
| 4.4.1 HPLC | 35 |
| 4.4.2 Hmotnostní spektrometr..... | 35 |
| 4.4.3 Další přístroje | 36 |
| 4.5 Metody..... | 36 |
| 4.5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných enzymů CYP v lidských jaterních mikrosomech/baktosomech..... | 36 |
| 4.5.2 Identifikace potenciálních metabolitů BPA-302 metodou hmotnostní spektrometrie..... | 46 |
| 5 Výsledky | 48 |
| 5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných enzymů CYP v lidských jaterních mikrosomech/baktosomech | 48 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.2 | Identifikace potenciálních metabolitů BPA-302 metodou hmotnostní spektrometrie..... | 53 |
| 6 | Diskuze..... | 56 |
| 7 | Závěr | 59 |
| 8 | Seznam literatury | 60 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|------------------|---|
| ADH | Alkoholdehydrogenáza |
| ALDH | Aldehyddehydrogenáza |
| AhR | Arylový uhlovodíkový receptor |
| CDK | Cyklin-dependentní kináza |
| CDKi | Inhibitor cyklin-dependentních kináz |
| COMT | Katechol <i>O</i> -methyltransferáza |
| CYP, P450 | Cytochrom P450 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPD | Dihydropyrimidin dehydrogenáza |
| ER ⁺ | Pozitivní estrogenový receptor |
| ESI ⁺ | Ionizace elektrosprejem, pozitivní mód |
| GIT | Gastrointestinální trakt |
| GST | Glutathion- <i>S</i> -transferáza |
| HER2 | Receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru |
| HMT | Histamin- <i>N</i> -methyltransferáza |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| M _r | Relativní molekulová hmotnost |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| m/z | Poměr hmotnosti iontu a jeho náboje |
| NAD(P)H | Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid či redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát |
| NAT | <i>N</i> -acetyltransferáza |
| NQO1 | NADPH:chinon oxidoreduktáza |
| NSAID | Nesteroidní protizánětlivá léčiva |
| PAH | Polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PPI | Inhibitory protonové pumpy |
| Rb | Retinoblastomový protein |
| RT | Retenční čas |
| SPE | Extrakce na pevné fázi |
| ST | Sulfotransferázy |

TPMT

Thiopurin methyltransferáza

UGT

Uridin-5'-difosfo-glukuronosyltransferáza

Úvod a cíle práce

Cytochromy P450 (CYP, P450) hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik. Jedná se o hemoproteinové enzymy, jejichž hlavním účinkem je přeměna substrátů na polárnější produkty, které mohou být snáze vyloučeny z těla. Problém může nastat při zablokování aktivity těchto enzymů, díky čemuž dochází k jejich akumulaci a s tou spojených nežádoucích účinků. Studium enzymové aktivity CYP s různými substráty může významně napomoci k rozvoji lepší terapie, prevence rakoviny a dalších chorob.

Testované látky nesly podobný strukturní motiv jako látka olomoucín (2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin), který je prokázaným inhibítozem cyklin-dependentních kináz (CDKi) a který našel uplatnění v onkologii. Další látkou s analogickou strukturou je selicilib, jež je nově testovaný lék na karcinom plic, leukémii či HIV. Studované látky s označením BPA-302, BP-21 a BP-117 se tedy stávají potenciálními léčivými a z tohoto důvodu je nezbytné studovat jejich potenciální interakce s enzymy metabolismu léčiv, zejména s CYP.

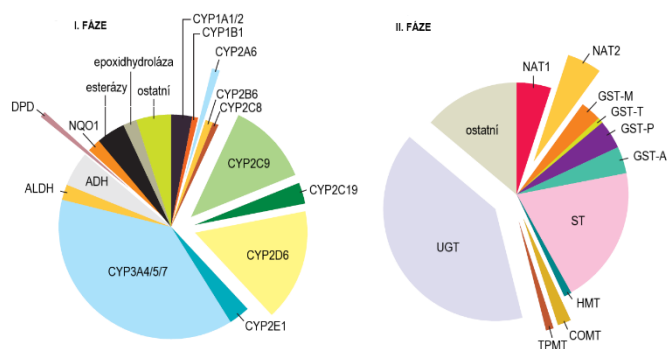
Cílem teoretické části práce je rešerše literatury na cytochrom P450 a purinové deriváty s inhibičním účinkem na CDK (olomoucín II, selicilib atd.). Praktická část je zaměřena na stanovení vlivu potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 na enzymovou aktivitu lidských jaterních mikrosomálních cytochromů P450 pomocí specifických substrátů metodou HPLC a dále na detekci potenciálních metabolitů látky BPA-302 pomocí hmotnostní spektrometrie.

Teoretická část

1 Biotransformace xenobiotik

Znalost metabolismu cizorodých látek (xenobiotik), majoritně léků, je významným aspektem při určení jejich farmakokinetických vlastností, které jsou definovány procesy, jako je absorpce, následná distribuce, metabolismus a konečně exkrece. Hlavním principem metabolismu léků je biologická přeměna více hydrofobní molekuly na její více polární metabolit, který je snadněji exkretován. Ne všechny léky jsou však do organismu podávány ve své aktivní podobě. Řeč je o tzv. „pro-drugs“, které je nutné enzymaticky přeměnit do své aktivní formy (např. lovastatin - hypolipidemikum, jež je metabolicky aktivováno karboxylesterázami) (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2012).

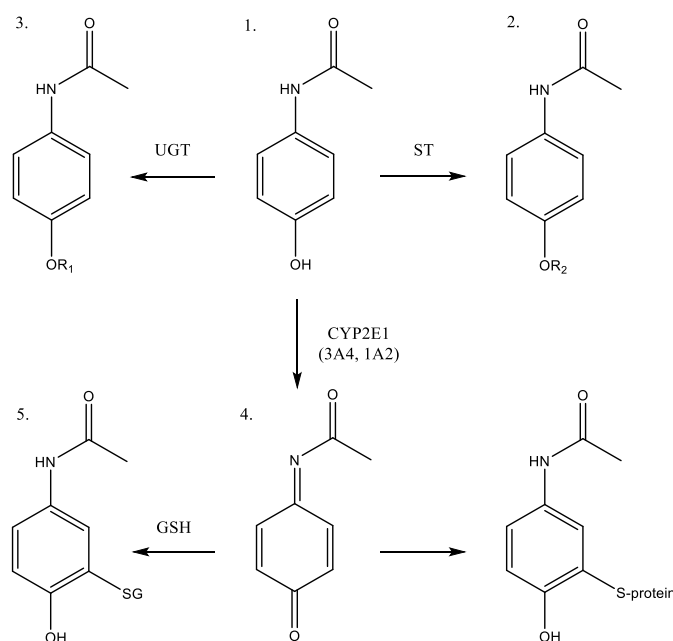
Biotransformační reakce jsou tradičně rozdělovány do hlavních dvou skupin. První skupinu, tzv. reakce I. fáze, tvoří děje katalyzované enzymy, které vykonávají oxidační, redukční a hydrolyzační reakce. Druhá skupina zahrnuje konjugační reakce a souhrnně jsou označovány jako reakce II. fáze. Reakce I. fáze jsou běžně vykonávány enzymy (Obrázek 1, vlevo), jakými jsou např. cytochromy P450 (CYP nebo jen P450), flavinové monooxygenázy, aldehydoxidázy, karboxylesterázy, epoxidhydrólázy, alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy (ADH, resp. ALDH), ketoreduktázy a další (Foti a Dalvie, 2016).



Obrázek 1: Schématické zastoupení jednotlivých enzymů při biotransformaci xenobiotik rozdělených podle typu metabolismu na reakce I. fáze (vlevo) a II. fáze (vpravo). ADH – alkoholdehydrogenáza, ALDH – aldehyddehydrogenáza, COMT – katechol-*O*-methyltransferáza, CYP – cytochrom P450, DPD – dihydropyrimidin dehydrogenáza, GST – glutathion-*S*-transferázy, HMT – histamin-methyltransferáza, NAT1/2 – *N*-acetyltransferázy, NQO1 – NADPH:chinon-oxidoreduktáza, ST - sulfotransferázy, TPMT – thiopurin methyltransferáza. UGT - UDP-glukuronosyltransferázy (podle Evans a Relling, 1999).

Enzymy zodpovědné za reakce II. fáze (Obrázek 1, vpravo) jsou UDP-glukuronosyltransferázy, sulfotransferázy, *N*-acetyltransferázy, glutathion-*S*-transferázy, methyltransferázy, a acyl-CoA syntetázy (Foti a Dalvie, 2016).

Ve většině případů po reakcích I. fáze následují konjugací reakce II. fáze, avšak bylo zjištěno, že ne vždy reakce I. fáze předchází II. fázi, příkladem může být metabolická dráha paracetamolu (Obrázek 2), která primárně podléhá sulfataci (25-35 %) nebo glukuronidaci (50-70 %), tedy reakcím II. fáze. Minoritní I. fáze probíhá buď oxidací pomocí CYP (2E1, 3A4, 1A2), nebo peroxidací cyklooxygenázou, v obou případech vznikají toxické produkty. K detoxikaci dochází konjugací s glutathionem. Pokud ho v těle není dostatek, mohou se tyto nebezpečné molekuly vázat na renální nebo hepatální proteiny. (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2012, McGill a Jaeschke, 2013).



Obrázek 2: Metabolismus paracetamolu. 1. - paracetamol (acetaminofen), 2. - sulfatace paracetamolu, 3. - glukuronidace paracetamolu, 4. - *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, 5. - konjugace glutathionu. R₁ - kyselina glukuronová, R₂ - sulfo-skupina, UGT – UDP-glukuronosyltransferáza, ST – sulfotransferáza, GSH – glutathion (podle McGill a Jaeschke, 2013).

2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou jednou z nejstarších a největších genových superrodin kódujících hemoproteinové monooxygenázy v prokaryotických i eukaryotických organismech. Tyto enzymy jsou významné při oxidativním metabolismu s širokou škálou exogenních i endogenních substrátů. Jejich objev se datuje roku 1958, kdy byly objeveny M. Klingenbergem v potkaních jaterních mikrosomech. Od té doby bylo nalezeno více než 18500 molekul P450. Své uplatnění našly například ve farmaceutickém průmyslu, zemědělství či biotechnologiích (Degtyarenko a Archakov, 1993; Nelson, 2013).

Některé mikroorganismy využívají cytochrom P450 k hydroxylaci organických látek, které následně uplatňují jako zdroj energie. Příkladem takového organismu může být bakterie *Pseudomonas putida*, jejíž cytochrom P450 101, označovaný také jako P450cam (z anglického „camphor“ neboli kafr), využívá jako substrát právě kafr. Se vznikem mnohobuněčných organismů došlo k rozvoji dalších funkcí těchto enzymů. V případě rostlin je důležité zmínit podíl CYP na syntéze řady významných látek od rostlinných barviv, alkaloidů (např. morfinů) a fytotoxinů až po některé rostlinné hormony (gibereliny) či další důležité molekuly – například fenyylpropanoidy, základní strukturní prekurzory ligninu (Bolwell *et al.*, 1994; Hiruma *et al.*, 2013).

Označení „P450“ nesouvisí nikterak s jejich funkcí, ale odkazuje na spektrální vlastnosti jeho hemu typu b, jehož redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým má absorpční maximum při 450 nm, písmeno „P“ pochází ze slova pigment (Omura a Sato, 1964).

S rozvojem řady funkcí těchto enzymů došlo zároveň ke vzniku komplexnějšího systému CYP s kooperujícím enzymem cytochrom P450 reduktázou (NADPH-P450 reduktáza), kterým oplývají všechny vyšší organismy. Nejznámější činností však pro CYP představuje proces detoxikace xenobiotik (Stiborová *et al.*, 1999).

2.1 Klasifikace a nomenklatura CYP

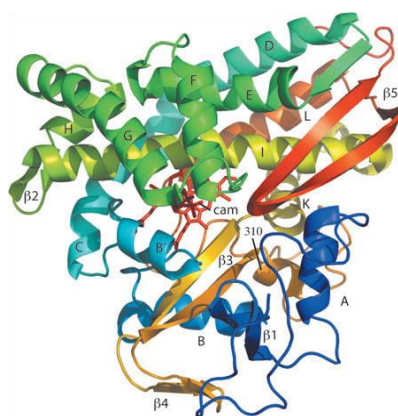
CYP proteiny jsou uspořádány do genetických rodin a podrodin na základě míry homologie jejich aminokyselinové sekvence. Enzymy, které mají společnou sekvenci ze 40 % a více, náleží do příslušné rodiny označené arabskou číslicí. Pokud se jejich sekvence shodují minimálně z 55 %, řadí se do společné podrodiny značící

se písmenem (např. CYP1A). Pro označení konkrétního enzymu se za písmeno uvádí další číslice (CYP1A2 atd.) (Nebert a Russell, 2002).

2.2 Struktura a lokalizace CYP

Cytochromy P450 patří mezi hemoproteinové enzymy, jejichž aktivní místo obsahuje barvivo hem typu b, jako tomu je např. u hemoglobinu a myoglobinu. Porfyrinový kruh hemu obsahuje nekovalentně vázaný centrální atom železa v trojmocném stavu (Fe^{3+}). Při redukci atomu železa na Fe^{2+} může docházet k charakteristickému navázání ligandů, jakými jsou např. O_2 nebo CO. Terciární struktura proteinové části je zpravidla tvořena 12 α -helixy (značené A-L) a 4 β -skládanými listy, přičemž některé CYP mohou obsahovat další helixy (Guengerich, 2012; Vanduchová, 2017).

Krystalová struktura CYP byla poprvé popsána u již zmíněného P450cam (CYP101) z půdní bakterie *P. putida* (Obrázek 3). Tento enzym má strukturu podobnou trojúhelníkovému hranolu, přičemž sekundární strukturní znaky jsou obvykle charakterizovány podle jejich umístění vzhledem k porfyrinovému makrocyklu hemu. Hemové železo je axiálně připojeno thiolátovým aniontem (S^-) cysteinu, který určuje proximální stranu hemu. Aktivní místo enzymu se pak nachází na protější (distální) straně hemu. Rozšíření P450cam jako strukturního paradigmatu na všechny CYP se ukázalo jako obtížné, a to kvůli omezené sekvenční podobnosti, která je většinou 10-30 % (Hasemann *et al.*, 1995; Pochapsky *et al.*, 2010).



Obrázek 3: Krystalová struktura P450cam. N-konec je zobrazen modře, C-konec červeně, písmena A-L označují jednotlivé α -helixy, β -struktury jsou označeny písmenem β a číslem. Cam znamená kafr (podle Pochapsky *et al.*, 2010).

Cytochromy P450 se u prokaryot vyskytují volně v cytoplazmě, zatímco u eukaryotních organismů jsou umístěny v membráně endoplazmatického retikula a na vnitřní membráně mitochondrií. Při studiu metabolismu xenobiotik *in vitro* se často využívají homogenizovaná endoplazmatická retikula známá jako mikrosomy (přibližně 0,3 μm velké membránové váčky). Mitochondriální varianty CYP jsou významné z hlediska biosyntézy endogenních látek (cholesterol, steroidní hormony atd.), zatímco jejich mikrosomální frakce má uplatnění v metabolismu xenobiotik. U většiny eukaryotických P450 slouží hydrofobní N-konec proteinové části enzymu jako membránová kotva. Dále se uvádí, že na N-konci existují částice pro rozpoznání signálu k snazšímu průchodu membránou. Vzhledem k tomu, že CYP a NADPH-P450 reductáza se vyskytují v membráně, dochází zde k jejich zvýšené interakci (Pavek a Dvořák, 2008; Guengerich, 2012; Hasemann *et al.*, 1995; Vanduchová, 2017).

2.3 Reakční mechanismus CYP

Reakce těchto hemoproteinových enzymů jsou velice různorodé a mají významný podíl na biotransformaci léků, biokonverzi xenobiotik, bioaktivaci chemických karcinogenů, biosyntézu životně důležitých látek, jako jsou například mastné kyseliny, vitamíny rozpustné v tucích či hormony. Dále se také účastní přeměny alkanů, terpenů, aromatických sloučenin a v neposlední řadě degradace herbicidů a insekticidů. Principem těchto monooxygenázových reakcí (Schéma 1) je přenos jednoho atomu kyslíku (z molekuly kyslíku O₂) na uhlík, dusík či síru molekuly substrátu za vzniku příslušného produktu a vody (Hannemann *et al.*, 2006).

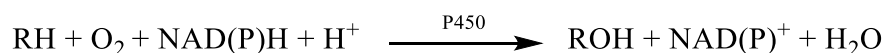
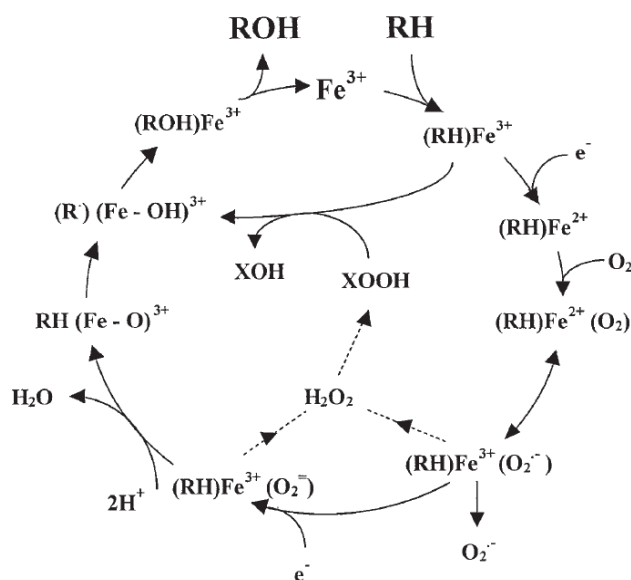


Schéma 1: Oxidační reakce substrátu zprostředkovaná cytochromem P450.
 R = C, N, S. NAD(P)H = redukovaný nikotinamidadenindinukleotid nebo nikotinamidadenindinukleotid fosfát (podle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2012).

Přestože jsou substráty cytochromů P450 převážně hydrofobní či málo hydrofilní povahy, účastní se jejich metabolismu také sloučeniny jako alkoholy, fenoly a mnoho dalších organických látek. Katalytický mechanismus CYP je složitý proces (Obrázek 4), po navázání substrátu (RH) na oxidovanou formu železa

se cyklu účastní i další enzym - NADPH-P450 reduktáza. Ta pracuje na principu přenosu elektronu z NADPH na koenzym FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid) a následně do CYP, kde redukuje hemové Fe^{3+} na Fe^{2+} . V ten okamžik je umožněno k navázání O_2 a vzniku komplexu s aktivovaným kyslíkem. Následně je do komplexu dodán druhý elektron. Další kroky nebyly kvůli jejich složitosti zcela prostudovány, avšak je známo, že dochází k protonaci redukovaného komplexu, což způsobí hydrolyzu vazby mezi atomy kyslíku a uvolnění vody. Závěrem je uvolnění hydroxylované formy substrátu (ROH), jakožto hlavního produktu a navrácení enzymu do původního stavu (Denisov *et al.*, 2005; Guengerich, 2012).

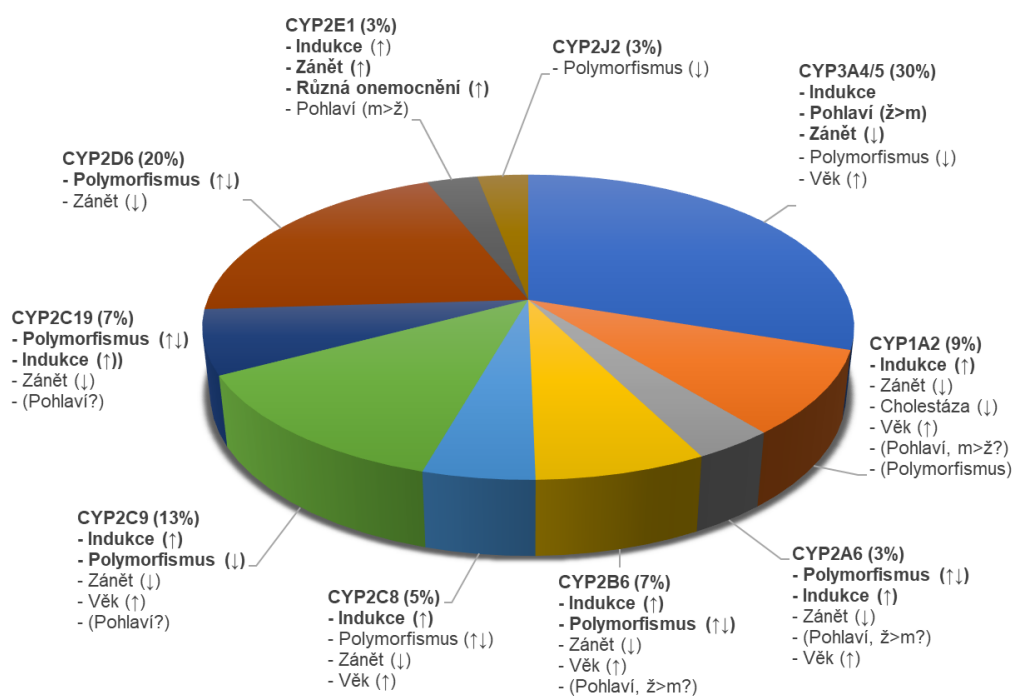


Obrázek 4: Schéma mechanismu katalytického cyklu cytochromu P450. Principem je oxygenace substrátu a regenerace P450. RH – substrát, ROH – hydroxylovaný substrát, Fe^{3+} - oxidovaná forma hemového železa, Fe^{2+} - redukované hemové železo (podle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

2.4 Lidský CYP

V současnosti je u člověka známo 57 funkčních genů P450, které jsou rozděleny na základě jejich sekvenční podobnosti do 18 rodin a 44 podrodin. Přibližně deset těchto enzymů náležících do rodiny CYP1, CYP2 nebo CYP3 zodpovídá za metabolismus většiny léků a dalších xenobiotik. I přes obrovskou specifitu substrátů těchto enzymů, je většina léků metabolizována jedním nebo jen několika

CYP (Obrázek 5) při klinicky významných koncentracích. Zatímco monogenní polymorfismus je zodpovědný za variabilitu několika málo enzymů (např. CYP2D6), většina CYP je ovlivňována mnoha faktory včetně dalších polymorfismů v regulačních transgenech a negenetických faktorů, mezi které patří věk, pohlaví, hormonální vlivy a další (Zanger a Schwab, 2013).



Obrázek 5: Zastoupení jednotlivých forem CYP uplatňujících se při metabolismu klinicky významných léčiv včetně jejich faktorů variability. Tučně jsou vyznačeny důležité faktory, šipky určují změnu aktivity (↓ - pokles, ↑ - nárůst, ↓↑ - kombinace) (podle Zanger a Schwab, 2013).

Původně se předpokládalo, že cytochromy P450 jsou lokalizovány prakticky pouze v játrech, a jen malá část v jiných tkáních. Postupem času však bylo zjištěno, že tyto enzymy jsou přítomny v celém těle, jak lze vidět v Tabulce 1 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Tabulka 1: Přehled vybraných CYP a jejich umístění v lidském těle, včetně jejich typických substrátů a induktorů. GIT – gastrointestinální trakt, PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky (podle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

| CYP | Místo | Typický substrát | Typický induktor |
|--------|---|---|------------------------------------|
| 1A1 | příce, játra, mozek, GIT, lymfocyty, srdce | PAH | PAH, dioxiny |
| 1A2 | játra | aromatické aminy, PAH, kofein | PAH, β -naftoflavon, kouření |
| 1B1 | kůže, mozek, srdce, příce, placenta, játra, ledviny, GIT, slezina | PAH | dioxin |
| 2A6 | játra | kumarin, steroidy | barbituráty, dexamethason |
| 2B6 | játra, srdce | nikotin | barbituráty |
| 2C8 | játra, ledviny | retinoidy, taxol | ? |
| 2C9/10 | játra | tolbutamid, diklofenak | barbituráty, rifampicin |
| 2C19 | játra, srdce | (S)-mefenytol, omeprazol, diazepam | barbituráty, rifampicin |
| 2D6 | játra, mozek, srdce | antidepresiva, β -blokátory | - |
| 2E1 | játra, příce, mozek, endotel, srdce, kostní dřev | ethanol, nitrosaminy, acetaminofen | ethanol, hladovění |
| 3A4/5 | játra, GIT, ledviny, příce, endotel, placenta, lymfocyty | různé blokátory Ca kanálu, cyklosporin, acetaminofen, taxol, steroidy | steroidy, barbituráty |
| 3A7 | plod, placenta, (játra) | podobné jako 3A4 | steroidy, barbituráty |

2.4.1 Rodina CYP1

Tato rodina zahrnuje tři funkční geny ve dvou podrodinách. Vysoce konzervované geny pro CYP1A1 a CYP1A2 se skládají ze sedmi exonů a šesti intronů lokalizovaných na dlouhém raménku 15. chromozomu, zatímco gen pro CYP1B1 je složen jen ze tří exonů, a nachází se na krátkém raménku 2. chromozomu. U člověka je CYP1A2 ve vyšších hladinách exprimován pouze v játrech, oproti tomu CYP1A1 a CYP1B1 jsou primárně extrahepatální enzymy. Exprese je indukována aryl hydrokarbonovým receptorem (AhR), který je aktivován navázáním polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) nacházejících se např. v environmentálních chemikáliích, cigaretovém kouři či grilovaném jídle. Mezi endogenní ligandy AhR patří eikosanoidy a kyselina arachidonová (Nebert a Russell, 2002; Zanger a Schwab, 2013).

CYP1A1 a CYP1A2 hrají největší roli v aktivaci prokarcinogenů. Uvádí se, že tyto enzymy jsou schopny aktivovat až 90 % všech známých karcinogenů. CYP1A1 byl nalezen v plicích kuřáků, buněk karcinomu plic či karcinomu prsu. Jemu velmi

podobný enzym, CYP1A2, má širokou substrátovou specifitu (Tabulka 2). Důležité je zmínit jeho účast na přeměně aromatických aminů. Výskyt CYP1A2 v tkáních má spojitost se vznikem kolorektálního karcinomu a nádoru močového měchýře (Stiborová *et al.*, 1999).

Tabulka 2: Přehled vybraných léčiv metabolizovaných CYP1A2, jeho dalších substrátů, včetně inhibitorů a induktorů. PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky (podle Vanduchová, 2017).

| Substráty | Typické inhibitory | Typické induktory |
|--------------|--------------------|----------------------------------|
| kofein | amiodaron | karbamazepin |
| klozapin | ciprofloxacín | omeprazol |
| paracetamol | disulfiram | PAH heterocyklické sloučeniny |
| teofylin | fluvoxamin | (aminy) |
| (R)-warfarin | furafylin | |

Studie nasvědčují, že CYP1B1 má význam v biosyntéze a degradaci kyseliny retinové. Díky tomu lze vysvětlit, že mutace v tomto genu způsobuje vznik primárního kongenitálního glaukomu, který je dědičným neurodegenerativním onemocněním končícím slepotou (Nebert a Russell, 2002).

2.4.2 Rodina CYP2

Největší rodinou cytochromů P450 u savců je rodina CYP2, která obsahuje 16 genů, z nichž všechny mají 9 exonů a 8 intronů. Tyto geny jsou rozprostřeny po různých chromozomech a vytváří multigenový klastr zahrnující jednu nebo více podrodin. Většina farmakologicky významných genů CYP2 je vysoce polymorfní, obzvláště CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Společně metabolizují více než polovinu všech nejčastěji předepisovaných léků (Tabulka 3), z endogenních látek některé steroidy a kyselinu arachidonovou (Nebert a Russell, 2002; Zanger a Schwab, 2013).

Tabulka 3: Přehled vybraných substrátů, inhibitorů a induktorů některých forem enzymů rodiny CYP2 (podle Vanduchová, 2017).

| CYP | Substráty | Typické inhibitory | Typické induktory |
|-----|--|--|-----------------------------------|
| 2A6 | bilirubin kumarin nikotin | ketokonazol seligilin | fenobarbital rifampicin |
| 2C9 | diklofenak fenytoin fluvastatin ibuprofen karbamazepin losartan tolbutamid | flukonazol amiodaron fluvostatin fluvoxamin lovastatin | rifampicin barbituráty |
| 2D6 | amitriptylin fluoxetin chlorpromazin kodein lidokain paroxetin spartein tamoxifen tramadol | chinidin fluoxetin paroxetin amiodaron doxorubicin citalopram kokain methadon | steroidy |
| 2E1 | benzen ethanol halothan chloroxazon paracetamol | disulfiram | ethanol organická rozpouštědla |

CYP2A6 zaujímá v lidském organismu až 4 % z celkového množství P450. Mezi jeho substráty patří nikotin, nitrosaminy, kumarin, léky používané k léčbě AIDS (azidothymidin), dále působí jako aktivátor některých prokarcinogenů (např. butadien, aflatoxin B1). Oproti tomu CYP2B6 se v organismu vyskytuje ve velmi malém množství, účastní se však některých reakcí spojených s kancerogenezí (Stiborová *et al.*, 1999).

Podrodina lidských CYP2C zahrnuje čtyři vysoce homologní enzymy – CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Nejvíce zastoupeným členem této podrodiny je CYP2C9, jehož exprimované množství je podobné jako pro CYP3A4. Tento enzym je schopen přijímat slabě kyselé substráty, jako např. warfarin, blokátory angiotensinových receptorů (losartan), orální antidiabetika (tolbutamid) a většinu NSAID, nesteroidních protizánětlivých léčiv (Tabulka 3). Bylo zjištěno, že výskyt tří defektních alel CYP2C9 způsobuje sníženou aktivitu enzymu. Tento defekt

je významný pro metabolismus hypoglykemik (antidiabetik), u kterých snížená clearance těchto léčiv může způsobit závažnou hypoglykémii. Dále také může u pacientů léčených warfarinem vyvolat krvácení (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Zanger a Schwab, 2013).

Zřejmě nejpopulárnějším P450 je CYP2D6, kvůli jeho genetickému polymorfismu, který způsobuje výskyt tří hlavních fenotypů oxidativního metabolismu lékových substrátů a jejich enzymů. První z těchto fenotypů se označuje jako pomalý metabolizátor, jenž má defektní alelu CYP2D6. Druhým fenotypem je extenzivní metabolizátor disponující s přirozeným typem alel nebo alel, jejichž mutace nemění aktivitu CYP2D6. Posledním typem je ultrarychlý metabolizátor s multiplikovanými geny pro funkční enzymy CYP2D6. Rozsáhlé studie ukazují, že přibližně 7 % bělošské populace má defektní CYP2D6 geny, zatímco u asijské populace je frekvence defektních alel téměř poloviční. Další zajímavostí je spojitost mezi fenotypem pomalých metabolizátorů a rozvoje Parkinsonovy choroby, na druhou stranu by tento fenotyp měl mít protektivní efekt vůči rakovině močového měchýře a vývoji karcinomu plic (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Do rodiny CYP2E patří pouze jeden enzym – 2E1. Ten se účastní metabolismu ethanolu a acetonu, a jeho exprese je indukována právě těmito dvěma molekulami. Mezi jeho substráty se řadí i další malé molekuly (Tabulka 3) jako např. halogenované uhlovodíky (chloroform, tetrachlormethan, vinylchlorid atd.), jež jsou hepatotoxické, dále acetaldehyd, benzen a styren. Z léčiv podléhajících metabolismu CYP2E1 to jsou inhalační anestetika (halothan, isofluran), paracetamol a chloroxazon, který se používá jako selektivní značka ke zjištění aktivity tohoto enzymu *in vivo*. CYP2E1 se podílí na chemické aktivaci karcinogenů, prokarcinogenů a toxických látek. Jeho indukce může být vyvolána také patologickými stavy, jako jsou hladovění, obezita, alkoholové či nealkoholové onemocnění jater a diabetes mellitus. Přestože hlavním enzymem oxidujícím ethanol na acetaldehyd je alkoholdehydrogenáza, se zvýšenou koncentrací a následně chronickým užíváním alkoholu roste účast CYP2E1 na jeho metabolismu (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Zanger a Schwab, 2013).

2.4.3 Rodina CYP3

Rodina lidských CYP3 zahrnuje pouze jednu podrodinu, jež je lokalizována na dlouhém raménku chromozomu 7 a obsahuje čtyři CYP geny – 3A4, 3A5, 3A7 a 3A43. Nejvíce zastoupeným je CYP3A4, který je exprimován především v játrech a v populaci je velmi variabilní. Expres ostatních isoform (3A5, 3A7, 3A43) je oproti CYP3A4 minoritní a tvoří přibližně 15 % z celkové jaterní frakce této rodiny. Nejvíce zastoupeným CYP ve střevních enterocytech je již zmíněný CYP3A4, jež významně přispívá k efektu prvního průchodu (tzv. „first-pass effect“) u perorálně podávaných léků. U ostatních extrahepatálních tkání (Tabulka 1) je exprese CYP3A5 vyšší nebo obdobná jako u CYP3A4. CYP3A7 je mnohem více exprimován ve fetálních játrech, dále se také vyskytuje v endometriu dělohy, v obou tkáních není přesně známa jeho funkce. Stejně tak úloha jaterního CYP3A43 nebyla zcela objasněna (Nebert a Russell, 2002; Zanger a Schwab, 2013).

Enzymy podrodiny CYP3A hrají velmi významnou roli v metabolismu přibližně 30 % klinicky užívaných léčiv. Důvodem tak široké specifity, především u nejčtetnějšího CYP3A4, je velké a flexibilní aktivní místo, které je schopno přijmout a metabolizovat mnoho převážně lipofilních látek s relativně velkými strukturami. Typickými substráty takové velikosti jsou např. imunosupresiva (cyklosporin A či takrolimus) nebo makrolidová antibiotika (erytromycin). Z menších molekul je CYP3A4 schopen metabolizovat benzodiazepiny, některé statiny, antidepresiva, opioidy a mnoho dalších (Tabulka 4). Takto široké spektrum substrátů může vést k nežádoucím lékovým interakcím, které mohou nastat např. současným podáváním léku, který blokuje CYP3A4 (azolové antifungicidy), spolu s dalším lékem metabolizovaným stejným enzymem. Za těchto podmínek dochází u druhého léčiva k nárůstu jeho hladin do nebezpečných koncentrací. Druhou možností lékové interakce je současné užívání látky indukující aktivitu CYP3A4 (antiepileptika), díky níž dochází k účinnější metabolizaci druhého léku (etinylestradiol – hormonální antikoncepce), a ten nedosahuje účinných hladin (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Zanger a Schwab, 2013).

Tabulka 4: Přehled několika substrátů, inhibitorů a induktorů CYP3A4 (podle Kousalová *et al.*, 2003).

| Substrát nebo interagující látka | | Typické inhibitory | Typické induktory |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Amitryptilin | Metadon | Amiodaron | Dexametason |
| Atorvastatin | Mibefradil | Clotrimazol | Fenobarbital |
| Cisaprid | Paracetamol | Cyklosporin | Fenytoin |
| Citalopram | Progesteron | Erytromycin | Karbamazepin |
| Cyklobenzaprin | Propafenon | Flukonazol | Rifampicin |
| Dapson | Rapamycin | Grapefruitový džus | Třezalka tečkovaná |
| Diazepam | Retinová kyselina | Itrakonazol | |
| Digitoxin | Ritonavir | Midazolam | |
| 17- β -estradiol | Sildenafil | Nifedipin | |
| Ethylmorfin | Simvastatin | Omeprazol | |
| Felodipin | Tacrolimus | Testosteron | |
| Fentanyl | Tamoxifen | | |
| Ifosfamid | Teofylin | | |
| Klozapin | Triazolam | | |
| Kodein | Trimetadon | | |
| Kolchicin | Troglitazon | | |
| Kortisol | Vinblastin | | |
| Lidokain | R-Warfarin | | |
| Losartan | Zolpidem | | |
| Lovastatin | Zolpikon | | |

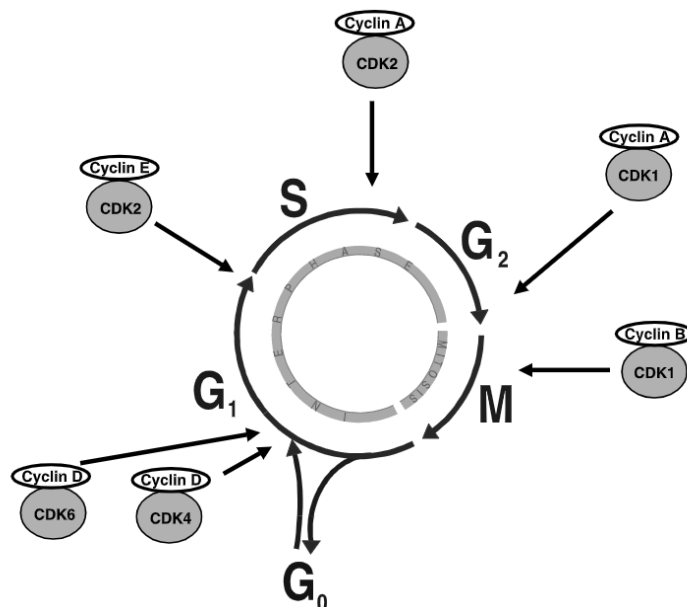
Stále podrobnější znalosti o lidském CYP umožnily rozsáhlé pokroky při vývoji nových léčiv a v samotné klinické praxi. Během objevování a vývinu nových léčiv se začaly využívat *in vitro* systémy lidských CYP v podobě mikrosomů, hepatocytů a rekombinantních CYP. Potenciální léčiva tak v kombinaci se silnými diagnostickými inhibitory CYP za specifických reakčních podmínek umožňují pečlivě analyzovat reakční pochody těchto sloučenin s jednotlivými formami P450. Dále také dochází k hlubším poznatkům lékových interakcí, stejně jako k logičtějším řešením problémů spojených s vedlejšími účinky léčiv v závislosti na povědomí individualitě pacienta (typ metabolizátora atd.). Těmito aspekty se částečně naplňuje koncept o perzonalizované medicíně, která bude v budoucnu tvořit stále větší část v léčbě rakoviny a život ohrožujících onemocnění (Guengerich, 2012).

3 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

3.1 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou nezbytné regulátory buněčného cyklu a apoptózy. Během buněčného cyklu dochází k jejich aktivaci cykliny a fosforylaci cílových molekul, např. transkripčních regulátorů, které následně indukují expresi fázově specifických genů, stimulují replikaci DNA, či zahajují mitózu (Gucký *et al.*, 2013).

Rodina lidských CDK zahrnuje 20 členů. Z nich jsou hlavními regulátory buněčného cyklu CDK1, 2, 4 a 6 (Obrázek 6), zatímco ostatní se účastní dalších na ně navazujících procesů, jako je regulace transkripce (CDK7, 8, 9, 11, 12), sestřih genů („splicing“, CDK12), oprava DNA (CDK2, 9, 12), migrace a angiogeneze (CDK5) či spermatogeneze (CDK16). Většina CDK je schopna pojmout více substrátů a často se účastní zcela odlišných procesů, jako např. CDK7 se podílí na aktivaci CDK a zároveň RNA polymerázy II, dále CDK5 řídí neuronové funkce a buněčnou migraci. Nicméně přesné biologické funkce některých CDK a cyklinů dosud nebyly přesvědčivě popsány (Jorda *et al.*, 2018).



Obrázek 6: Fáze buněčného cyklu včetně míst, kde je aktivně regulován komplex CDK/cyklin. CDK – cyklin-dependentní kináza (podle Vermeulen *et al.*, 2003).

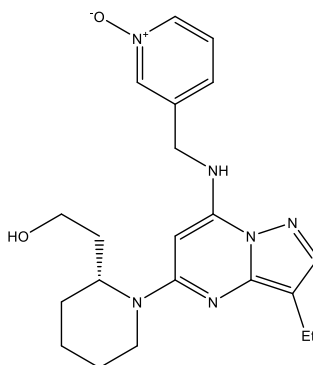
Bylo zjištěno, že u většiny typů rakovinných buněk dochází k narušení kontrolních funkcí CDK. Příkladem může být hepatocelulární karcinom, jež často vykazuje zvýšenou regulaci CDK skrz inaktivaci proteinových CDK inhibitorů (CDKi, např. p16, p21, p27, p57) a zvýšením hladiny cyklinů. V mnoha případech dochází k odchylce v regulaci u CDK1 a 2. Druhá zmíněná kináza spouští vstup do S-fáze buněčného cyklu navázáním cyklinu E a dále napomáhá jejímu průběhu, díky interakci s cyklinem A. Aktivita komplexů CDK1/cyklin A je stěžejní pro zahájení profáze během přechodu z G₂ do M-fáze, zatímco komplexy CDK1/cyklin B se účastní mitózy a dokončují ji. Dále se uvádí, že ve 39 % hepatocelulárních karcinomů dochází k nadměrné expresi („overexpresi“) cyklinu A, stejně tak u nich hojně dochází k overexpresi cyklinu B (Haider *et al.*, 2013).

Další významnou poruchu v kontrole buněčného cyklu lze nalézt u nejčastějšího maligního onemocnění u žen, rakoviny prsu, jež vykazuje dysregulaci v přechodu G₁/S-fáze. Ta je za normálních okolností negativně řízena retinoblastomovým proteinem (Rb), jehož kontrolní funkce je vypnuta fosforylací způsobenou komplexem CDK4/cyklin D1. V případě rakoviny prsu je častý výskyt overexprese nebo amplifikace cyklinu D1. Může zde také docházet ke změnám v endogenním CDK inhibitoru p16 (jako v případě výše zmíněného hepatocelulárního karcinomu). Tímto způsobem je vyvoláno narušení interakce CDK4/cyklin D1/Rb, která vykazuje specifickou závislost na znacích, jež mohou souviset s rakovinou prsu typu pozitivního estrogenového receptoru (ER⁺) (Mayer, 2015; Ramos-Esquivel *et al.*, 2017).

3.2 Léčiva na bázi inhibitorů cyklin-dependentních kináz

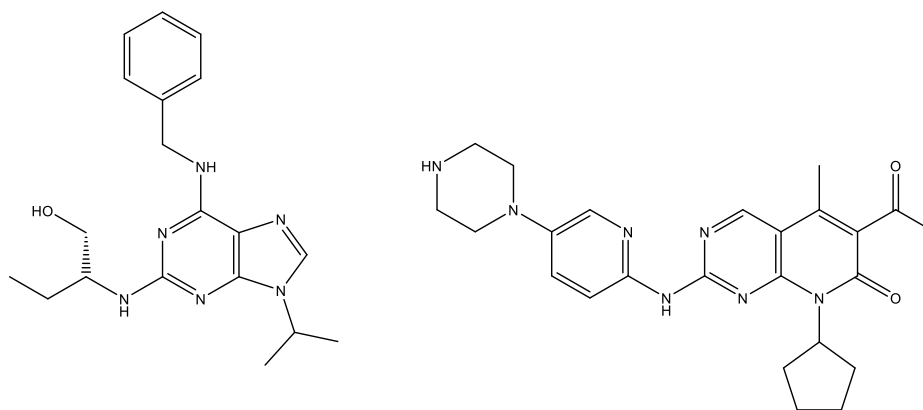
Kvůli časté deregulaci v buněčném cyklu u rakovinných buněk nalézají čím dál větší uplatnění léčiva, jež cílí na CDK. Farmakologická inhibice CDK se tak stala potenciální terapeutickou metodou léčby rakoviny. Překážkou při klinickém vývoji CDKi, jakožto antitumorových agens, byla původně nízká kinázová selektivita. A to zejména v rodině CDK, u které navíc nebylo jisté, na jaký enzym by bylo nejvhodnější směřovat terapii. Prvotní snahy o cílené CDKi původně hodnotily účinek nízkomolekulární látky flavopiridol, tzv. „pan-CDKi“, jež blokoval funkci mnoha CDK (CDK1, 2, 4, 6, 7 a 9). Jeho aktivita byla sledována u hematologických malignit, významnou překážkou však byla toxicita, složitá farmakokinetika a problematické podávání. Další generace pan-CDKi (např. dinaciclib, Obrázek 7), byla posléze

součástí klinického vývoje pro různé typy malignit (Coxon *et al.*, 2017; Gucký *et al.*, 2013; Mayer, 2015).



Obrázek 7: Struktura dinacilibu (podle Coxon *et al.*, 2017).

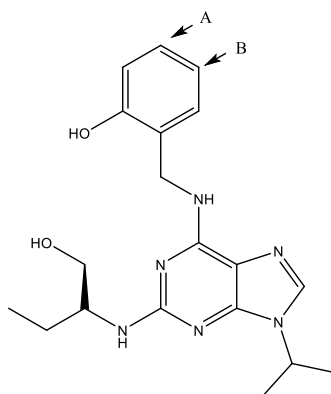
V současné době existuje více než 100 různých CDKi, které jsou komerčně dostupné a slouží k experimentálním účelům. Často jsou CDKi rozdělovány podle selektivity, avšak ta v mnoha případech nebyla podrobně prostudována. Takto jsou některé CDKi klasifikovány jako výše zmíněné pan-selektivní CDKi (působící na mnoho CDK), zatímco ostatní se řadí mezi selektivní inhibitory pro jednu či dvě CDK (často označovány jako duální inhibitory). Velmi slibným potenciálním léčivem je (R)-roscovitin (Obrázek 8, vlevo), který je též známý jako seliciclib nebo CYC202 a patří mezi pan-selektivní inhibitory, jelikož působí na CDK1, 2, 5, 7 a 9. Principem jeho inhibičního účinku je jeho navázání na vazebné místo pro ATP. V roce 2013 byl v první fázi klinického testování v kombinaci se sapacitabinem pro pacienty s pokročilými solidními tumory a též byl součástí druhé fáze klinického testování pro pacienty s nemalobuněčnými plicními tumory. Dále bylo zjištěno, že roscovitin a jeho deriváty jsou schopny blokovat buněčný cyklus ve všech jeho pozicích. Studie, zabývající se novými deriváty roscovitinu (BA-12 a BA-14), prokázala protinádorovou aktivitu u hepatocelulárního karcinomu (Haider *et al.*, 2013; Jorda *et al.*, 2018).



Obrázek 8: Struktura (R)-roscovitinu (vlevo) a palbociclibu (vpravo) (podle Coxon *et al.*, 2017 a Jorda *et al.*, 2018).

Mezi selektivní CDKi patří např. palbociclib (Obrázek 8, vpravo), který se spolu s látkami ribociclib a abemaciclib řadí mezi inhibitory CDK4 a 6. U těchto inhibitorů byla prokázána aktivita v buňkách rakoviny prsu typu ER⁺, jak v preklinických, tak v klinických testech. Tyto látky jsou stále ve vývoji, přesto již nyní vykazují působivé výsledky v případě rakoviny prsu typu ER⁺ a HER2-negativní (receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru) u metastazující rakoviny prsu. Pro další typy rakoviny prsu jsou inhibitory CDK4/6 již v testování (Kwapisz, 2017).

Dalším CDKi vykazující užší selektivitu je látka olomoucín II (Obrázek 9), která se strukturně velmi podobá roscovitinu. Obě látky patří mezi purinové deriváty cytokininů, jejichž 2,6,9-trisubstituované purinové jádro se prokázalo velkými inhibičními účinky na CDK. Jedním z prvních specifických CDKi byl olomoucín (2-[2-hydroxyethylamino]-6-benzylamino-9-methylpurin), který selektivně inhiboval CDK1, 2 a 5 v mikromolárních koncentracích. Posléze byla jeho struktura modifikována na již zmíněnou látku roscovitin. Během vývoje následných derivátů byl dalšími modifikacemi připraven olomoucín II, který dokáže inhibovat CDK9, a tím blokovat cyklus buněčného dělení. Vzhledem k tomu, že u něj byla prokázána významná inhibice enzymů CYP1A2 a 2C9 (v menší míře i 3A4) *in vitro*, použití olomoucínu II jako léčiva by mohlo ovlivnit aktivity těchto enzymů *in vivo*. Z tohoto důvodu by měl být klinický význam těchto interakcí pečlivě vyhodnocen (Kryštof *et al.*, 2002; Šiller *et al.*, 2009).



Obrázek 9: Struktura olomoucinu II. Místa A a B označují různé pozice, na kterých dochází k oxidaci během metabolismu CYP (podle Šiller *et al.*, 2009).

Experimentální část

4 Materiály a metody

4.1 Chemikálie

V experimentální části byly použity tyto chemikálie: isocitrát (ISO), isocitrátdehydrogenáza (IDH), nikotinamidadenindinucleotidfosfát (NADP⁺) (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), dihydrogenfosforečnan draselný, dimethylsulfoxid (DMSO), chloroform, hydrogenfosforečnan sodný, hydroxid draselný, kyselina chlorovodíková, octan sodný, síran hořečnatý (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), acetonitril, dichlormethan, methanol, propan-2-ol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie), kyselina chloristá, kyselina mravenčí, kyselina octová (Penta, Praha, Česká republika) a plynný dusík (Linde Technoplyn, Česká republika).

Ke stanovení aktivit enzymů CYP byly použity následující substráty a metabolity: ethoxyresorufin, 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin (Fluka, Buchs, Švýcarsko), bufuralol, chloroxazon, diklofenak sodný, kumarin, (S)-mefenytol, testosteron (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) a injekční roztok midazolamu (Chiesi, Vídeň, Rakousko). Použité chemikálie vykazovaly čistotu p.a. a chemikálie používané pro systém HPLC byly čistoty HPLC gradient grade.

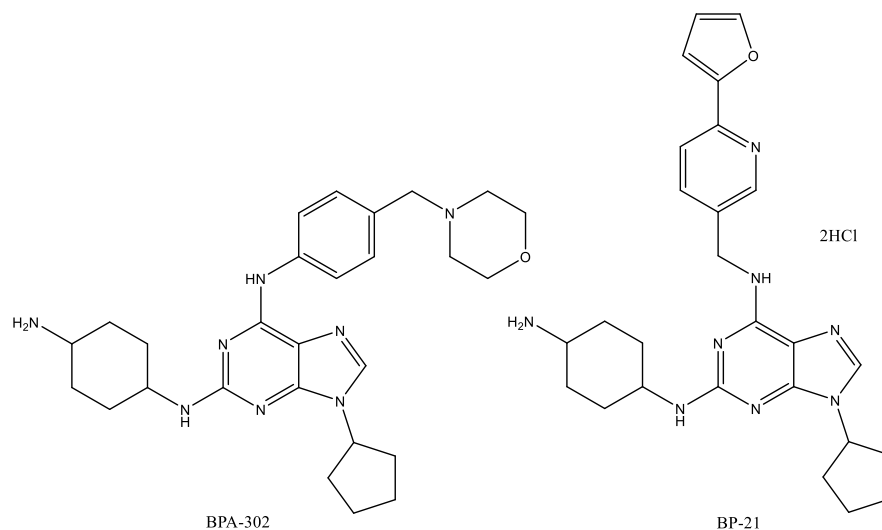
4.2 Testované látky

Sloučeniny pro studium inhibičního vlivu na enzymy CYP byly získány od Mgr. T. Guckého, PhD. z Ústavu chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a od skupiny Mgr. E. Řezníčkové, PhD. a Mgr. R. Jordy, PhD. z Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého a Institutu Experimentální botaniky AV ČR v Olomouci. Jednalo se o sloučeniny s označením BPA-302, BP-21 (Obrázek 10) a BP-117 (Obrázek 11). Systematické názvy těchto látek jsou následující:

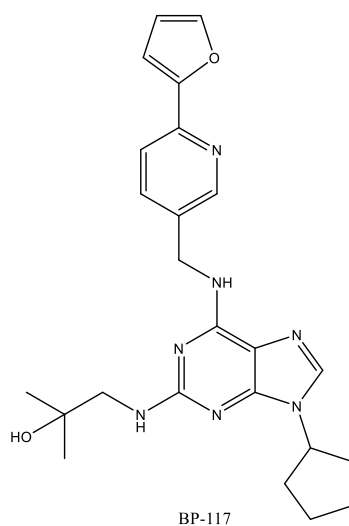
BPA-302: N^2 -(4-Amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-morfolin-4-ylmethyl-fenyl)-9H-purin-2,6-diamin

BP-21: 4-{9-Cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol dihydrochlorid

BP-117: 1-{9-Cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol



Obrázek 10: Struktura látek BPA-302 a BP-21 (podle Gucký *et al.*, 2018; Gucký *et al.*, 2013).



Obrázek 11: Struktura BP-117 (podle Gucký *et al.*, 2013).

4.3 Enzymy

4.3.1 Lidské jaterní mikrosomy

Směsné lidské jaterní mikrosomální frakce byly zakoupeny od firmy Biopredic (Rennes, Francie). Frakce byly získány v souladu s etickými pravidly země původu od 17 dárců (10 mužů, 7 žen). Celková koncentrace CYP byla 14,55 $\mu\text{mol/ml}$. Koncentrace proteinu byla 25 mg/ml .

4.3.2 Baktosomy (rekombinantní enzymy)

Bakteriální membránové struktury (baktosomy) exprimované z *Escherichia coli* obsahovaly koexprimovanou lidskou NADPH-cytochrom P450 reduktázu a lidské rekombinantní cytochromy P450 (CYP2A6). Baktosomy byly získány od firmy Cypex (Dundee, Velká Británie). Baktosomy měly tyto parametry:

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Koncentrace P450: | 7,3 nmol/ml |
| Koncentrace proteinu: | 14,1 mg/ml |
| Aktivita: | 7-hydroxylace kumarinu |
| K_M : | 0,8 μ M |
| V_{max} : | 7,6 pmol/min/pmol CYP |

4.4 Přístrojové vybavení

4.4.1 HPLC

Aktivity CYP byly stanovovány na systému HPLC od výrobce Shimadzu (Kyoto, Japonsko), který se skládal z odplyňovací jednotky mobilních fází DGU-20A5 (degasser), automatického dávkovače SIL-20AC (auto-sampler), řídicí jednotky CBM-20A, UV/VIS detektoru SPD-20A, fluorescenčního detektoru RF-10AXL, kolonového termostatu CTO-20AC (column oven), pumpy LC-20AD a softwaru LabSolutions také od firmy Shimadzu. Chromatografická separace probíhala na koloně LiChroCART RP-18 s reverzní fází (250 × 4 mm, velikost částic 5 μ m, předkolona 4 × 4 mm, velikost částic 5 μ m), či na koloně Chromolith RP-18 s reverzní fází (100 × 4,6 mm, monolitická, předkolona 5 × 4,6 mm). Obě kolony byly od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Pro hmotnostně spektrometrickou (MS) analýzu potenciálních metabolitů BPA-302 byly inkubované vzorky přeneseny do systému HPLC-MS s chromatografickou kolonou Acquity BEH C18 (100 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μ m) od firmy Waters (Milford, USA).

4.4.2 Hmotnostní spektrometr

Analýza potenciálních metabolitů látky BPA-302 probíhala na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Synapt G2-Si od výrobce Waters (Milford, USA).

Ionizace byla provedena elektrosprejem v pozitivním módu (ESI⁺). Ionty byly analyzovány v trojitém kvadrupólu Micromass Quattro micro[™] API (Waters; Milford, USA).

4.4.3 Další přístroje

Během experimentů byly dále použity tyto přístroje:

analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

centrifuga Eppendorf mini spin, Eppendorf (Hamburg, Německo)

koncentrátor vzorků Termovap TV-10, ECOM (Praha, Česká republika)

laboratorní pH metr Schott CG 843 se skleněnou elektrodou, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)

minitřepačka IKA MS 3 basic, MERCI (Brno, Česká republika)

sonikátor, Dynatech (Brno, Česká republika)

suchá lázeň MD-MP01-D, Biotech (Praha, Česká republika)

temperovaná třepačka TS-100, Biosan (Riga, Lotyšsko)

ultrazvuk K 10, Kraitex (Podhájska, Slovensko)

UV-VIS spektrofotometr/spektrofluorometr/luminometr TECAN Infinite M200, Schoeller Instruments (Praha, Česká republika) se softwarem Tecan Austria (Grödig, Rakousko)

vodní lázeň WB 14, Memmert (Schwabach, Německo)

vortex Heidolph Reax Top, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)

zařízení pro přípravu čisté a ultračisté vody, Waltrex Ultrapur, Waltrex (Praha, Česká republika)

4.5 Metody

4.5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných enzymů CYP v lidských jaterních mikrosomech/baktosomech

Pro stanovení enzymových aktivit jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci, resp. baktosomech, byly použity standartní metody využívající specifických substrátů pro jednotlivé formy CYP (Tabulka 5). Tyto metody byly prováděny na základě již zavedených postupů (Tabulky 6-13).

Tabulka 5: Jednotlivé formy CYP včetně jejich specifických substrátů, vznikajících metabolitů a hodnot konstanty Michaelise a Mentenové (K_M).

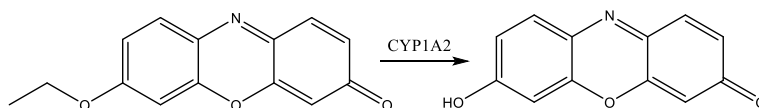
| CYP | Specifický substrát | Metabolit | K_M ($\mu\text{mol/l}$) |
|-------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1A2 | 7-ethoxyresorufin | resorufin | 5,2 |
| 2A6 | kumarin | 7-hydroxykumarin | 15,0 |
| 2B6 | 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin | 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin | 15,0 |
| 2C9 | diklofenak | 4'-hydroxydiklofenak | 20,0 |
| 2D6 | bufuralol | 1'-hydroxybufuralol | 14,3 |
| 2E1 | chloroxazon | 6-hydroxychloroxazon | 26,0 |
| 3A4/5 | midazolam | 1'-hydroxymidazolam | 2,2 |
| 3A4/5 | testosteron | 6 β -hydroxytestosteron | 100,0 |

Vliv testovaných látek na enzymovou aktivitu byl studován pro CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5 pomocí výše uvedených specifických substrátů s detekcí HPLC. Dále byl účinek studovaných látek testován pro CYP2C8 a CYP2C19 za účasti specifických luminiscenčních substrátů se spektrofotometrickou detekcí metodou P450-Glo™ Assay od firmy Promega (Madison, USA). Jako potenciální inhibitory CYP byly vybrány látky BPA-302, BP-21 a BP-117. Zásobní roztoky testovaných látek o koncentraci 200 mmol/l byly připraveny rozpuštěním v DMSO.

Inhibiční reakce byly prováděny dle zavedených protokolů (Tabulky 6-13) na sedmi koncentračních hladinách BPA-302, BP-21 a BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 $\mu\text{mol/l}$). Koncentrační řady testovaných látek dále obsahovaly kontrolní vzorek bez inhibitoru, který představoval hodnotu aktivity 100 %. K této hodnotě byly následně vztaženy ostatní aktivity u vzorků obsahujících testované látky. Všechny experimenty současně obsahovaly i kontrolní vzorky s rozpouštědlem (DMSO), jelikož jeho nízké koncentrace mohou narušit (inhibovat) enzymovou aktivitu CYP (Chauret *et al.*, 1998). Vzorky s DMSO byly namíchaný tak, aby procentuální obsah DMSO odpovídal jeho množství ve vzorcích s testovanými látkami. Pokud byl detekován vliv rozpouštědla na aktivitu CYP, byl tento dopad započítán do závěrečného vyhodnocení aktivity příslušného CYP. Tímto způsobem byl zamezen výskyt zkreslených účinků studovaných látek na CYP enzymy. Míra inhibice testovaných látek byla vyhodnocena jako procentuální úbytek vzniklého produktu vzhledem ke kontrole, jež reprezentovala 100% aktivitu enzymu.

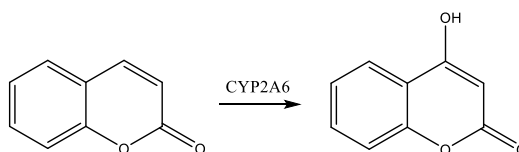
Tabulka 6: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP1A2.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP1A2 | (Chang a Waxman, 1998) |
| Objem reakční směsi | 100 μ l |
| Specifický substrát | 5,2 μ mol/l 7-ethoxyresorufin |
| Mikrosomální frakce | 35 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| Preinkubace | 30 min při 37 °C |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Īnkubace | 15 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 200 μ l methanolu |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min |
| Objem ke stanovení | 200 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s fluorescenční detekcí (excitace: 535 nm, emise: 585 nm) |
| Mobilní fáze | 25 mmol/l Na_2HPO_4 pH 7 / methanol (58:42; v/v) |
| Eluce | Isokratická |
| Schéma reakce: | |



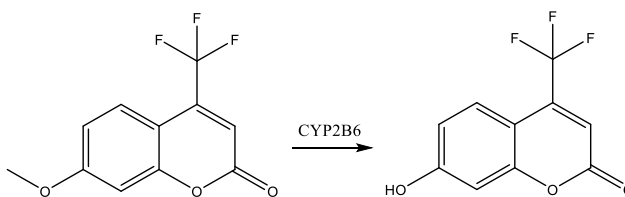
Tabulka 7: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP2A6.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP2A6 | (Waxman a Chang, 1998) |
| Objem reakční směsi | 100 μ l |
| Specifický substrát | 15,0 μ mol/l kumarin |
| Mikrosomální frakce | 35 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| Preinkubace | 30 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Incubace | 15 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| Zastavení reakce | 200 μ l methanolu |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ |
| Objem ke stanovení | 200 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s fluorescenční detekcí (excitace: 338 nm, emise: 458 nm) |
| Mobilní fáze | 0,5% kyselina octová / acetonitril (60:40; v/v) |
| Eluce | Isokratická |
| Schéma reakce | |



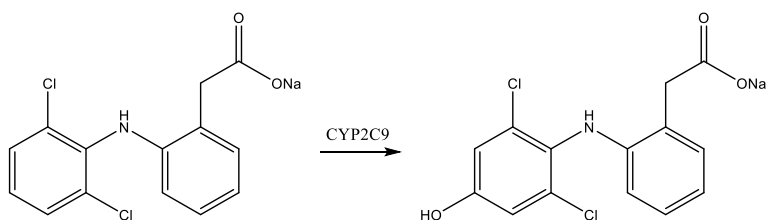
Tabulka 8: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP2B6.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP2B6 | (Morse a Lu, 1998) |
| Objem reakční směsi | 100 μ l |
| Specifický substrát | 15,0 μ mol/l 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin |
| Mikrosomální frakce | 35 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| Preinkubace | 30 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP ⁺ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Īnkubace | 15 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| Zastavení reakce | 200 μ l methanolu |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ |
| Objem ke stanovení | 200 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s fluorescenční detekcí (excitace: 410 nm, emise: 510 nm) |
| Mobilní fáze | 20 mmol/l Na_2HPO_4 pH 7 / methanol (46:54; v/v) |
| Eluce | Isokratická |
| Schéma reakce | |

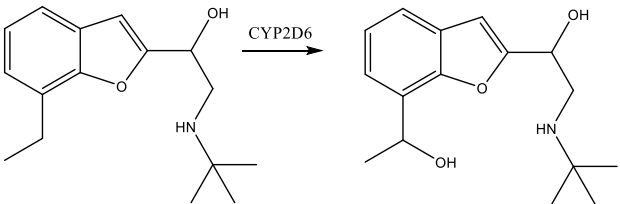


Tabulka 9: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP2C9.

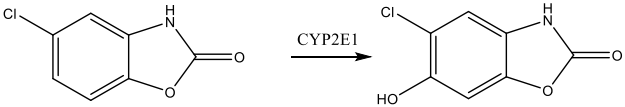
| | |
|--------------------------------|--|
| CYP2C9 | (Crespi <i>et al.</i> , 1998a) |
| Objem reakční směsi | 200 μ l |
| Mikrosomální frakce | 35 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Preinkubace | 30 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| Specifický substrát | 20,0 μ mol/l diklofenak |
| Inkubace | 25 min při 37 $^\circ\text{C}$ |
| Zastavení reakce | 50 μ l acetonitril/kyselina octová (94:6) |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ |
| Objem ke stanovení | 200 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s UV detekcí při 280 nm |
| Mobilní fáze | A: 2,85 mmol/l HClO_4 / acetonitril (7:3; v/v) B: methanol |
| Eluce | Gradientová (0–7 min, 20 % B; 7–15 min, 40 % B; 15–15,5 min, 90 % B; 15,5–19 min, 100 % B; 19–23 min, 20 % B) |
| Schéma reakce | |



Tabulka 10: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP2D6.

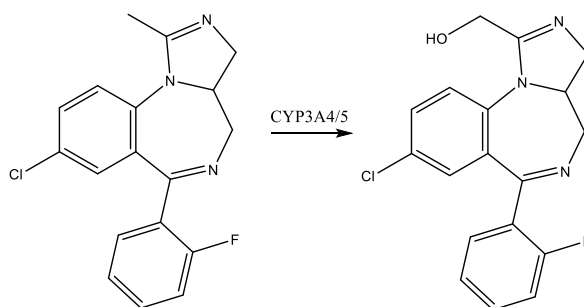
| | |
|--------------------------------|--|
| CYP2D6 | (Crespi <i>et al.</i> , 1998b) |
| Objem reakční směsi | 200 μ l |
| Specifický substrát | 14,3 μ mol/l bufuralol |
| Mikrosomální frakce | 67 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| Preinkubace | 30 min při 37 °C |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Incubace | 20 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 20 μ l 70% HClO_4 |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min |
| Objem ke stanovení | 150 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s fluorescenční detekcí (excitace: 252 nm, emise: 302 nm) |
| Mobilní fáze | A: 2,85 mmol/l HClO_4 / acetonitril (7:3; v/v) B: acetonitril |
| Eluce | Gradientová (0–5,5 min, 30 % B; 5,5–8,5 min, 100 % B; 8,5–11 min, 30 % B) |
| Schéma reakce |  |

Tabulka 11: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP2E1.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP2E1 | (Lucas <i>et al.</i> , 1996) |
| Objem reakční směsi | 1000 μ l |
| Mikrosomální frakce | 160 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP ⁺ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Preinkubace | 30 min při 37 °C |
| Specifický substrát | 26,0 μ mol/l chloroxazon |
| Inkubace | 20 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 42,5 μ l 42,5% H_3PO_4 |
| Extrakce | 2 ml propan-2-ol / chloroform (15:85; v/v) (20 s vortex) |
| Centrifugace | 2000 ot/min, 10 min, 4 °C |
| Odpaření | 1 ml spodní fáze extraktu odpařeno pod proudem dusíku při 40 °C |
| Objem ke stanovení | Odparek rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (0,5% kyselina octová/acetonitril (3:1; v/v)) |
| Detekce | HPLC s UV detekcí při 287 nm |
| Mobilní fáze | 0,5% kyselina octová / acetonitril (3:1; v/v) |
| Eluce | Isokratická |
| Schéma reakce |  |

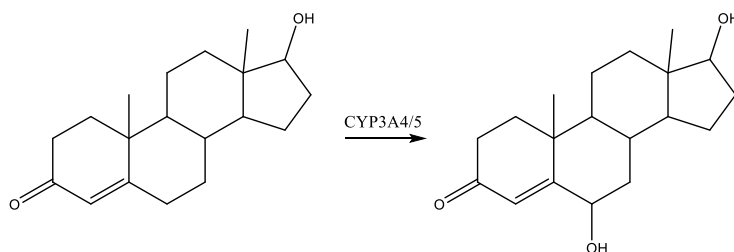
Tabulka 12: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP3A4/5.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP3A4/5 | (Kronbach <i>et al.</i> , 1989) |
| Objem reakční směsi | 100 μ l |
| Mikrosomální frakce | 12,56 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP ⁺ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Preinkubace | 30 min při 37 °C |
| Specifický substrát | 2,2 μ mol/l midazolam |
| Inkubace | 20 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 100 μ l methanolu (vychlazeného) |
| Centrifugace | 13400 ot/min, 5 min |
| Objem ke stanovení | 150 μ l supernatantu |
| Detekce | HPLC s UV detekcí při 240 nm |
| Mobilní fáze | 10 mmol/l octan sodný pH 6 / acetonitril (62:38, v/v) |
| Eluce | Gradientová (0–19 min, průtok 0,4 ml/min; 19–24 min, průtok 1,5 ml/min; 24–25 min, průtok 0,4 ml/min) |
| Schéma reakce | |



Tabulka 13: Stanovení vlivu testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 na lidskou mikrosomální frakci CYP3A4/5.

| | |
|--------------------------------|--|
| CYP3A4/5 | (Guengerich <i>et al.</i> , 1986) |
| Objem reakční směsi | 500 μ l |
| Mikrosomální frakce | 100 pmol CYP |
| Inhibitor | BPA-302 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-21 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l) |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP ⁺ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Preinkubace | 30 min při 37 °C |
| Specifický substrát | 100,0 μ mol/l testosteron |
| Inkubace | 20 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 100 μ l 1M Na_2CO_3 / 2M NaCl |
| Extrakce | 2 ml dichlormethanu (15 s vortex) |
| Centrifugace | 3000 ot/min, 5 min, 4 °C |
| Odpaření | 1 ml spodní fáze extraktu odpařeno pod proudem dusíku při 40 °C |
| Objem ke stanovení | Odparek rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (64% methanol) |
| Detekce | HPLC s UV detekcí při 245 nm |
| Mobilní fáze | A: destilovaná voda B: 100% methanol |
| Eluce | Ggradientová (0–19 min, 30 % B; 19–20 min, 100 % B; 20–27 min, 30 % B) |
| Schéma reakce | |



V případě výskytu významného inhibičního vlivu studovaných látek (snížení aktivity o více než 50 %), byla vypočítána hodnota IC_{50} . Ta udává koncentraci, při níž je za daných podmínek inhibována aktivita daného enzymu CYP na 50 %. Hodnoty IC_{50} byly softwarově vypočteny v programu Sigma Plot 12.0 od firmy Syntat Software, Inc. (Chicago, USA).

Inhibiční reakce za účasti luminiscenčních substrátů se spektrofotometrickou detekcí metodou P450-Glo™ Assay od firmy Promega, byly prováděny na šesti koncentračních hladinách testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 μ mol/l). Substráty CYP enzymů byly proluciferiny

(Tabulka 14), deriváty luciferinu [(4S)-4,5-dihydro-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazolyl)-4-thiazolkarboxylové kyseliny]. Podstatou reakce byla konverze těchto derivátů na luciferinové produkty pomocí CYP, které byly následně detekovány v druhé reakci činidlem pro detekci luciferinu (angl. Luciferin Detection Reagent).

Tabulka 14: Jednotlivé formy CYP včetně jejich specifických substrátů a hodnot konstanty Michaelise a Mentenové (K_M) pro metodu P450-Glo™ Assay. Podle Promega, 2019.

| CYP | Množství CYP | Substrát | K_M ($\mu\text{mol/l}$) |
|------|--------------|-----------------|-----------------------------|
| 2C8 | 1 pmol | Luciferin-ME | 150 |
| 2C19 | 0,25 pmol | Luciferin-H EGE | 10 |

4.5.2 Identifikace potenciálních metabolitů BPA-302 metodou hmotnostní spektrometrie

Pro posouzení možnosti, že mezi testovanou látkou BPA-302 a lidskými jaterními enzymy CYP dochází k interakcím vedoucím ke vzniku metabolitů, bylo BPA-302 inkubováno s mikrosomy obdobně jako v případě stanovení inhibiční aktivity testovaných látek, avšak bez přítomnosti specifického substrátu CYP a v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ BPA-302. Byly připraveny dvě sady vzorků. První sada zahrnovala vzorek BPA-302 inkubovaného s mikrosomy, dále kontrolní vzorek a slepý vzorek. Do kontrolního vzorku, obsahujícího testovanou látku, byly mikrosomy přidány až po inkubaci, aby nedošlo k enzymatické reakci. Slepý vzorek obsahoval pouze BPA-302 v reakčním médiu (fosfátový pufr, pH 7,4). Reakce byly zastaveny 2 ml methanolu. Druhá sada vzorků byla provedena analogicky jako sada první, reakce však byly zastaveny 20 μl 70% HClO_4 a 2 ml methanolu (Šiller *et al.*, 2009).

Odpařené vzorky z první sady byly rozpuštěny v 500 μl 50% kyselině mravenčí (pH 1,0) a vzorky z druhé sady byly rozpuštěny ve vodě. Vzorky byly poté přečištěny přes SPE (extrakce na pevné fázi) kolony (sorben C18) za následujících podmínek:

| | |
|------------------|---|
| Kondicionace: | 1 ml methanolu, 1 ml vody |
| Nanesení vzorku: | 50 μl |
| Promytí: | 1 ml vody |
| Eluce: | 2 ml 10 % kyseliny mravenčí v methanolu |

Vzorky byly následně rozpuštěny v 50% methanolu do finální koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ a nanoseny na HPLC-MS (Tabulka 15). K detekci potenciálních metabolitů BPA-302 byly porovnávány chromatogramy vzorků testované látky inkubované s CYP proti kontrolním vzorkům. V případě výskytu rozdílných peaků na chromatogramech byly dané oblasti zobrazeny jako hmotnostní spektra, ve kterých byly hledány kandidátní ionty potenciálních metabolitů (Široká *et al.*, 2018).

Tabulka 15: Reakční podmínky pro identifikaci potenciálních metabolitů BPA-302.

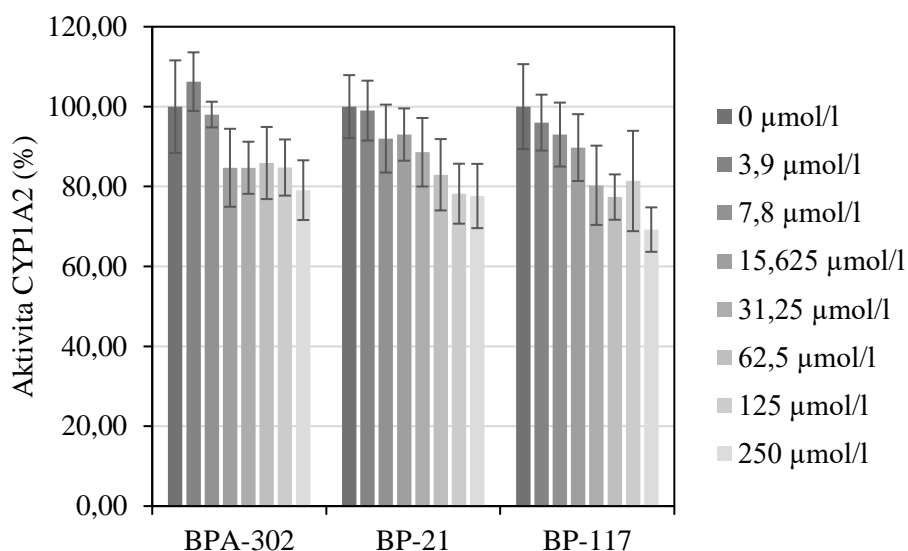
| | |
|--------------------------------|--|
| Objem reakční směsi | 1 ml |
| Mikrosomální frakce | 200 pmol CYP |
| Substrát | 100 $\mu\text{mol/l}$ BPA-302 |
| Pufr | 100 mmol/l, KH_2PO_4 , pH 7,4 |
| NADPH-generující systém | 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mmol/l isocitrát; 8 mmol/l Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml |
| Inkubace | 30 min při 37 °C |
| Zastavení reakce | 2 ml methanolu nebo 20 μl HClO_4 a 2 ml methanolu |
| Centrifugace | 14000 ot/min, 10 min |
| Odpaření | Odpařeno pod proudem dusíku při 40 °C |
| Přečištění | Extrakce na pevné fázi (SPE) |
| HPLC | mobilní fáze: A. 15 mmol/l kyselina mravenčí pH 4,0; B. 100% methanol |
| Eluce | Gradientová (0–2 min, 5% B; 2–17 min, 5–100% B; 17–20 min, 100–5% B) |
| Detekce | Trojité kvadrupólový hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu |

5 Výsledky

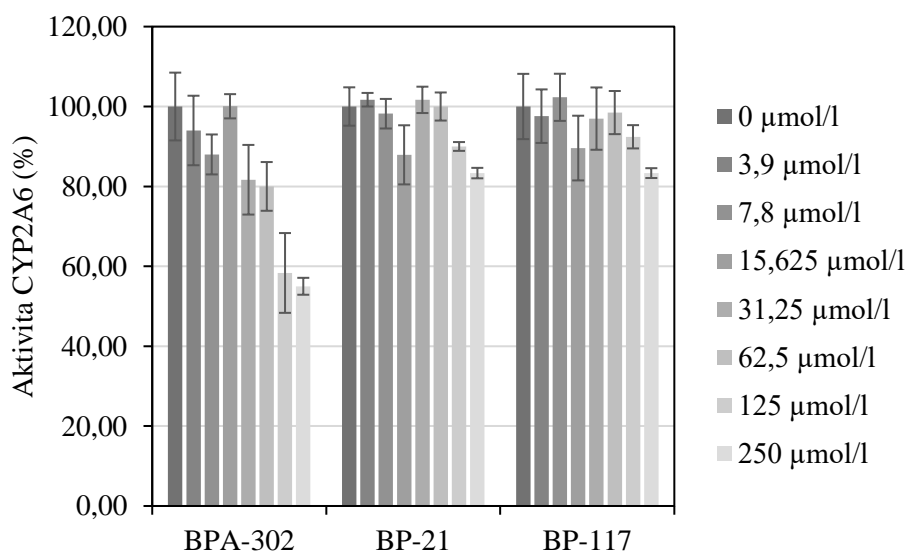
5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných enzymů CYP v lidských jaterních mikrosomech/baktosomech

Při experimentech byl testován vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 na enzymovou aktivitu devíti vybraných CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5) v lidské jaterní mikrosomální frakci, které se významně podílí na metabolismu léčiv. Inhibiční vliv byl studován při sedmi koncentračních hladinách těchto látek (3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 $\mu\text{mol/l}$).

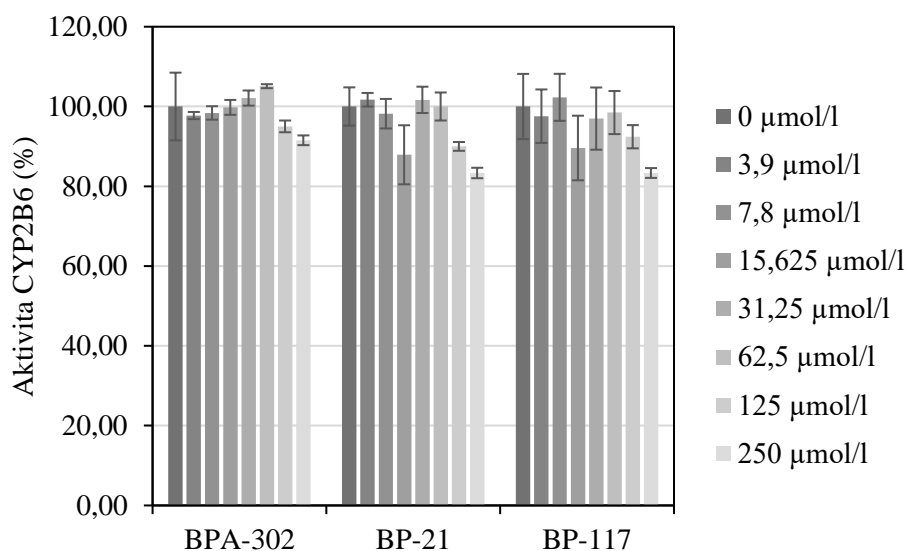
Nejvýraznější inhibice aktivity CYP byla zaznamenána u enzymu CYP2C19. Jeho aktivita klesla na 22 % původní hodnoty při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ BPA-302. V případě BP-21 při stejné koncentraci jeho aktivita klesla na 13 %. Jeho nejnižší enzymová aktivita (6 %) byla pozorována při nejvyšší koncentraci (250 $\mu\text{mol/l}$) BP-117. Další enzym, jehož aktivita byla inhibována testovanými látkami byl CYP2C9. Látky BP-21 a BP-117 při nejvyšší koncentraci jeho aktivitu snížily na 19 %, resp. 17 %, oproti tomu BPA-302 snížila aktivitu na 70 %. Enzymová forma CYP1A2 nebyla výrazně ovlivněna ani při přítomnosti maximální koncentrace testovaných látek. Její aktivita se pohybovala mezi 69 a 79 % původní hodnoty. V případě CYP2A6 bylo pozorováno kolísání aktivit v rámci koncentračních řad u všech testovaných látek. Nejnižší hodnota aktivity byla 55 % při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ BPA-302, u ostatních látek neklesla pod 80 %. U enzymů CYP2B6 a CYP2E1 nebyli signifikantně změněny jejich aktivity. Potenciální léčivo BP-21 jako jediné z testovaných látek slabě inhibovalo aktivitu CYP2C8, a to na 66 % z původní hodnoty. Enzymatická aktivita CYP2D6 byla významně snížena na 36 %, resp. 46 % při maximálních koncentracích BPA-302 a BP-117. Celková aktivita CYP3A4/5 byla vypočítána z průměru aktivit experimentů se specifickými substráty midazolamem a testosteronem. Nejnižší aktivita v rámci CYP3A4/5 byla zaznamenána v případě maximální koncentrace BP-117 (49 %) a BPA-302 (64 %). Vzhledem k výraznějšímu inhibičnímu potenciálu testovaných látek u CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4/5 byly stanoveny hodnoty IC_{50} . Veškeré výsledky jsou shrnuty a graficky zobrazeny na Obrázcích 12-20 a v Tabulce 16.



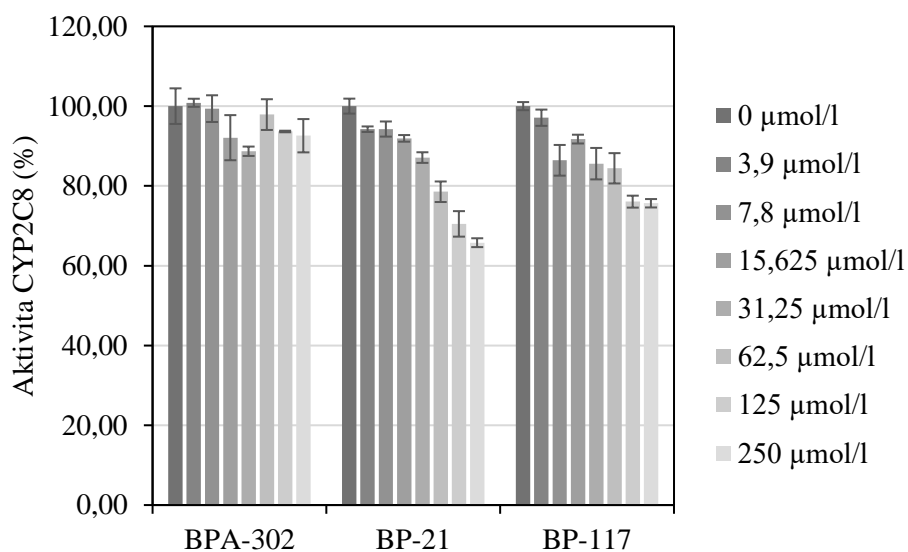
Obrázek 12: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP1A2 v lidských jaterních mikrosomech.



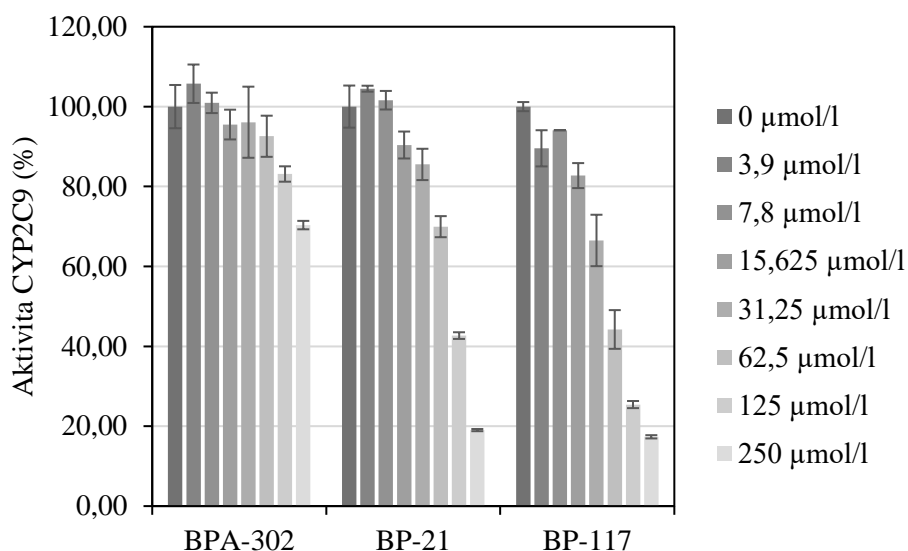
Obrázek 13: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2A6 v rekombinantních enzimech (baktosomech).



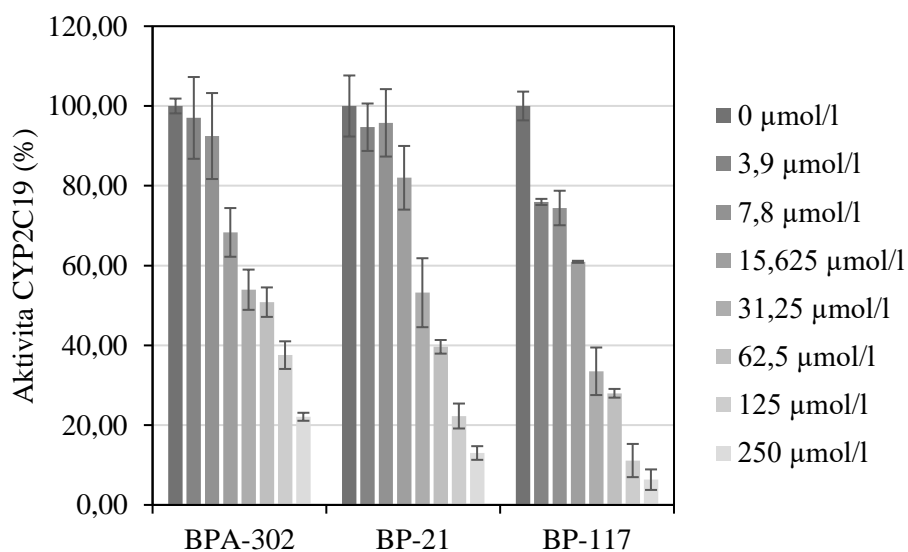
Obrázek 14: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2B6 v lidských jaterních mikrosomech.



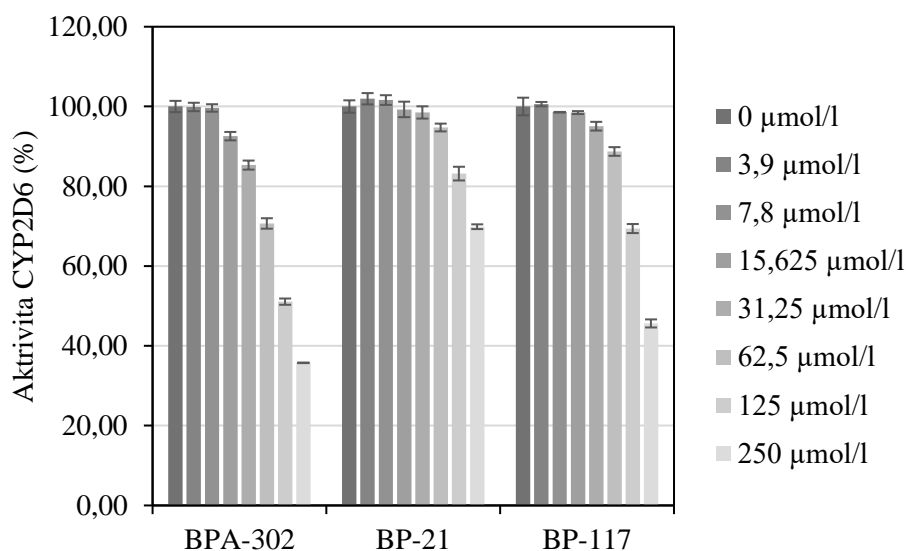
Obrázek 15: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2C8 v lidských jaterních mikrosomech.



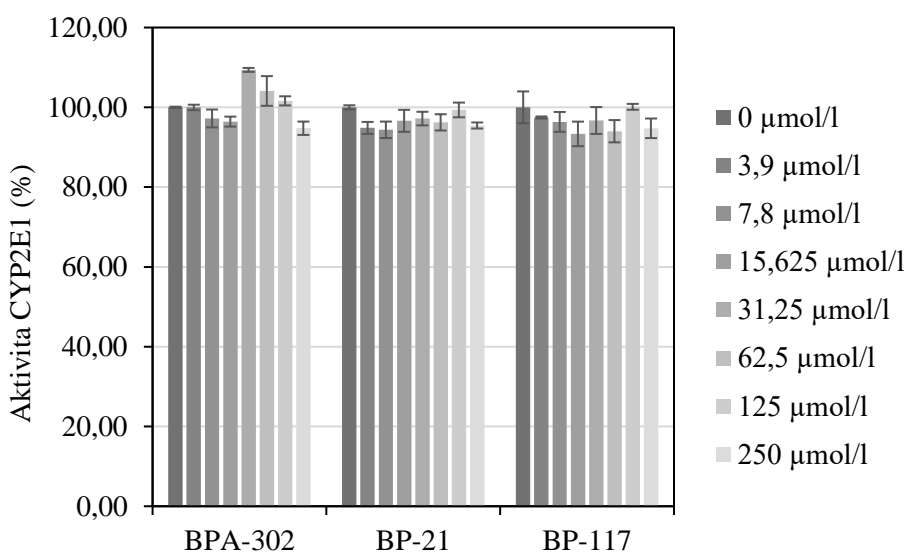
Obrázek 16: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2C9 v lidských jaterních mikrosomech.



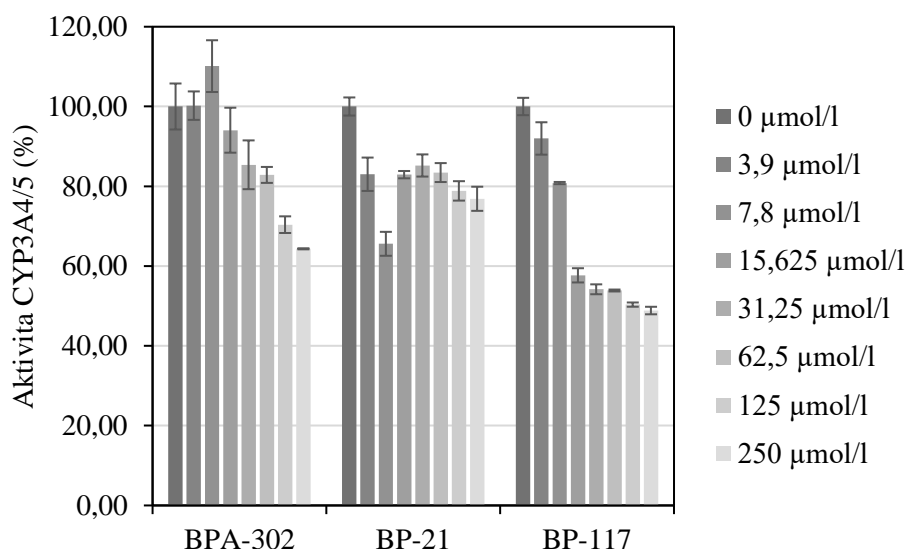
Obrázek 17: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2C19 v lidských jaterních mikrosomech.



Obrázek 18: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2D6 v lidských jaterních mikrosomech.



Obrázek 19: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP2E1 v lidských jaterních mikrosomech.



Obrázek 20: Vliv potenciálních léčiv BPA-302, BP-21 a BP-117 o koncentracích 0; 3,9; 7,8; 15,625; 31,25; 62,5; 125 a 250 µmol/l na enzymovou aktivitu CYP3A4/5 v lidských jaterních mikrosomech.

Tabulka 16: Inhibiční vliv testovaných látek na enzymovou aktivitu CYP v lidských jaterních mikrosomech vyjádřený jako IC₅₀.

| Enzym | Testovaná látka | IC ₅₀ (µmol/l) |
|----------|-----------------|---------------------------|
| CYP2C9 | BP-21 | 129,29 ±23,91 |
| | BP-117 | 46,18 ±6,58 |
| CYP2C19 | BP-302 | 28,86 ±12,69 |
| | BP-21 | 34,07 ±4,91 |
| | BP-117 | 23,88 ±9,02 |
| CYP2D6 | BPA-302 | 91,11 ±10,8 |
| | BP-117 | 167,84 ±24,99 |
| CYP3A4/5 | BP-117 | 138,40 ±18,87 |

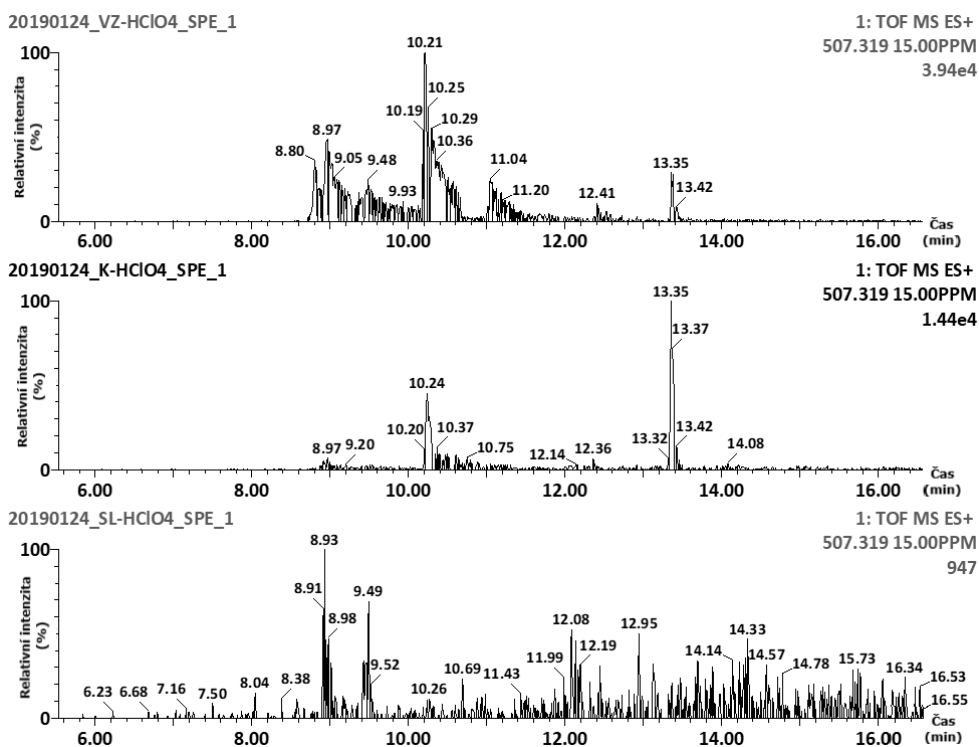
5.2 Identifikace potenciálních metabolitů BPA-302 metodou hmotnostní spektrometrie

Při experimentech bylo zjištěno, že vzorky okyselené kyselinou chloristou mají vyšší výtěžek než vzorky, jejichž inkubace byla zastavena jen methanolem, proto byla tato sada vzorků vhodnější k analýze. Analogicky, okyselením vzorku (50% kyselinou mravenčí) před SPE, bylo dosaženo lepší extrakce.

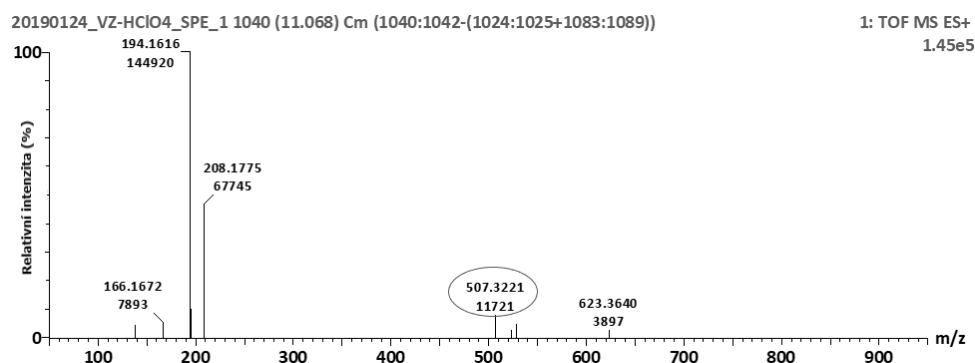
Na chromatogramech z analýzy HPLC-MS se vyskytovalo velké množství peaků. Nebyl zaznamenán výrazný peak, jež by mohl být přiřazen potenciálním metabolitům. Z tohoto důvodu byla identifikace potenciálních metabolitů provedena softwarovým

prohledáváním hmotnostních spekter podle hodnoty m/z (poměr hmotnosti a náboje iontu) pomocí programu MetaboLynx. Bylo navrženo několik možností metabolizace testované látky. První navrženou reakcí, kterou zprostředkovávají enzymy CYP, byla oxidace (viz kapitola 2.3). Další navrženou reakcí byla dealkylace. Třetí možností byla jejich kombinace (McClue a Stuart, 2008; Nutley *et al.*, 2005; Rypka *et al.*, 2002).

Relativní molekulová hmotnost (M_r) BPA-302 byla 490,66. Při měření v pozitivním módu byl zaznamenán ion testované látky v retenčním čase (RT) 10,73 min s m/z 491,3241. Hodnota m/z by se při oxidaci CYP zvýšila o přibližně 15,99 oproti mateřskému iontu. Poměr m/z by v případě metabolitu vzniklého prostou oxidací byl přibližně 507,3191. Cíleným vyhledáváním m/z 507,3191 byl v RT 11,068 min nalezen ion s hodnotou m/z 507,3221 (Obrázky 21 a 22).

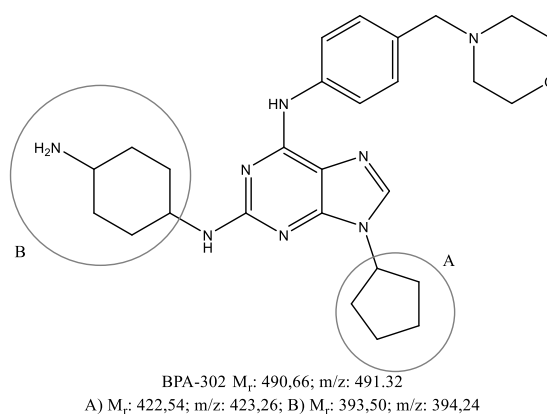


Obrázek 21: Identifikace potenciálního metabolitu BPA-302 inkubovaného s lidským jaterním systémem CYP pomocí HPLC-MS analýzy. Koncentrace testované látky byla 100 $\mu\text{mol/l}$. Inkubace probíhala 30 min při 37 $^{\circ}\text{C}$. Reakce byla zastavena 20 μl HClO_4 a 2 ml methanolu. Chromatogram vzorku BPA-302 – nahoře, kontrolní vzorek – uprostřed, slepý vzorek – dole.



Obrázek 22: Hmotnostní spektrum potenciálního metabolitu látky BPA-302 po inkubaci s enzymatickým systémem lidských jaterních cytochromů P450 v retenčním čase 11,068 min. Enzymatická reakce byla zastavena. Finální koncentrace testované látky byla 100 $\mu\text{mol/l}$ v methanolu. Analýza byla provedena na systému HPLC-MS (ESI⁺). Zvýrazněný ion s m/z 507,3221 reprezentuje přítomnost oxidované formy testované látky.

Při dealkylaci cyklopentylového kruhu by se hodnota m/z snížila na 423,2615 (Obrázek 23). Následnou oxidací by m/z potenciálního metabolitu stoupla na 439,2564. Oproti tomu při dealkylaci 4-aminocyklohexylu by poměr m/z činil 394,2350, jeho oxidovaná forma pak 410,2299. Přítomnost některého z uvedených iontů však nebyla signifikantně potvrzena. Hmotnostní spektra dále byla prohledávána na další více či méně pravděpodobné reakce CYP – dvojnásobná oxidace, desaturace, desaturace s oxidací a desaturace s dvojnásobnou oxidací. Analogicky, ionty těchto reakcí nebyly v testovaných vzorcích jednoznačně potvrzeny.



Obrázek 23: Návrh oblastí dealkylace postranních řetězců BPA-302 enzymy CYP. A) Dealkylace cyklopentylového kruhu, B) dealkylace 4-aminocyklohexylu (podle McClue a Stuart, 2008; Nutley *et al.*, 2005; Rypka *et al.*, 2002).

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu potenciálních léčiv (inhibitorů cyklin-dependentních kináz) BPA-302, BP-21 a BP-117 na aktivitu vybraných enzymů cytochromů P450, jež se účastní I. fáze biotransformace xenobiotik. V případě, že by tyto látky vykazovaly inhibiční účinek na aktivity některých forem cytochromů P450, mohlo by při současném podávání léčiv dojít k nežádoucím lékovým interakcím na úrovni metabolismu, a tím k možnému ovlivnění léčby pacienta.

Výsledky *in vitro* experimentů ukazují, že nejvíce ovlivněným enzymem rodiny cytochromů P450 byl CYP2C19. Všechny tři testované látky významně snižovaly jeho aktivitu. Nejvíce byla aktivita CYP2C19 inhibována látkou BP-117 při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$, a to na 6 % původní hodnoty ($\text{IC}_{50} = 23,88 \pm 9,02 \mu\text{mol/l}$). Významná léčiva, která jsou tímto enzymem metabolizována jsou inhibitory protonové pumpy (PPI), mezi které patří např. omeprazol a pantoprazol, dále se také účastní metabolické aktivace antikoagulancia clopidogrelu. Z toho vyplývá, že by současné podávání těchto látek s léčivy metabolizujícími se CYP2C19, mohlo vyústit v případě PPI ke zvýšené produkci žaludeční kyseliny s následným rozvojem žaludečních vředů, dvanáctíkových vředů atd., v případě clopidogrelu v krvácení (McTavish *et al.*, 1991; Zanger a Schwab, 2013).

Značný inhibiční efekt se projevil rovněž na snížení katalytické aktivity enzymu CYP2C9, a to v případě BP-21 a BP-117. Látkou BPA-302 nebyla jeho aktivita výrazně ovlivněna. V případě látky BP-21 (o koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$) byl zaznamenán pokles specifické reakce, oxidace diklofenaku, na 19 % ($\text{IC}_{50} = 129,29 \pm 23,91 \mu\text{mol/l}$). V případě druhé látky klesla aktivita na 17 % při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ BP-117 ($\text{IC}_{50} = 46,18 \pm 6,58 \mu\text{mol/l}$). To znamená, že by při současném podávání s léčivy metabolizovanými CYP2C9 (warfarin, fenytoin, losartan, tolbutamid, NSAID) mohlo dojít ke krvácení, zvýšení krevního tlaku, hyperglykémii či předávkování, v závislosti na daných lécích (viz podkapitola 2.4.2).

Inhibiční vliv testovaných látek BPA-302 a BP-117 byl zaznamenán také u přeměny bufuralolu za účasti CYP2D6. Aktivita tohoto enzymu byla snížena na 36 % při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ BPA-302 ($\text{IC}_{50} = 91,11 \pm 10,8 \mu\text{mol/l}$) a na 46 % při stejné koncentraci BP-117 ($\text{IC}_{50} = 167,84 \pm 24,99 \mu\text{mol/l}$). Nežádoucím lékovým interakcím by mohlo dojít u pacientů užívajících např. antidepresiva (amitriptylin, paroxetin) či analgetika (kodein, tramadol) a další (viz podkapitola 2.4.2).

V lidských jaterních mikrosomech byla při *in vitro* experimentech zaznamenána také inhibice CYP3A4/5. Jeho aktivita poklesla na 49 % původní hodnoty při nejvyšší koncentraci (250 $\mu\text{mol/l}$) BP-117 ($\text{IC}_{50} = 138,4 \pm 18,87 \mu\text{mol/l}$). BPA-302 a BP-21 jeho katalytickou aktivitu výrazně nesnižovaly. Lékové interakce by mohly být očekávány s rozsáhlou řadou léků z řad imunosupresiv (cyklosporin A, tacrolimus), antibiotik (erytromycin), benzodiazepinů (diazepam), antidepresiv (amitriptylin, citalopram), opioidů (metadon) a mnoho dalších (podkapitola 2.4.3; Zanger a Schwab, 2013).

Aktivita ostatních enzymů CYP nebyla významně ovlivněna během experimentů ani při nejvyšších koncentracích testovaných látek. Přestože ve výše uvedených odstavcích byly nastíněny možné lékové interakce s testovanými látkami, pro jejich případnou aplikaci bude hlavním rozhodujícím faktorem jejich hladina. Příkladem může být studie zabývající se např. ovlivněním buněčné aktivity v buněčné linii akutní myeloidní leukémie MV4-11. V experimentu bylo dosaženo zastavení buněčného cyklu již při koncentracích 1 nmol/l BPA-302 (Gucký *et al.*, 2018).

Díky velkému potenciálu BPA-302 pro klinické využití, byla tato sloučenina podrobena studiu přítomnosti potenciálních metabolitů cytochromů P450. Testovaná látka byla inkubována s lidskými jaterními mikrosomy, analogicky jako při *in vitro* testování inhibičního vlivu na CYP, avšak v nepřítomnosti jejich specifického substrátu. Post-inkubační zpracování vzorku bylo významně ovlivněno snížením pH kyselinou chloristou, čímž bylo dosaženo vyššího výtěžku.

Pro představu o podobě kandidátních iontů potenciálních metabolitů byly navrženy teoretické způsoby biotransformace BPA-302. Nejpravděpodobnějším typem metabolizace byla oxidace. Prohledáváním hmotnostních spekter přesným m/z byl detekován ion potvrzující tento způsob metabolizace. Z dosažených výsledků nebylo možné určit pozici, kde dochází k navázání atomu kyslíku. Jedním z potenciálních míst biotransformace by teoreticky mohl být morfolinový kruh, na kterém by mohlo docházet k C-oxidaci či N-oxidaci. Právě C-oxidace morfolinového kruhu by mohla souviset s metabolizací CYP2C19, jak ve své práci uvádí Baker *et al.* (1999). Další teoretické možnosti biotransformace pomocí CYP (dealkylace cyklopentylu či 4-aminocyklohexylu nebo jejich následná oxidace) nebyly experimenty signifikantně dokázány (McClue a Stuart, 2008; Nutley *et al.*, 2005; Rypka *et al.*, 2002).

Na základě minimálního rozdílu mezi chromatogramy vzorku BPA-302 a kontrolního vzorku, v kombinaci s nízkým množstvím detekované oxidované formy BPA-302, se lze domnívat, že k metabolizaci CYP dochází jen minoritně. Pro detailnější zkoumání metabolismu studované látky by byla vhodná příprava izotopicky značeného standardu BPA-302 a dále provedení většího množství experimentů. Podrobnější studium metabolizace testované látky však bylo nad rámec této diplomové práce.

7 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo sledování vzájemných interakcí mezi potenciálními léčivy patřící mezi inhibitory cyklin-dependentních kináz s vybranými biotransformačními enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik – cytochromy P450 (CYP). Podstatou bylo pozorování změn aktivit CYP vlivem testovaných látek BPA-302, BP-21 a BP-117 a zhodnocení možných nežádoucích lékových účinků při současném podávání.

Experimenty byly prováděny s lidskými jaterními mikrosomy a baktosomy *in vitro*. Ke sledování změn enzymových aktivit příslušných CYP byly použity specifické substráty pro jednotlivé CYP. Vliv studovaných látek na tvorbu příslušných metabolitů byl testován zavedenými metodami kapalinové chromatografie s UV/VIS nebo fluorescenční detekcí.

Z výsledků vyplývá, že všechny testované látky měly vliv na snížení aktivity CYP2C19 v lidských jaterních mikrosomech. V případě BPA-302 byla stanovena hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} $28,86 \pm 12,69 \mu\text{mol/l}$, dále $34,07 \pm 4,91 \mu\text{mol/l}$ u BP-21 a $23,88 \pm 9,02 \mu\text{mol/l}$ u BP-117. Látka BPA-302 dále inhibovala aktivitu CYP2D6 ($IC_{50} = 91,11 \pm 10,8 \mu\text{mol/l}$). Snížení aktivity CYP bylo také zaznamenáno u látky BP-21 na enzym CYP2C9 ($IC_{50} = 129,29 \pm 23,91 \mu\text{mol/l}$). Nejvíce inhibující testovanou látkou byla BP-117, jež snižovala aktivitu CYP2C9 ($IC_{50} = 46,18 \pm 6,58 \mu\text{mol/l}$), CYP2D6 ($IC_{50} = 167,84 \pm 24,99 \mu\text{mol/l}$) a CYP3A4/5 ($IC_{50} = 138,4 \pm 18,87 \mu\text{mol/l}$). Možný výskyt závažných lékových interakcí však byl shledán jako málo pravděpodobný vzhledem k tomu, že účinné hladiny těchto potenciálních léčiv byly v jiné studii stanoveny mnohem nižší (1 nmol/l).

U látky s největším potenciálem pro klinické využití (BPA-302) byl dále studován výskyt jejích potenciálních metabolitů po interakci s CYP. Z výsledků vyplývá, že BPA-302 pravděpodobně podléhá biotransformaci CYP pouze minoritně a nejspíš jen formou oxidace. Případné další způsoby metabolizace nebylo možné z dosažených výsledků potvrdit. Podrobnější studium metabolismu této látky enzymy CYP by přesahovalo obsah této diplomové práce.

8 Seznam literatury

- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58(5-6)**, 737-747.
- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2012): Drug-metabolizing enzymes—An overview. In: *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. 1st ed., (Anzenbacher P., Zanger U. M., eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1-25.
- Baker G.B., Urichuk L.J., McKenna K.F., Kennedy S.H. (1999): Metabolism of monoamine oxidase inhibitors. *Cell. Mol. Neurobiol.* **19(3)**, 411-426.
- Bolwell G.P., Bozak K., Zimmerlin A. (1994): Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37(6)**, 1491-1506.
- Coxon C.R., Anscombe E., Harnor S.J., Martin M.P., Carbain B., Golding B.T., Hardcastle I.R., Harlow L.K., Korolchuk S., Matheson C.J., Newell D.R., Noble M.E.M., Sivaprakasam M., Tudhope S.J., Turner D.M., Wang L.Z., Wedge S.R., Wong C., Griffin R.J., Endicott J.A., Cano C. (2016): Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: Structure–activity relationships and insights into the CDK-2 selectivity of 6-substituted 2-arylamino-purines. *J. Med. Chem.* **60**, 1746-1767.
- Crespi C.L., Chang T.K., Waxman D.J. (1998): Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods. Mol. Biol.* **107**, 129-133.
- Crespi C.L., Chang T.K., Waxman D.J. (1998): CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Methods. Mol. Biol.* **107**, 141-145.
- Degtyarenko K.N., Archakov A.I. (1993): Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett.* **32(1-2)**, 1-8.
- Denisov I.G., Markis T.M., Sligar S.G., Schlichting I. (2005): Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **105(6)**, 2253-2277.
- Evans W.E., Relling M.V. (1999): Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286(5439)**, 487-491.
- Foti R.S., Dalvie D.K. (2016): Cytochrome P450 and non-cytochrome P450 oxidative metabolism: contributions to the pharmacokinetics, safety, and efficacy of xenobiotics. *Drug. Metab. Dispos.* **44(8)**, 1229-1245.

- Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Bazgier V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V. (2013): A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 6234-6247.
- Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V., Kryštof V. (2018): Discovery of N^2 -(4-amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine as a potent FLT3 kinase inhibitor for acute myeloid leukemia with FLT3 mutations. *J. Med. Chem.* **61**, 3855-3869.
- Guengerich F.P. (2012): Cytochromes P450. In: *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. 1st ed., (Anzenbacher P., Zanger U. M., eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 27-66.
- Guengrich F.P., Martin M.V., Beaune P.H., Kremers P., Wolff T., Waxman D.J. (1986): Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **261(11)**, 5051-5060.
- Haider C., Grubinger M., Řezníčková E., Weiss T.S., Rotheneder H., Miklos W., Berger W., Jorda R., Zatloukal M., Gucký T., Strnad M., Kryštof V., Mikulits W. (2013): Novel inhibitors of cyclin-dependent kinases combat hepatocellular carcinoma without inducing chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.* **12(10)**, 1947-1957.
- Hanemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2006): Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1770(3)**, 330-344.
- Hasemann C.A., Kurumbail R.G., Boddupalli S.S., Peterson J.A., Deisenhofer J. (1995): Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure.* **3(1)**, 41-62.
- Hiruma Y., Hass M.A.S., Kikui Y., Liu W.-M., Ölmez B., Skinner S.P., Blok A., Kloosterman A., Koteishi H., Löhr F., Schwalbe H., Nojiri M., Ubbink M. (2013): The Structure of the cytochrome P450cam-putidaredoxin complex determined by paramagnetic NMR spectroscopy and crystallography. *J. Mol. Biol.* **425(22)**, 4353-4365.
- Chang T.K., Waxman D.J. (1998): Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods. Mol. Biol.* **107**, 103-109.

- Chauret N., Gauthier A., Nicoll-Griffith D.A. (1998): Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* **26(1)**, 1-4.
- Jorda R., Hendrychová D., Voller J., Řezníčková E., Gucký T., Kryštof V. (2018): How selective are pharmacological inhibitors of cell-cycle-regulating cyclin-dependent kinases? *J. Med. Chem.* **61**, 9105-9120.
- Kousalová L., Baranová J., Anzenbacher P. (2003): Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klin. Farmakol. Farm.* **17**, 151-157.
- Kronbach T., Mathys D., Umeno M., Gonzalez F.J., Meyer U.A. (1989): Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol. Pharmacol.* **36(1)**, 89-96.
- Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002): Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorgan. Med. Chem.* **12**, 3283-3286.
- Kwapisz D. (2017): Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Res. Treat.* **166**, 41-54.
- Lucas D., Menez J.F., Berthou F. (1996): Chloroxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Methods. Enzymol.* **272**, 115-123.
- Mayer E.L. (2015): Targeting breast cancer with CDK inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* **17(5)**, 20.
- McClue S.J., Stuart I. (2008): Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (*R*-roscovitine) *in vitro* and *in vivo*. *Drug. Metab. Dispos.* **36**, 561-570.
- McGill M.R., Jaeschke H. (2013): Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm. Res.* **30(9)**, 2174-2187.
- McTavish D., Buckley M.M.-T., Heel R.C. (1991): Omeprazole. An updated review of its pharmacology and therapeutic use in acid-related disorders. *Drugs* **42(1)**, 138-170.
- Morse M.A., Lu J. (1998): High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **708(1-2)**, 290-293.
- Nebert D.W., Russell D.W. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* **360(9340)**, 1155-1162.

- Nelson D.R. (2013): A world of cytochrome P450s. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **368(1612)**.
- Nutley B.P., Raynaud F.I., Wilson S.C., Fisher P.M., Hayes A., Goddard P.M., McClue S.J., Jarman M., Lane D.P., Workman P. (2005): Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse. *Mol. Cancer Ther.* **4(1)**, 125-139.
- Omura T., Sato R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* **239(7)**, 2379-2385.
- Pavek P., Dvořák Z. (2008): Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug. Met.* **9**, 129-143.
- Pochapsky T.C., Kazanis S., Dang M. (2010): Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. *Antioxid. Redox. Signal.* **13(8)**, 1273-1296.
- Ramos-Esquivel A., Hernández-Steller H., Savard M.-F., Landaverde D.U. (2018): Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors as first-line treatment for post-menopausal metastatic hormone receptor-positive breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis of phase III randomized clinical trials. *Breast Cancer.* **25**, 479-488.
- Rypka M., Veselý J., Chmela Z., Riegrová D., Červenková K., Havlíček L., Lemr K., Hanuš J., Černý B., Lukeš J., Michalíková K. (2002): *In vitro* biotransformation of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine by mouse liver microsomes. *Xenobiotica.* **32(11)**, 1017-1031.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy.* **93**, 229-237.
- Šiller M., Anzenbacher P., Anzenbacherová E., Doležal K., Popa I., Strnad M. (2009): Interactions of olomoucine II with human liver microsomal cytochromes P450. *Drug. Metab. Dispos.* **37(6)**, 1198-1202.
- Široká J., Čečková M., Urbánek L., Kryštof V., Gucký T., Hofman J., Strnad M., Štaud F. (2018): LC-MS/MS method for determination of cyclin-dependent kinase inhibitors, BP-14 and BP-20, and its application in pharmacokinetic study in rat. *J. Chromatogr. B.* **1089**, 24-32.
- Vanduchová A. (2017): *Interakce léčiv s vybranými nutraceutiky na úrovni metabolismu*. Disertační práce. UP v Olomouci, Česká republika.

Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. (2003): The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell. Prolif.* **36**, 131-149.

Waxman D.J., Chang T.K. (1998): Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods. Mol. Biol.* **107**, 111-116.

Zanger U.M., Schwab M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138(1)**, 103-141.

Cypex CYP2C19 QC Assays: www.cypex.co.uk/2c19info.htm (26.11.2018).

Promega P450-Glo™ Assays Technical Bulletin:

<https://worldwide.promega.com/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/P450%20Glo%20Assays%20Protocol/?fq=p450%20glo-assays> (22.2.2019).