

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav farmakologie



Mgr. Alena Špičáková, DiS.

**INTERAKCE ENZYMŮ METABOLISMU LÉČIV,
ZEJMÉNA CYTOCHROMŮ P450, S BIOLOGICKY
AKTIVNÍMI LÁTKAMI VČ. NUTRACEUTIK**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Olomouc 2019

PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY

Department of Pharmacology



Mgr. Alena Špičáková, DiS.

**INTERACTION OF DRUG METABOLIZING
ENZYMES, ESPECIALLY CYTOCHROMES P450,
WITH BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS
INCL. NUTRACEUTICALS**

THESIS

Supervisor: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Olomouc 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Alena Špičáková, DiS.
Název práce:	Interakce enzymů metabolismu léčiv, zejména cytochromů P450, s biologicky aktivními látkami vč. nutraceutik
Název práce v angličtině:	Interaction of drug metabolizing enzymes, especially cytochromes P450, with biological active compounds, incl. nutraceuticals.
Studijní program:	Lékařská farmakologie
Pracoviště:	Ústav farmakologie
Školitel:	prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.
Rok obhajoby:	2019
Klíčová slova:	cytochromy P450, enzymová inhibice, lékové interakce, nutraceutika, seskviterpeny
Klíčová slova v angličtině:	cytochromes P450, enzyme inhibition, drug-drug interaction, nutraceuticals, sesquiterpenes

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (*LF_2013_007; LF_2015_004; LF_2016_006; LF_2017_012, LF_2018_011; LF_2019_011*), granty GAČR „*Centrum nutraceutik*“, Czech MEYS Project CZ.02.2.69/0.0/0.0/16 a *Národním programem udržitelnosti LO1304*.

Prohlašuji, že jsem uvedenou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Pavla Anzenbachera, DrSc. s využitím odborné literatury a laboratorního zázemí Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Alena Špičáková, DiS.

Jsem seznámena s tím, že tato disertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Alena Špičáková, DiS.

Poděkování

Děkuji svému školiteli panu prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za odborné vedení mojí disertační práce a za odborné a užitečné rady, které mi při plnění zadaného úkolu trpělivě poskytoval. Dále děkuji paní prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za poskytnutí seskviterpenů (β -karyofylenu, β -karyofylen oxidu, α -humulenu, *trans*-nerolidolu, *cis*-nerolidolu a farnesolu) k jejich studiu.

Děkuji také paní Doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za cenné praktické rady, prof. RNDr. Michalovi Otyepkovi, Ph.D. a Mgr. Ing. Václavu Bazgierovi, Ph.D. za jejich pomoc s molekulovým dokováním. Dále děkuji všem členům Ústavu farmakologie za pomoc a podporu při vytváření disertační práce. V neposlední řadě děkuji svým nejbližším za podporu.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Metabolismus xenobiotik	9
2.2 Cytochromy P450.....	11
2.3 Flavinové monooxygenázy	27
2.4 Peroxidázy	28
2.5 Aminoxidázy	28
2.6 Konjugační enzymy	28
2.7 Nutraceutika	32
2.8 Význam studia interakcí doplňků stravy a současně podávaných léčiv.....	37
3. CÍLE PRÁCE.....	44
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení.....	45
4.2 Metody	49
5. VÝSLEDKY	61
5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci	61
5.2 Molekulové modelování interakce s CYP3A4.....	71
6. DISKUZE	75
7. ZÁVĚR	82
8. SOUHRN	84
9. SUMMARY	85
SEZNAM LITERATURY	86
SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	98

SEZNAM ZKRATEK

AhR	aryl hydrokarbonový receptor
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCCPP	Computing Cavities, Channels, Pores and Pockets
cNER	<i>cis</i> -nerolidol
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferázy
CYP	cytochromy P450
FAD	flavin adenin dinukleotid
FAR	farnesol
FMN	flavin mononukleotid
FMO	flavinové monooxygenázy
GST	glutathion- <i>S</i> -transferázy
HUM	α -humulen
KAO	β -karyofylen oxid
KAR	β -karyofylen
K_M	Michealisova konstanta
MAO	monoaminoxidázy
MDZ	midazolam
NADPH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotid fosfátu
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NAT	<i>N</i> -acetyltransferázy
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	PCR pro polymorfismus délky restrikčních fragmentů
PXR	pregnanový X receptor
SULT	sulfotransferázy
tNER	<i>trans</i> -nerolidol
TST	testosteron
UDPGA	uridin-5'-difosfo- α -D-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
V_{max}	maximální rychlost reakce
XL-PCR	long-range PCR

1. ÚVOD

Téměř všechny cizorodé látky neboli xenobiotika (léčiva, konzervanty, barviva, polutanty aj.), složky potravy a/nebo doplňky stravy podléhají po absorpci do organismu metabolické přeměně – biotransformaci. Metabolickým pochodům podléhají v neposlední řadě i látky tělu vlastní – endogenní (např. cholesterol, steroidní hormony nebo žlučové kyseliny). Většinu přeměn zajišťují enzymy, k neenzymatickým přeměnám xenobiotik dochází jen výjimečně. Během těchto reakcí dochází k přeměně méně polární látky na více polární sloučeninu v rámci jedné molekuly, jedná se tedy v prvním kroku o reakce funkcionalizační. Nejvýznamnějšími enzymy první fáze biotransformace xenobiotik jsou cytochromy P450 (CYP), dále flavinové monooxygenázy (FMO), reduktázy, monoaminoxidázy (MAO) atd. Naproti tomu druhá fáze metabolismu zahrnuje reakce konjugační, kdy dochází ke sloučení metabolizované látky s molekulou tělu vlastní, např. s kyselinou glukuronovou, glutathionem, s 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem nebo s acetylkoenzymem A, za vzniku ještě polárnějšího metabolitu. Tyto reakce druhé fáze metabolismu jsou katalyzovány nejčastěji UDP-glukuronosyltransferázami, dále glutathion-S-transferázami, sulfotransferázami nebo N-acetyltransferázami.

Nutraceutika jsou definována jako potraviny (strava nebo doplňky stravy), které kromě základní nutriční hodnoty poskytují také zdravotní přínosy. V dnešní době příjem zdraví prospěšných doplňků stravy a „superpotravin“ (např. červená řepa, borůvky, chia semínka, mladý ječmen, quinoa či kustovnice čínská) se těší stále větší oblibě. Poměrně dobrá dostupnost těchto potravin a volně prodejných přípravků nejen v lékárnách, ale i e-shopech a v obchodních řetězcích nabádá konzumenty k nakupování zdraví prospěšných produktů bez ohledu na možné důsledky. Nadměrné požívání nutraceutik za současného užívání léčiv může vést k lékovým interakcím vedoucím ke snížení terapeutické dávky léčiva (v případě indukce enzymu metabolizujícího dané léčivo) nebo k předávkování pacienta léčivem (v případě inhibice enzymu metabolizujícího dané léčivo) a tím i k závažným nežádoucím účinkům léčiva.

Tato práce je zaměřena na studium možných interakcí vybraných nutraceutik, resp. seskviterpenů – β -karyofylenu a jeho metabolitu β -karyofylen oxidu, α -humulenu, *trans*- a *cis*-nerolidolu a farnesolu, s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450 *in vitro*. V práci je rovněž podán nástin možného mechanismu inhibice enzymové aktivity CYP seskviterpeny pomocí molekulového modelování *in silico*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metabolismus xenobiotik

Všechny živé organismy, včetně člověka, se během svého života setkávají s cizorodými látkami – xenobiotiky (*xenos* – cizí) přírodního (rostlinná barviva, aromatické látky, sopečný prach atd.) nebo syntetického původu (léčiva, kosmetické přípravky, potravinová aditiva, kontaminanty životního prostředí atd.). Řada xenobiotik do organismu vstupuje bez úmyslu člověka, zatímco podání léčiv, příjem potravy anebo užívání doplňků stravy je akcí zcela záměrnou (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Guengerich 2003, Švihovec *et al.* 2018).

Xenobiotika mohou vstupovat do lidského organismu všemi cestami, nejčastěji gastrointestinálním traktem (lipofilní látky), dále dýchacími cestami (těkavé látky a aerosoly) nebo kůží (velmi lipofilní látky). Po absorpci a distribuci xenobiotika v organismu a po případné biotransformaci dochází k jeho exkreci nejčastěji močí a stolicí, ale také potem, dechem a mateřským mlékem. Xenobiotikum může opustit organismus i v nezměněné formě (lithium, gentamicin), většinou však dochází k jeho přeměně (biotransformaci) za vzniku polárnějšího produktu a tím k usnadnění jeho exkrece močí nebo žlučí.

Xenobiotikum může být v průběhu biotransformace biodegradováno (ve většině případů) nebo bioaktivováno. Léčiva, která pro vznik vlastní účinné látky musí být nejprve metabolizována, nazýváme „*prodrug*“ (proléčivo), např. antiagregans – klopidoogrel, antihypertenzivum – enalapril nebo hypolipidemikum – lovastatin. Aktivaci bohužel podléhají i polutanty životního prostředí, nejznámějším příkladem je aktivace polycyklického aromatického uhlovodíku benzo[*a*]pyrenu prostřednictvím CYP1A1/2 a CYP1B1 za vzniku karcinogenního velmi reaktivního epoxidu. Dalším příkladem nežádoucí aktivace může být přeměna alkylačního cytostatika cyklofosfamidu CYP3A4 a CYP2C9 na akrolein způsobující hemoragickou cystitidu a poškození srdce (Suchý *et al.* 2004).

První fází metabolismu xenobiotik rozumíme jednoduché nesyntetické reakce, tzv. funkcionalizační, které dávají vznik polárnějším metabolitům (Anzenbacher & Zanger 2012). Nejčastěji dochází k oxidaci (hydroxylaci, oxidační deaminaci,

dealkylaci, dehalogenaci), redukcii, hydrolýze, hydrataci nebo k izomeraci parentní látky. Nejvýznamnějšími enzymy katalyzující reakce první fáze metabolismu jsou CYP, FMO, reduktázy, MAO, xantinoxidázy/dehydrogenázy, aldehydoxidázy, NADPH oxidázy, NAD(P)H oxidoreduktázy, dihydropyridindehydrogenázy (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Guengerich 2003, Švihovec *et al.* 2018).

Do druhé fáze metabolismu může vstupovat jak polárnější metabolit vytvořený v první fázi metabolismu, tak i nemetabolizované xenobiotikum. Během těchto konjugačních reakcí dochází ke sloučení xenobiotika nebo metabolitu z první fáze s endogenní sloučeninou za vzniku ještě více polárního metabolitu, který je snadněji vyloučen z organismu (močí, stolicí). Nejvýznamnější reakcí druhé fáze metabolismu léčiv je konjugace s kyselinou UDP-glukuronovou katalyzovanou UDP-glukuronosyltransferázami (UGT), dále sulfonace, konjugace s glutathionem, acetylkoenzymem A s aminokyselinami atd. (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Nejvýznamnější reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik.

<u>Konjugační činidlo</u>	<u>Enzymy II. fáze metabolismu</u>
UDP-glukuronová kyselina	UDP-glukuronosyltransferázy
3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát	Sulfotransferázy
Glutathion	Glutathion S-transferázy
Acetylkoenzym A	N-acetyltransferázy
S-adenosylmethionin	Methyltransferázy
Aminokyseliny (glycin, taurin, glutamin)	N-acyltransferázy

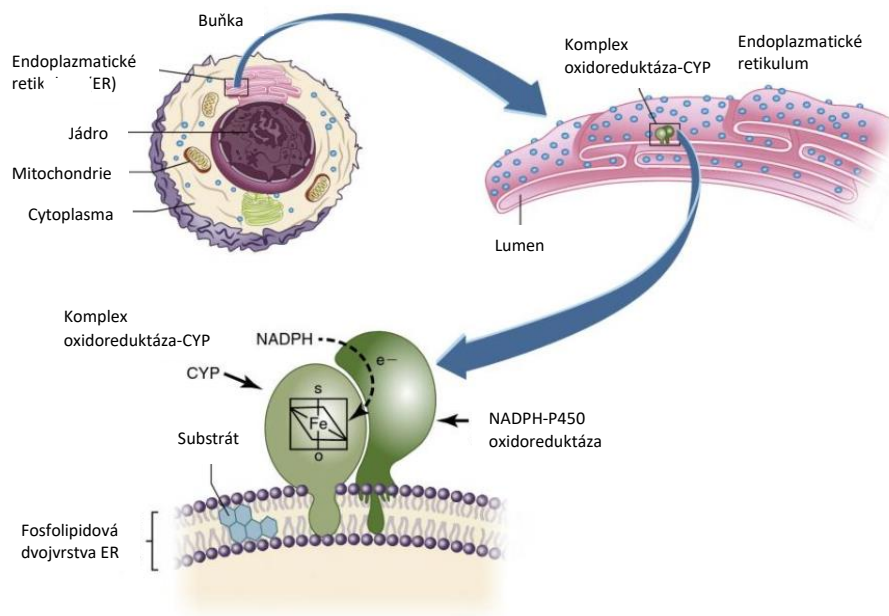
Zda xenobiotikum bude podléhat první fázi metabolismu nebo druhé fázi nebo oběma, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech daného xenobiotika.

2.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) patří k nejvýznamnějším enzymům první fáze metabolismu xenobiotik. Podílejí se na přibližně třech čtvrtinách biotransformačních dějů.

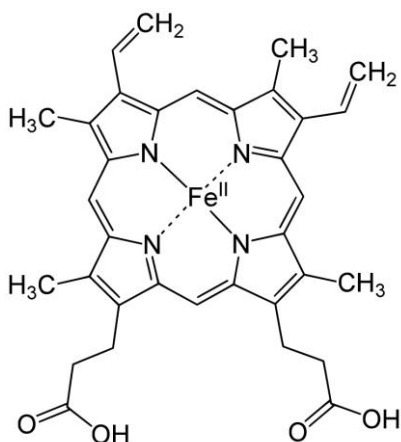
Cytochromy P450 jsou považovány za vývojově velmi staré hemoproteiny. V průběhu 1,5 miliardy let se všechny CYP vyvinuly z jednoho genu archebakterií. Prehistorické mikroorganismy zřejmě využívaly CYP k hydroxylaci organických látek, tedy k získání energie. CYP byly nalezeny téměř ve všech organismech živočišného i rostlinného původu.

Orgánová distribuce CYP u člověka je široká, nejvíce jsou ovšem CYP zastoupeny v nejdůležitějším detoxikačním orgánu lidského těla – v játrech. Hojně se také vyskytují v plicích, ledvinách, tenkém střevě, ale také v mozku, v srdci nebo ve slinivce. Subcelulárně jsou CYP lokalizovány ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány hladkého endoplazmatického retikula (viz obr. 1), buněčných membránách nebo ve vnitřní membráně mitochondrií (Anzenbacher & Zanger 2012, Švihovec *et al.* 2018, Zanger & Schwab 2013).



Obrázek 1: Lokalizace CYP v buňce. CYP jsou zakotveny ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány endoplazmatického retikula. NADPH-cytochrom P450 reduktáza přenáší elektrony na CYP, který může v přítomnosti O_2 oxidovat xenobiotikum (Dowd *et al.* 2017).

CYP se řadí do skupiny hemových enzymů, podobně jako např. peroxidázy nebo katalázy. Jejich prostetickou skupinou je hem b (ferroprotoporfyrin IX, obr. 2); stejný typ hemu nalezneme také u hemoglobinu, myoglobinu nebo cytochromů b.



Obrázek 2: Chemická struktura hemu b.

Pátým ligandem hemového železa v cytochromech P450 je thiolátová síra sulfhydrylové skupiny cysteinu v aktivním centru enzymu. Takové uspořádání způsobuje výjimečné chování těchto hemoproteinů od ostatních hemových enzymů (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti). Šestým ligandem hemového železa je atom kyslíku molekuly vody.

Xenobiotikum je za účasti CYP biotransformováno na polárnější metabolit nejčastěji cestou oxidace (hydroxylace), jak je zjednodušeně vyjádřeno rovnicí (schéma 1). Zvláštní schopností CYP je aktivace molekulárního kyslíku prostřednictvím elektronové hustoty získané z anionického atomu síry cysteinového zbytku. Molekulární kyslík obohacený elektronovou hustotou se rozdělí na dva atomy, jeden kyslík z aktivované molekuly O_2 je vnesen do molekuly xenobiotika za vzniku hydroxylovaného produktu. Z druhého kyslíku vzniká molekula vody. Proto je většina reakcí katalyzovaných CYP hydroxylace nebo monooxygenace.

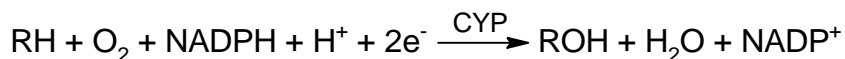
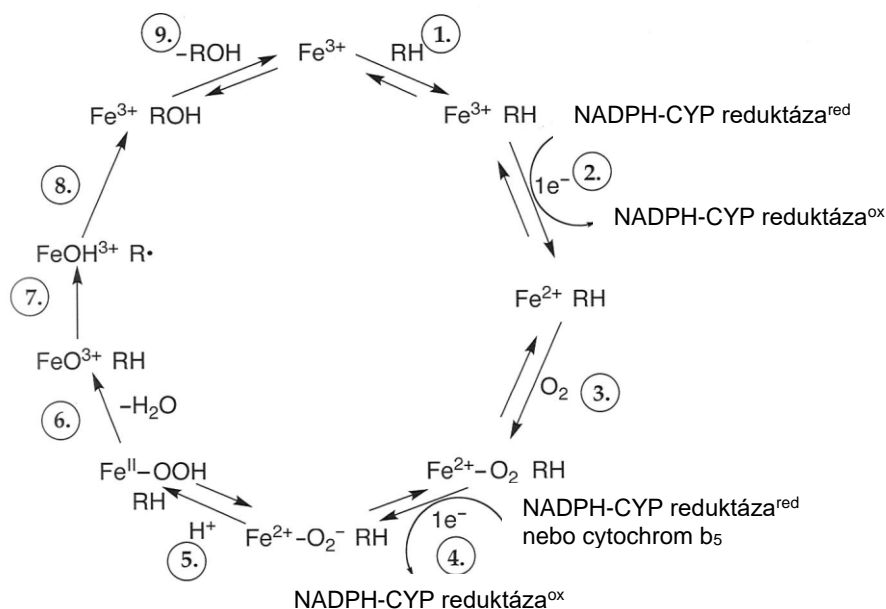


Schéma 1: Obecná reakce katalyzovaná CYP.

Katalytický cyklus CYP je složitý vícekrokový systém na sebe navazujících reakcí (obr. 3). V prvním kroku vstupuje substrát – xenobiotikum, které je navázáno

do aktivního místa CYP (1.). Hemové železo je redukováno (2.) elektronem z NADPH:cytochrom P450 reductázy za účasti FAD a FMN. V dalším kroku váže redukované hemové železo (Fe^{2+}) molekulární kyslík (3.). Na komplex $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ se přenáší druhý elektron cytochromem b_5 nebo NADPH:cytochrom P450 reductázou (4.).



Obrázek 3: Schématické znázornění katalytického cyklu CYP (Guengerich 2012).

Dále dochází k protonaci komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^-$ (5.) a k hydrolytickému štěpení vazby O-O za tvorby formálního komplexu FeO^{3+} (6.). Přesnější popis elektronového rozložení však představuje Fe^{4+}O . Dále dochází k oddělení vodíku a vzniku radikálu (7.), homolytickým štěpením vazby Fe-O se uvolní kyslík, který se váže na radikál za vzniku konečného hydroxylovaného produktu (8.). V posledním kroku je produkt uvolněn z vazby na CYP (9.) a tím se CYP navrácí do svého původního (Fe^{3+}) stavu (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Groves 2005).

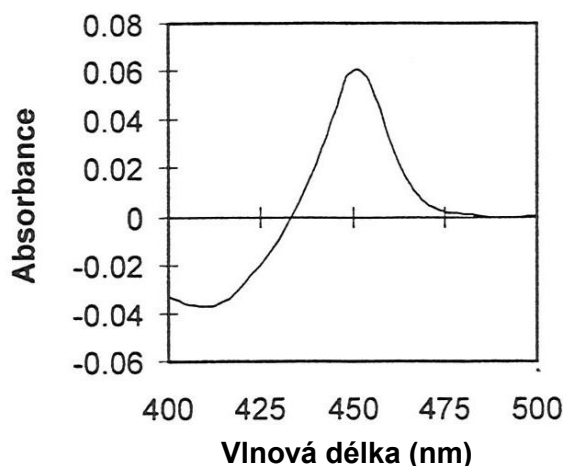
Kromě hydroxylace a monooxygenace se CYP účastní i jiných biotransformačních reakcí – např. sulfoxidace, *N*-oxidace, dehalogenace, oxidace až do stupně karboxylových kyselin, epoxidace na dvojně vazbě, *N*-dealkylace, oxidační deaminace (Anzenbacher & Zanger 2012, Švihovec *et al.* 2018)

Ke studiu metabolismu xenobiotik se standardně využívá jaterní mikrosomální systém CYP, tzv. mikrosomy. Přípravují se z jaterních buněk diferenciací centrifugací a rozbitím endoplazmatického retikula a opět spojením jeho úlomků v malé váčky o velikosti $\sim 0,3 \mu\text{m}$. Tyto mikrosomy si zachovávají schopnost metabolizovat

xenobiotika i díky obsahu dalších proteinů podílejících se na jejich metabolismu. Pro komplexnější studium metabolismu xenobiotik se s výhodou využívají i kultivované hepatocyty, jaterní řezy nebo jaterní buněčné linie (Švihovec *et al.* 2018).

2.2.1 Nomenklatura

Jak vznikl název cytochrom P450? Cytochromy jsou obecně enzymy, které ve své struktuře obsahují hem (obr. 2). Spojení P450 vzniklo na základě spektrálních vlastností enzymu. Písmeno „P“ označuje, že se jedná o *pigment*. Redukovaná forma enzymu (Fe^{2+}) tvoří typický komplex s oxidem uhelnatým, který vykazuje v oblasti Soretova pásu spektra absorpční maximum při 450 nm (obr. 4), odtud číslovka 450 (Omura & Sato 1964). Ke zdůraznění této charakteristické vlastnosti se využívá diferenčního uspořádání (kdy se ve dvojpaprskovém přístroji umístí do vzorkové kyvety vzorek obsahující komplex Fe^{2+} -CO a do srovnávací kyvety vzorek obsahující pouze Fe^{2+} bez CO), které se s výhodou používá i pro stanovení molární koncentrace CYP. Neaktivní, denaturovaná forma enzymu dosahuje maxima v oblasti Soretova pásu okolo 420 nm, obdobně jako většina ostatních hemoproteinů (Anzenbacher & Zanger 2012, Schenkman & Jansson 2006).

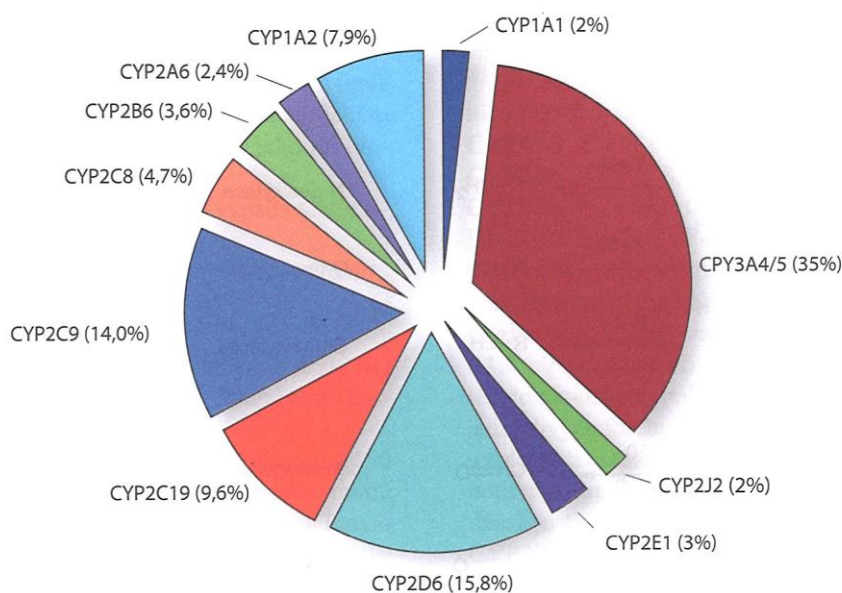


Obrázek 4: Diferenční spektrum komplexu redukovaného cytochromu P450 a oxidu uhelnatého (Schenkman & Jansson 2006) vzniklé odečtením spektra redukované formy od spektra komplexu redukované formy s navázaným CO.

CYP se vyskytují v různých formách (dříve nazývaných jako isoformy nebo isozymy), které jsou zařazeny do rodin a podrodin. Pro správnou orientaci mezi CYP bylo

zavedeno systematické názvosloví, které formu cytochromu P450 označuje jako CYP (CYtochrom P450). Rodiny cytochromů P450 jsou označovány zkratkou CYP a arabskou číslicí (např. CYP1, CYP2), do stejné rodiny náleží CYP, které mají shodnou primární strukturu z více než nebo alespoň ze 40 %. Velká písmena označují jednotlivé podrodiny (např. CYP1A, CYP2C), do stejné podrodiny se řadí CYP se shodnou primární strukturou z více než nebo alespoň z 55 %. Poslední číslo označuje individuální CYP (např. CYP1A2, CYP2C9), který by se měl od ostatních lišit alespoň o 3 % aminokyselinové sekvence (Stiborová *et al.* 1999, Nelson *et al.* 1996, Anzenbacher & Zanger 2012).

V lidském genomu bylo identifikováno 57 forem CYP. Určité formy CYP (např. CYP4, CYP7, CYP24) se podílejí na biosyntéze a metabolismu endogenních látek (cholesterolu, steroidních hormonů, vitaminů rozpustných v tucích, mastných a žlučových kyselin), jiné se účastní metabolismu xenobiotik (CYP1, CYP2, CYP3, CYP4). CYP, které se nejvyšší měrou podílejí na biosyntéze a metabolismu xenobiotik, je téměř dvacet – CYP1A1/2, CYP1B1, CYP2A6/7/13, CYP2B6, CYP2C8/9/18/19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP3A4/5/7 a CYP4F2 (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Guengerich 2005).



Obrázek 5: Relativní důležitost jednotlivých CYP na metabolismu léčiv (podle Guengerich 2005, Zanger & Schwab 2013).

2.2.2 CYP1A1/2

Podrodina CYP1A zahrnuje dva zástupce, a to CYP1A1 a CYP1A2, ty mají asi ze 70 % shodnou aminokyselinovou sekvenci. Ačkoliv zaujímají přibližně 10 % z celkových CYP, oba CYP1A jsou vysoce inducibilní. Genová exprese CYP1A je regulována přes aryl hydrokarbonový receptor (AhR). Induktory jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH; např. 3-methylcholantren, benzo[a]pyren), složky cigaretového kouře, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, β -naftoflavon, dokonce i léčiva omeprazol a fenobarbital (Belic *et al.* 2013).

CYP1A1 je především extrahepatálním enzymem, vyskytuje se v plicích, střevě, kůži, v lymfocytech, placentě a mozku; v játrech je významněji exprimován po indukci. Účastní se zejména metabolismu a aktivace PAH, je typickou benzo[a]pyren hydroxylázou (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Ioannides 2008, Anzenbacher & Zanger 2012).

CYP1A2 je naopak primárně exprimován v játrech, jeho substráty jsou také aromatické aminy. Oba enzymy se účastní aktivace kontaminanty životního prostředí, zejména prekarcinogenů (PAH, polychlorovaných bifenyly, heterocyklických aromatických aminů), které mohou být biotransformovány na genotoxické látky. Např. kofein, léčiva *R*-warfarin, paracetamol, theofylin, omeprazol, olanzapin, klozapin, tricyklická antidepresiva, propranolol, zolpidem jsou dalšími substráty enzymů této podrodiny (Zanger & Schwab 2013, Guengerich 2005). Endogenními substráty CYP1A2 jsou zejména 17 β -estradiol, uroporfyrinogen, bilirubin a melatonin (Ioannides 2008). U pacientů se sníženou jaterní funkcí, cholestázou nebo se zvýšeným C-reaktivním proteinem byla pozorována snížená funkce a exprese CYP1A2 (Klein *et al.* 2010).

Prototypickými substráty CYP1A užívanými pro studium metabolismu xenobiotik *in vitro* jsou nejčastěji 7-ethoxyresorufin (*O*-deethylace), kofein (3-demethylace) a pro CYP1A2 charakteristická *O*-deethylace fenacetinu (Zhou *et al.* 2010). Typickými inhibitory CYP1A2 jsou např. furafyllin, fuvoxamin, 7,8-benzoflavon (Guengerich 2005, Anzenbacher & Zanger 2012). Spíše než lékové interakce způsobené inhibicí CYP1A, je závažnější aktivace prokarcinogenů těmito enzymy. Např. kyselina aristolochová přítomná v podražci (*Aristolochia championii*),

který se hojně užívá v tradiční čínské medicíně, může způsobit nefropatii, hepatocelulární karcinom, karcinom horních močových cest nebo nádory močového měchýře (Han *et al.* 2019). Deriváty této kyseliny vykazují cytotoxicitu vůči některým nádorovým liniím (Stiborová *et al.* 2017, Wang *et al.* 2017).

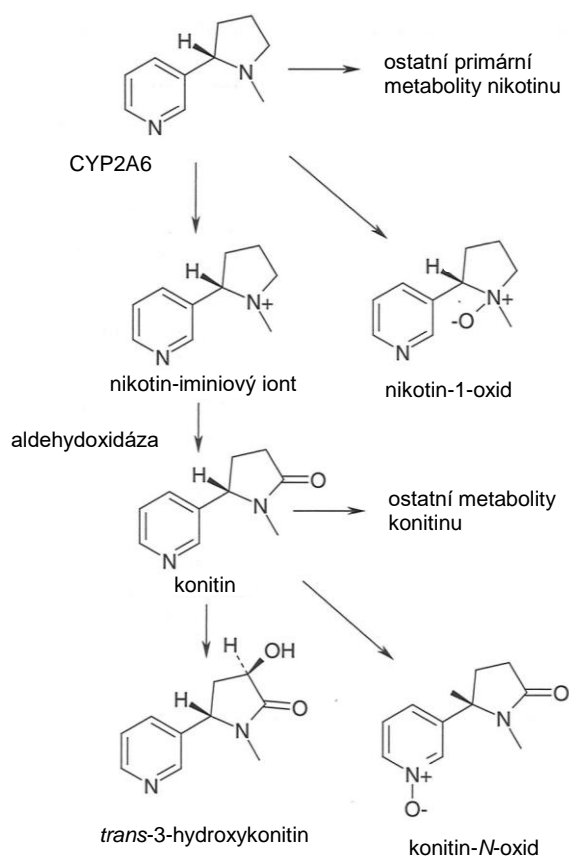
2.2.3 CYP1B1

Jediným zástupcem podrodiny CYP1B je CYP1B1, s CYP1A je homologní asi ze 40 %. U člověka byl izolován z linie keratinocytů, v nízkých hladinách je exprimován ve zdravých extrahepatálních tkáních, vysokých hladin dosahuje v nádorových tkáních, zejména v benigních nádorech prsu a dělohy. Substráty CYP1B1 jsou PAH, aromatické aminy a řada steroidních hormonů včetně 17 β -estradiolu (4-hydroxylace). Modelovou reakcí je také *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Specifickými inhibitory CYP1B1 jsou α -naftoflavon, 7,8-benzoflavon a 2-ethynylpyren, nekompetitivním inhibitorem se zdá být polyfenol resveratrol přítomný v červeném hroznovém víně. Z klinického hlediska je významná, podobně jako u CYP1A, aktivace prokarcinogenů tímto enzymem (Guengerich 2005, Anzenbacher & Zanger 2012, Ioannides 2008).

2.2.4 CYP2A6

Tento CYP je zejména hepatálním enzymem se zastoupením asi 4 %. Je exprimován také v ledvinách, nosohltanu nebo dýchacích cestách. Nejvýznamnějším substrátem CYP2A6 je nikotin, který je C-oxidován na neaktivní konitin (viz obr. 6) (Guengerich 2005).

Prototypickou reakcí CYP2A6 je 7-hydroxylace kumarinu. Pro studium metabolismu *in vivo* může být použit jako substrát kofein, kdy je sledována konverze 1,7-dimethylxantinu na kyselinu 1,7-dimethylmočovou. Dalšími významnými substráty CYP2A6 jsou methoxyfluran, halotan, losigamon, kyselina valproová, letrozol, disulfiram, tegafur, doxifluridin a (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-on hydrochlorid (SM-12502) (Nunoya *et al.* 1996).



Obrázek 6: Hlavní cesta metabolismu nikotinu u člověka. CYP2A6 je hlavním enzymem katalyzujícím oxidaci nikotinu na nikotin-iminiový iont, který je dále oxidován na konitin (Ioannides 2008).

CYP2A6 je indukovaný rifampicinem nebo fenobarbitalem, typickými inhibitory jsou methoxsalen, pilokarpin, mentol, naftalenové a nikotinové deriváty nebo grapefruitový džus (Ioannides 2008). Genový polymorfismus zahrnuje varianty s nízkou katalytickou aktivitou (*2), s úplnou ztrátou katalytické aktivity (*12), ale také s delecí genu (*4). Nízká aktivita CYP2A6 je spojována s nižším rizikem vzniku rakoviny plic u kuřáků (Guengerich 2005, Murphy 2017).

2.2.5 CYP2B6

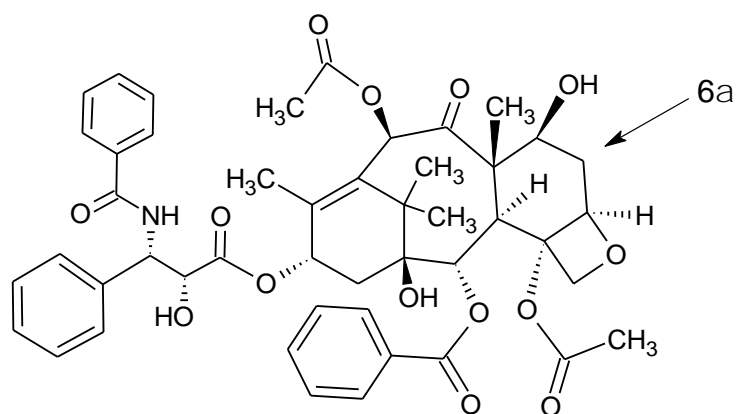
CYP2B6 je primárně exprimován v játrech (0,3 %), vyskytuje se také v mozku, ledvinách, srdci, placentě a dýchacích cestách. Substráty CYP2B6 je řada látek zahrnující léčiva, polutanty životního prostředí i endogenní látky, zejména steroidy.

Nejvýznamnějšími substráty CYP2B6 z oblasti léčiv jsou cyklofosamid, pethidin, ketamin, propofol, bupropion, efavirenz a selegilin. Za prototypickou reakci pro studium metabolismu léčiv *in vitro* se považuje nejen 4-hydroxylace bupropionu a *O*-deethylace 7-ethoxy-4-trifluoromethylkumarinu, ale také *O*-deethylace 7-ethoxykumarinu, *O*-debenzylace benzyloxyresorufinu a *O*-depenzylace pentoxyresorufinu (Guengerich 2005, Ioannides 2008, Zanger & Schwab 2013). Tiklopidin, bifonazol, thiotepa, klopidogrel, klotrimazol, itrakonazol, sertralin, raloxifen a 17- α -ethinylestradiol jsou známými inhibitory tohoto enzymu. CYP2B6 je velmi inducibilní, vykazuje až 300násobnou indukovatelnost. Nejvýznamnějšími induktory jsou např. karbamazepin, cyklofosamid, dexamethason, efavirenz, fenobarbital, fenytoin, primidon, rifampicin, tamoxifen anebo vigabatrin. CYP2B6 je překvapivě nejvíce polymorfní, některé varianty mohou vést ke zvýšení enzymatické aktivity, řada variant však kóduje defektní gen. Tento fakt může souviset např. se zpomaleným metabolismem léčiva proti HIV efavirenu. CYP2B6 je také schopen aktivovat aflatoxin B₁ na vysoce karcinogenní látku (Ioannides 2008).

2.2.6 CYP2C8

Tento enzym je exprimovaný zejména v játrech (6-7 % z CYP) a v ledvinách, také se vyskytuje v pohlavních žlázách, mozku, děloze, prsu, vaječnicích a duodenu. CYP2C8 je polymorfní (byla popsána např. pomalejší konverze antimalarika amodiachinu u *2) a je inducibilní např. cyklofosamidem, dexametazonem, rifampicinem, barbituráty a i statiny, např. atorvastatinem (Gerbal-Chaloin *et al.* 2001, Guengerich 2005, Zanger & Schwab 2013). Z hlediska metabolismu léčiv je významná biotransformace cytostatika paklitaxelu (taxolu; obr. 7) za vzniku 6 α -hydroxy metabolitu. Tuto typickou reakci lze

využít pro studium metabolismu *in vitro* (Ioannides 2008, Rahman *et al.* 1994). Taxol se uplatňuje nejčastěji k léčbě karcinomu prsu, vaječnicků, děložního čípku a u bronchiálních karcinomů. Obvykle se kombinuje s dalšími cytostatiky, např. s cisplatinou (Tsuda *et al.* 2016).



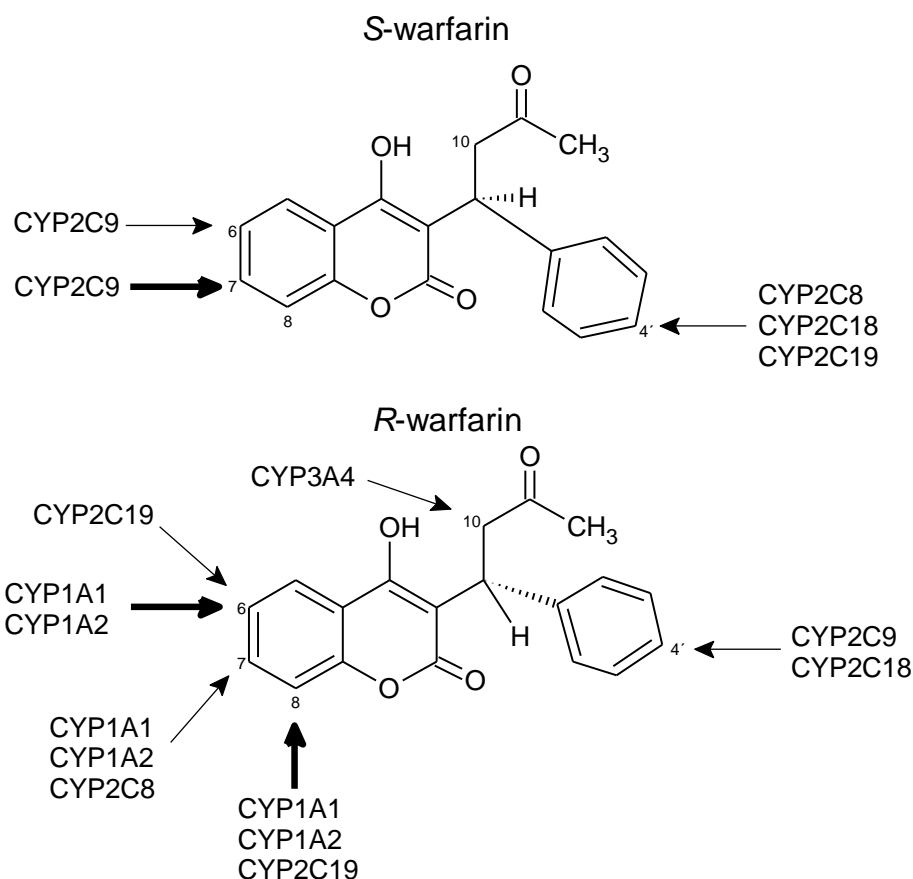
Obrázek 7: Chemická struktura taxolu s naznačenou pozicí 6 α -hydroxylace (podle Ioannides 2008).

Dalšími významnými substráty z oblasti léčiv jsou např. troglitazon, verapamil, rosiglitazon, cerivastatin, amiodaron, dapson, loperamid, ale také cytostatiky působící přirozený metabolit retinolu kyselina *all-trans* retinová. Na rozdíl od CYP2C9 není sulfafenazol silným inhibítozem enzymové aktivity CYP2C8, ale jsou jimi spíše gemfibrozil, kvercetin, montelukast a trimethoprim. Právě inhibice katalytické aktivity CYP2C8 gemfibrozilem může vést až k rhabdomyolýze (Backman *et al.* 2016, Guengerich 2005, Ioannides 2008, Zanger & Schwab 2013).

2.2.7 CYP2C9

CYP2C9 je jedním z farmakologicky nejvýznamnějších CYP a také jedním z nejvíce exprimovaných CYP v játrech. Účastní se metabolismu řady léčiv (např. fenytoin, kyselina valproová, losartan, tolbutamid, ibuprofen, amitriptylin), zejména antikoagulantů warfarinu (Ioannides 2008). Biotransformace warfarinu

prostřednictvím CYP je složitý proces za účasti několika forem CYP (CYP3A4, CYP1A1/2, 2C8/18/19) a 7-hydroxylace *S*-warfarinu CYP2C9 je jen jednou z několika cest (Kaminsky & Zhang 1997). Nesteroidní antirevmatikum diklofenak je prototypickým substrátem tohoto enzymu a standardně se užívá ke studiu metabolismu *in vitro*. Specifickým inhibítorem reakcí CYP2C9 je sulfafenazol, aktivitu CYP2C9 může také ovlivňovat amiodaron nebo flukonazol. Barbituráty a rifampicin jsou schopny indukovat expresi CYP2C9, navíc je tento enzym polymorfní, čímž může docházet k mnoha lékovým interakcím. Tzv. pomalí metabolizátoři, se sníženou katalytickou aktivitou enzymu, jsou nositeli alel *2 a *3. Tato fakta mohou mít velký dopad při antikoagulační léčbě warfarinem a způsobovat tak krvácivé stavy pacientů nebo naopak léčba warfarinem nemusí být dostatečně účinná (Van Booven *et al.* 2009).



Obrázek 8: Chemická struktura *R*- a *S*-enantiomerů warfarinu a pozice hydroxylace warfarinu metabolizovaných lidskými CYP, šipky silnou čarou naznačují majoritní cestu metabolismu, šipky tenkou čarou minoritní cestu (podle Kaminsky & Zhang 1997).

2.2.8 CYP2C19

CYP2C19 se účastní metabolismu léčiv asi z 10 %. 4-hydroxylace *S*-mefenytinu, reakce typického substrátu, byla cestou pro odhalení genetického polymorfismu – pomalých (alely *2 až *8) a extensivních (alela *17) metabolizátorů. Tento polymorfismus také souvisí s rychlostí metabolismu inhibitoru protonové pumpy – omeprazolem, resp. *S*-omeprazolem, nebo s aktivací antikoagulancia klopidogrelu na jeho účinný 2-oxo metabolit. Dalšími substráty CYP2C19 jsou např. amitriptylin, imipramin, citalopram, moklobemid, *R*-warfarin, diazepam, lansoprazol a ranitin, z endogenních látek např. melatonin a progesteron. Obdobně jako ostatní členové podrodiny CYP2C podléhá indukci např. kyselinou acetylsalicylovou, barbituráty, karbamazepinem, dexamethasonem, rifampicinem nebo třezalkou tečkovanou (*Hypericum perforatum*). Vzhledem k 95% homologii s CYP2C9 je řada inhibitorů CYP2C19 totožná (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Anzenbacher & Zanger 2012, Zanger & Schwab 2013).

2.2.9 CYP2D6

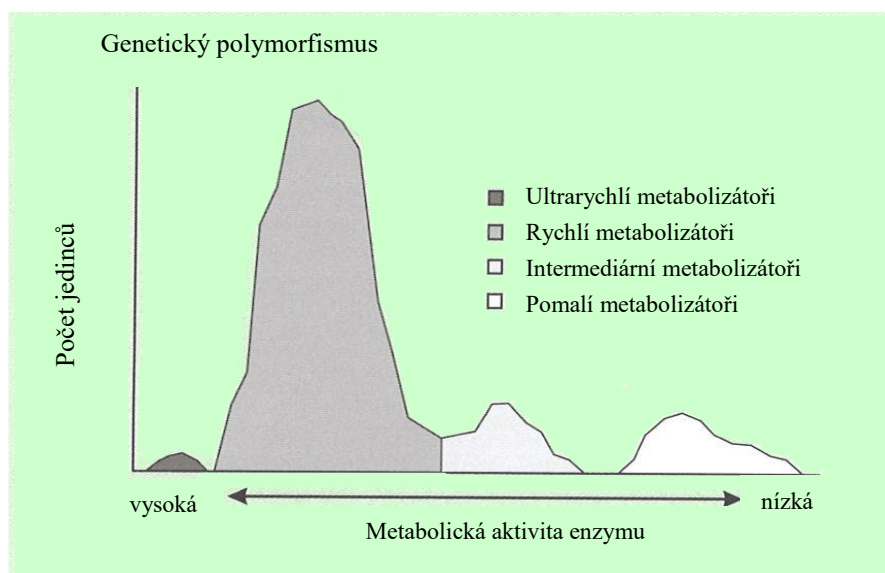
Tento CYP je jeden z nejdůležitějších enzymů metabolismu léčiv, účastní se metabolismu přibližně 25 % léčiv metabolizovaných CYP. Jedná se zejména o antiarytmika (např. propafenon), β -blokátory (např. bufuralol, metoprolol), antidepressiva (např. amitriptylin, citalopram), antipsychotika (např. risperidon, haloperidol), dále také kodein, tamoxifen, duloxetin, ondasetron atd. (Zanger & Schwab 2013, Ioannides 2008). CYP2D6 je exprimován především v játrech a tvoří přibližně 5 % z celkových CYP. V nízkých hladinách se vyskytuje také v plicích a v mozku (Guengerich 2005).

CYP2D6 není pravděpodobně inducibilní, zato vykazuje zatím nejvýraznější poznaný genetický polymorfismus ze všech CYP. Populaci lze podle fenotypu a rychlosti metabolismu rozdělit do 4 skupin – pomalí (PM), intermediární (IM), rychlí (extensivní; EM) a ultra-rychlí metabolizátoři. Většina jedinců (kavkazské) populace (asi 65-80 %) patří k rychlým metabolizátorům, u nichž probíhá metabolismus předpokládanou cestou. U 5-10 % jedinců, PM, probíhá zpomalené odbourávání látek metabolizovaných

CYP2D6, např. *O*-demethylace tramadolu, *N*-demethylace loperamidu (Kadiev *et al.* 2008) nebo nemusí docházet k dostatečné aktivaci proléčiva, např. *O*-demethylaci kodeinu na morfin (Stamer & Stüber 2007) a tito jsou tedy ohroženi vyšším výskytem nežádoucích účinků. Naopak u jedinců ze skupiny UM (5-10 %) může docházet k intenzivnějšímu metabolismu, rychlejšímu odbourávání léčiva a tím k nedosažení terapeutického efektu, např. u antidepresiv (Kirchheiner *et al.* 2004), ale také ke vzniku nežádoucích účinků, např. depresi dechu u opioidů (Kadiev *et al.* 2008, Zanger *et al.* 2008, Žourková *et al.* 2006).

V klinické praxi se využívá stanovení fenotypu pomocí dextromethorfanu jako substrátu *in vivo*, kdy se sleduje poměr dextromethorfanu a jeho metabolitu. Lze také stanovit genotyp pomocí tzv. „long-range PCR“ (XL-PCR) a PCR pro polymorfismus délky restričních fragmentů (PCR-RFLP) (Gaedigk *et al.* 2008, Gaedigk *et al.* 2017).

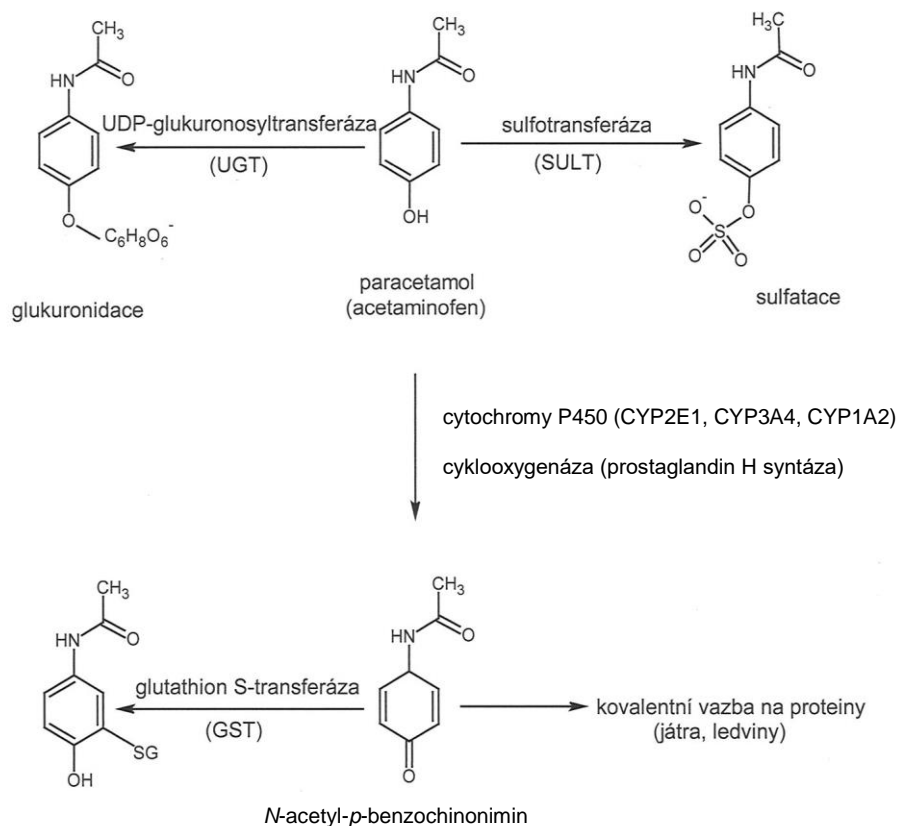
Vzhledem k tomu, že CYP2D6 není zřejmě inducibilní, klinicky významné nežádoucí účinky plynou z genového polymorfismu nebo inhibice katalytické aktivity CYP2D6. Nejznámějším inhibátorem aktivity CYP2D6 je chinidin, ale také bupropion, fluoxetin haloperidol, metadon (Zanger & Schwab 2013), amiodaron a jeho metabolity (McDonald *et al.* 2015).



Obrázek 9: Relativní počet jedinců s různou rychlostí metabolismu léčiv v důsledku genového polymorfismu (Martínková *et al.* 2018).

2.2.10 CYP2E1

Jediným zástupcem podrodiny CYP2E je hepatální CYP2E1, vyskytuje se také v ledvinách, mozku, nosní sliznici, jícnu, tenkém střevě, kostní dřeni a lymfocytech. Jeho procentuální podíl na účasti metabolismu léčiv je sice malý (asi 2-3 %), ale neméně významný. Podílí se totiž na biotransformaci nízkomolekulárních organických sloučenin, zejména alkoholu, organických rozpouštědel (aceton, diethylether, glycerol, isopropanol, butanol, acetonitril), aromatických látek (benzen, fenol, nitrofenol, pyridin, anilin) a halogenovaných uhlovodíků (tetrachlormethan, chloroform, vinylchlorid), jejichž metabolity mohou způsobovat hepatotoxicitu. Mezi významné substráty patří také halogenová anestetika, paracetamol a kofein. Jako specifické markerové substráty se užívají *p*-nitrofenol a myorelaxans chlorzoxazon. Indukci CYP2E1 způsobuje abúzus alkoholu a acetonu, isoniazid, pyrazol, ale také hladovění. Užívání paracetamolu po abúzu alkoholu se zásadně nedoporučuje právě z důvodu indukce aktivity CYP2E1 a tím spojenou tvorbou hepatotoxických aduktů; viz obr. 10 (Gonzales 2007, Guengerich 2005, Ioannides 2008, Zanger & Schwab 2013).



Obrázek 10: Schéma biotransformace paracetamolu včetně vzniku hepatotoxického *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu (Švihovec *et al.* 2018).

Biotransformace paracetamolu (acetaminofenu) asi z 10 % probíhá směrem k polární reaktivní sloučenině *N*-acetyl-*p*-benzochinoniminu (NAPQI; obr. 10), která je schopná se pevně, kovalentně vázat na proteiny jater a působit tak hepatotoxičky. Zejména u stavů s nedostatkem glutathionu nebo i po abúzu alkoholu v kombinaci s paracetamolem může docházet k projevům toxicity. Doporučená denní dávka je proto u dospělého jedince maximálně 3 g. U dětí je doporučená denní dávka paracetamolu závislá na věku a hmotnosti dítěte. Účinným antidotem při předávkování paracetamolem je prekurzor glutathionu *N*-acetylcystein (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001, Švihovec *et al.* 2018).

Specifickým inhibítorem CYP2E1 je diethyldithiokarbamát, aktivitu tohoto enzymu lze také inhibovat disulfiramem, 4-methylpyrazolem, diallylsulfidem obsaženým v česneku a cibuli a látkami obsaženými v brukvovité zelenině (hlávkové a pekingské zelí, hlávková a růžičková kapusta, květák, brokolice, kedlubna nebo romanesco). Aktivace prokarcinogenů i genový polymorfismus CYP2E1 bývají spojovány se zvýšenou přítomností alkoholové cirhózy jater, nádorů jícnu a plic (Gonzales 2007, Guengerich 2005, Ioannides 2008, Zanger & Schwab 2013).

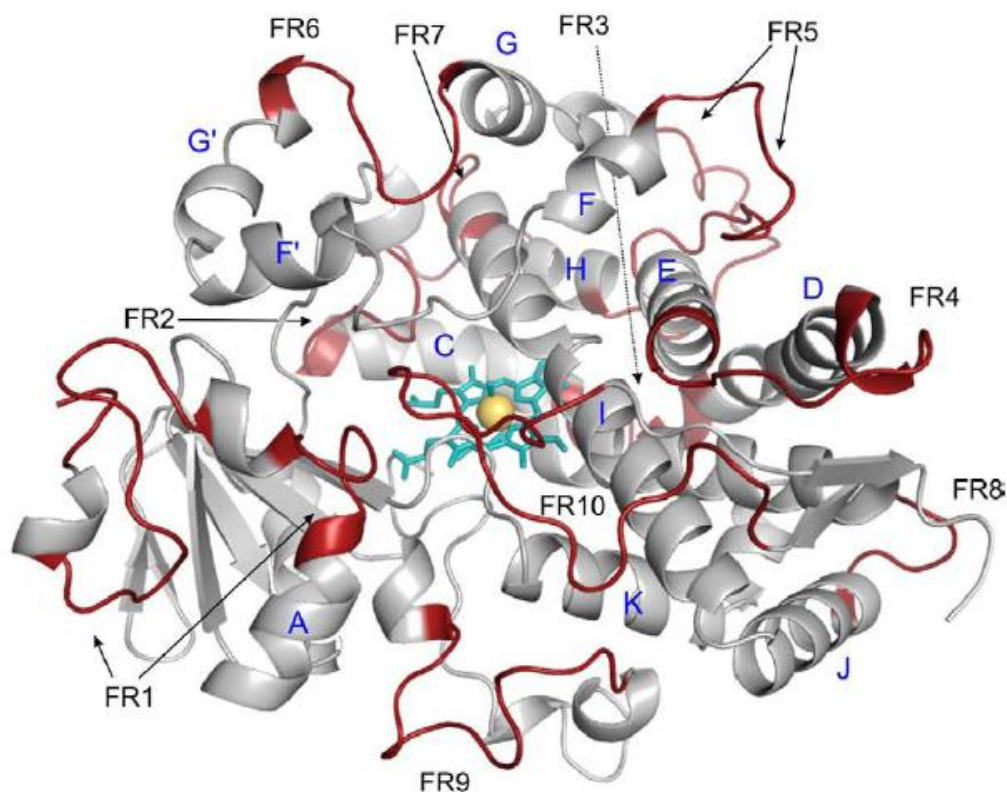
2.2.11 CYP3A4/5

Nejvýznamnějšími enzymy metabolismu léčiv jsou bezesporu enzymy náležící do podrodiny CYP3A. Hlavními zástupci jsou CYP3A4 a CYP3A5, které mají z více než 85 % podobnou aminokyselinovou sekvenci, jejich substrátová specifita se značně překrývá, ovšem z hlediska významnosti je středem zájmu CYP3A4.

CYP3A4 se vyskytuje především v játrech, je také extrahepatálním enzymem, nalezneme jej např. v tenkém a tlustém střevě, v ledvinách, placentě, plicích a mozku.

CYP3A4 se díky plastickému aktivnímu místu účastní metabolismu více než 50 % léčiv podávaných v humánní medicíně. Z tohoto závratného množství sloučenin lze jmenovat např. statiny (simvastatin), finasterid, cyklosporin, indinavir a sildenafil, z endogenních látek např. cholesterol, kortizol, žlučové kyseliny, estradiol a progesteron. Aktivní místo CYP3A4 je nejen plastické a flexibilní (Anzenbacherová *et al.* 2000,

Hendrychová *et al.* 2011), ale také přístupné substrátům (Ekroos & Sjögren 2006). Pomocí softwarů CAVER (Petřek *et al.* 2006), MOLE (Petřek *et al.* 2007) a nejnověji CCCPP (Computing Cavities, Channels, Pores and Pockets; Benkaidali *et al.* 2019) byly nalezeny přístupové kanály ve struktuře CYP3A4, z nichž dva jsou hlavní.



Obrázek 11: Molekula CYP3A4. V simulacích molekulového modelování bylo identifikováno deset flexibilních oblastí (FR1 - FR10), které jsou znázorněny červeně, helixy jsou označeny modrými písmeny. Tyrkysově je zobrazen hem s oranžově zbarveným atomem železa (Hendrychová *et al.* 2011).

Pro stanovení enzymové aktivity CYP3A4 *in vitro* se užívá řada specifických substrátů, jakými jsou např. testosteron, midazolam, nifedipin, erytromycin a lidokain. CYP3A4 je ale také schopen aktivace karcinogenů, např. aflatoxin B₁ za tvorby vysoce mutagenních epoxidů, které jsou dalšími ději kovalentně vázány na báze DNA a tvoří typické adukty (Guengerich *et al.* 1998). Celá podrodina CYP3A je indukovatelná dexamethasonem a rifampicinem; zajímavá je rovněž indukce aktivity CYP3A4 (Moore *et al.* 2000) třezalkou tečkovanou (*Hypericum perforatum*). Inhibice aktivity CYP3A4 může vést k závažným lékovým interakcím. Z těchto inhibitorů, obdobně jako substrátů,

je celá řada, za zmínku stojí např. troleandomycin, erythromycin, ketokonazol, makrolidy a antivirotika. Z přírodních látek lze uvést např. furanokumariny přítomné v grapefruitovém džusu nebo kavapyrony obsažené v pepřovníku opojném (*Kava kava*) (Fujita 2004, He *et al.* 1998, Mathews *et al.* 2002).

2.3 Flavinové monooxygenázy

Další významné enzymy účastníci se metabolismu xenobiotik, FMO, jsou lokalizovány v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů. Substráty těchto biotransformačních enzymů jsou zejména sloučeniny obsahující ve své molekule nukleofilní heteroatom (dusík, síru, fosfor) nebo některé anorganické ionty (HS^- , I^- , CNS^-). Na rozdíl od CYP, také monooxygenáz, dochází k navázání substrátu k FMO pouze v jediném kroku reakce a také koenzym NADP^+ je přímo navázán na enzym během celého katalytického cyklu (Anzenbacher & Zanger 2012).

Humánních FMO existuje pět forem, avšak v hepatocytech je nejvíce zastoupena forma FMO3. Substráty mohou být např. nikotin, thiobenzamid, efedrin, amfetamin, *N*-methylamfetamin, klozapin, dapson, moklobemid, olanzapin, tamoxifen atd. Zajímavostí je, že metabolizace terciálních aminů je cestou detoxikace, ovšem *N*-hydroxylované metabolity primárních a sekundárních aminů mohou mít toxický efekt (Phillips & Shephard 2017, Phillips & Shephard 2019).

Míra *N*-oxidace endogenního trimethylaminu může být indikátorem zdravotního stavu člověka. Zvýšená hladina trimethylamin-*N*-oxidu je spojována s kardiovaskulárními onemocněními, nemocemi ledvin, neurologickými poruchami a dokonce i rizikem vzniku rakoviny (Chhibber-Goel *et al.* 2017).

FMO nejsou na rozdíl od CYP indukovatelné, interindividuální rozdíly jsou dány genetickou výbavou nebo fyziologickým stavem jedince. Také FMO nepodléhají tak jednoduše jako CYP irreverzibilní inhibici cizorodými látkami, mohou být však inhibovány indoly přítomnými v brukvovité zelenině a oxidem dusnatým (Phillips & Shephard 2019).

2.4 Peroxidázy

Většina peroxidáz jsou podobně jako CYP hemoproteiny. Řadí se k nejvýznamnějším antioxidantům, rozkládají totiž toxický peroxid vodíku, organické hydroperoxydy a mohou metabolizovat i některá xenobiotika. U člověka se vyskytují zejména v krevních elementech – erytrocytech, leukocytech a trombocytech. Tato rozsáhlá nadrodina enzymů zahrnuje mj. myeloperoxidázy, eosinofilperoxidázy, děložní peroxidázy, laktoperoxidázy, thyroideální peroxidázy prostaglandin H syntázy (cyklooxygenázy). Peroxidázy jsou schopné xenobiotika také aktivovat. Příkladem může být tvorba karcinogenního epoxidu z aflatoxinu B₁ (podobně jako u CYP) nebo tvorba hepatotoxického NAPQI z paracetamolu (Anzenbacher & Zanger 2012).

2.5 Aminoxidázy

Do této nadrodiny enzymů se řadí mitochondriální monoaminoxidázy (MAO), cytosolické diaminoxidázy a polyaminoxidázy. Aminoxidázy katalyzují oxidační deaminaci biogenních aminů (serotonin, putrescin, spermin, histamin) i některá xenobiotika (např. propanolol). Jsou zapojeny do metabolismu primárních, sekundárních a terciárních aminů. Z klinického hlediska jsou významné inhibitory MAO s využitím jako antidepresiva. Podle monoaminové teorie se předpokládá, že depresivní poruchy jsou důsledkem nedostatku neurotransmiterů (noradrenalin, dopamin, serotonin) v synapsích CNS. Inhibitory MAO (selegilin, moklobemid) blokují enzym a tím biodegradaci neurotransmiterů (Hayes & Kruger 2014, Švihovec *et al.* 2018).

2.6 Konjugační enzymy

Reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik katalyzují tzv. konjugační enzymy. Metabolit vytvořený v první fázi metabolismu nebo xenobiotikum samotné mohou reagovat s endogenní sloučeninou za vzniku konjugátu - mnohem polárnějšího metabolitu, který je snadněji eliminován. Tyto procesy katalyzují mikrosomální nebo cytosolické transferázy, které jsou exprimovány nejen v játrech, ale téměř ve všech orgánech. Konjugací dochází ke snížení biologických účinků i toxicity xenobiotik. Těmto konjugačním reakcím podléhají i endogenní látky, např. hormony, cholesterol, žlučové

kyseliny atd. Konjugační enzymy jsou indukovatelné a mohou být i inhibovány, obdobně jako enzymy první fáze metabolismu.

Nejvýznamnějšími konjugačními reakcemi je konjugace s kyselinou glukuronovou, tedy glukuronidace, dále konjugace s glutathionem, sulfatace za účasti 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS), *N*-acetylce a methylace; viz tabulka 1 (Jančová *et al.* 2010).

2.6.1 Glukuronidace

40-70 % podávaných léčiv u člověka podléhá konjugaci s kyselinou uridin-5'-difosfo- α -D-glukuronovou (UDPGA) za účasti UDP-glukuronosyltransferáz (UGT). Této reakci podléhají obecně alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aminy, amidy, thioly. Z léčiv lze uvést např. paracetamol, kodein, morfin, naloxon, oxazepam, propranolol, diklofenak, ibuprofen, valproát, diethyldithiokarbamát; z endogenních látek např. bilirubin, steroidní hormony, hormony štítné žlázy, žlučové kyseliny a vitaminy rozpustné v tucích (Cashman *et al.* 1996, Kiang *et al.* 2005). Vzniklé glukuronidy jsou více polární a téměř vždy méně toxické, s žádným nebo nižším biologickým účinkem, než parentní látka. Výjimkou je vznik reaktivních alergizujících acylglukuronidů vzniklých glukuronidací nesteroidních antiflogistik (Ritter 2000). Glukuronidy jsou vylučovány močí nebo žlučí. Některé nestabilní glukuronidy mohou být ve střevě hydrolyzovány působením β -glukuronidáz, resorbovány zpět do krevního řečiště a způsobit tak prodloužený účinek některých léčiv.

Nadrodina UGT je členěna do rodin a podrodin podle aminokyselinové sekvence obdobně jako CYP. U člověka jsou nejvýznamnější enzymy z rodiny UGT1 a UGT2. Rodina UGT1 zahrnuje 9 členů (UGT1A1, UGT1A3-10); rodina UGT2 je rozdělena do dvou podrodin (UGT2A a UGT2B). Zatímco podrodinu UGT2A zastupuje pouze jediný enzym UGT2A1, podrodina UGT2B má sedm členů (UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28). Největší zastoupení UGT lze nalézt v játrech, vyskytují se ale rovněž i extrahepatálně (Hayes & Kruger 2014, Jančová *et al.* 2010, Anzenbacher & Zanger 2012).

Některé látky, např. rifampicin, fenobarbital nebo β -naftoflavon, jsou schopna zvýšit expresi UGT. Naopak jiná léčiva (např. flukokonazol, analgetika, nesteroidní

antiflogistika, antivirotika, antikonvulziva, anxiolytika, sedativa) mohou enzymovou aktivitu UGT inhibovat.

UGT jsou geneticky polymorfní, snížená exprese UGT1A1 může vést k onemocněním spojeným s metabolismem bilirubinu. Gilbert-Meulengrachtův syndrom postihuje asi 10 % populace a charakterizuje jej hyperbilirubinemie. Crigler-Najjarův syndrom je poměrně vzácné onemocnění, kdy v důsledku zcela neaktivní UGT1A1 nedochází ke konjugaci bilirubinu. Volný bilirubin proniká snadno přes hematoencefalickou bariéru a poškozuje mozek s fatálními důsledky. Léčbou je fotolýza bilirubinu, podávání fenobarbitalu a transplantace jater (Jančová *et al.* 2010, Strassburg 2010).

2.6.2 Konjugace s glutathionem

Konjugace s endogenním tripeptidem glutathionem (GSH) za účasti cytosolických glutathion-*S*-transferáz (GST) se také řadí k nejvýznamnějším reakcím druhé fáze metabolismu. Glutathion je schopen tvořit konjugáty s elektrofilními xenobiotiky (PAH, epoxidy, α,β -nenasycenými ketony, alkylhalogenidy, arylhalogenidy, izokyanáty a s reaktivními formami kyslíku). Léčiva konjugovaná s GSH jsou např. cisplatina, cyklofosamid, morfin, paracetamol, simvastatin, spironolakton, thiotepa. Rovněž vznikají polárnější a téměř vždy méně toxické metabolity než parentní látka. I v tomto případě ale existuje výjimka a to 1,2-dibromethan, který konjugací s GSH tvoří nestabilní ion reaktivní s DNA. Konjugáty s GSH jsou vylučovány žlučí nebo, jako deriváty kyseliny merkapturové, močí. Barbituráty, PAH, extrakt z jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*), brukvovitá zelenina i extrakt z grapefruitu jsou induktory GST, naopak bilirubin, žlučové kyseliny, kyselina linolenová, indometacin nebo kvercetin mohou aktivitu GST inhibovat. Nedostatek GSH v organismu může vést ke zvýšené toxicitě některých léčiv, např. paracetamolu (Hayes & Kruger 2014, Jančová *et al.* 2010, Anzenbacher & Zanger 2012, Williamson *et al.* 1997).

2.6.3 Sulfatace

Cytosolické sulfotransferázy (SULT) katalyzují konjugaci sulfonylového zbytku (SO_3H nebo obecně aniontu SO_3^-), pocházejícího z univerzálního donoru PAPS,

s nukleofilními xenobiotiky nebo endogenními látkami obsahujícími O, N nebo S ve své molekule. Pojmenování SULT tedy není v podstatě správné, protože dochází k přenosu sulfonátu, nikoliv sulfátu (SO₄H) (Anzenbacher & Zanger 2012).

Sulfataci podléhají obecně alkoholy, fenoly a aminy, z endogenních látek katecholaminy, steroidní hormony a hormony štítné žlázy. Sulfonáty jsou opět polárnější než parentní látka a jsou snadněji vylučovány močí nebo žlučí. Některé nestabilní sulfonáty mohou podléhat hydrolyze za vzniku reaktivních produktů a vytvářet tak adukty s DNA (Surh 1998).

Nadrodina SULT je rozdělena do tří rodin (SULT1, SULT2 a SULT3). Mnohá xenobiotika podléhají současně sulfonaci i glukuronidaci v závislosti na jeho koncentraci, u nižší koncentrace xenobiotika dochází spíše k sulfonaci, u vyšší spíše ke glukuronidaci. Glukokortikoidy a klofibrát působí indukčně na aktivitu SULT. S interindividuální variabilitou v aktivitě SULT koreluje genový polymorfismus SULT1A1, který může hrát roli i v rozvoji nádorů plic, močového měchýře (Hayes & Kruger 2014, Jančová *et al.* 2010, Anzenbacher & Zanger 2012).

2.6.4 *N*-acetylace

Xenobiotické aminy a hydraziny jsou konjugovány s acetylkoenzymem A za katalýzy cytosolických *N*-acetyltransferáz (NAT). U člověka existují dvě rodiny NAT1 a NAT2 s vysokou homologií (87 %). NAT2 se vyskytuje zejména v játrech a ve střevech, zatímco NAT1 je exprimována téměř ve všech tkáních. Vůbec prvním popsáním genovým polymorfismem biotransformačních enzymů byl polymorfismus NAT2 při acetylaci antituberkulotika isoniazidu. U pomalých metabolizátorů může docházet ke kumulaci léčiva v organismu a ke vzniku nežádoucích účinků, např. hepatitidy, neurotoxické poruchy, karcinomu močového měchýře (Agúndez 2008, Hayes & Kruger 2014, Jančová *et al.* 2010, Anzenbacher & Zanger 2012).

2.6.5 Methylace

Methylaci podléhají zejména endogenní látky, méně často xenobiotika. Konjugací s *S*-adenosylmethioninem za účasti různých methyltransferáz dochází překvapivě

ke vzniku lipofilnějších metabolitů. Fenoly jsou methylovány mikrosomálními fenol-*O*-methyltransferázami, methylaci katecholů katalyzují cytosolické katechol-*O*-methyltransferázy (COMT). Substráty COMT jsou nejen endogenní látky (adrenalin, noradrenalin, dopamin), ale i některá léčiva mající ve své struktuře katechol, např. antihypertenziva, antiastmatika, antiparkinsonika (Shield 2004). Neurologická onemocnění noradrenalinového nebo dopaminergního systému (např. schizofrenie, Parkinsonova choroba) a sklony k alkoholismu mohou souviset s genovým polymorfismem COMT (Tiihonen *et al.* 1999). Cytosolická thiopurin-*S*-methyltransferáza (TPMT) se podílí na *S*-methylaci některých thiopurinových léčiv (6-merkaptopurin, azathioprin, 6-thioguanin). Genový polymorfismus tohoto enzymu může způsobovat u pomalých metabolizátorů kumulaci léčiva v hematopoetické tkáni a závažnou myelosupresi i s fatálními následky. Rychlí metabolizátoři jsou naopak ohroženi nedosažením terapeutické hladiny v plazmě (Ujii *et al.* 2008, Jančová *et al.* 2010).

2.7 Nutraceutika

Nutraceutika (název vznikl kombinací slov „*nutrition*“ - výživa a „*pharmaceutical*“ - léčivý) jsou definována jako potraviny (strava nebo doplňky stravy), které kromě základní nutriční hodnoty poskytují také zdravotní přínosy. Některá nutraceutika mají příznivý vliv na zdravotní stav člověka, jiná mohou výrazně podporovat fyzický výkon, další zase snižovat riziko vzniku některých nemocí. Rozsáhlá skupina nutraceutik zahrnuje látky rostlinného původu, zejména produkty sekundárního metabolismu, např. fenolové kyseliny, lignany, fytoosteroly, karotenoidy, glukosinoláty, flavonoidy, terpeny, také minerály a stopové prvky, vitaminy, alkaloidy, oligosacharidy, polysacharidy, aminokyseliny, látky bílkovinné povahy, mastné kyseliny či strukturované tuky, dokonce i živé bakterie – probiotika (Kohout 2010, Gupta 2016).

2.7.1 Terpeny

Terpeny jsou látky přírodního původu, produkty sekundárního metabolismu rostlin, tvořeny spojením dvou nebo více molekul nenasyceného uhlovodíku isoprenu. Úloha produktů sekundárního metabolismu v rostlinách není známa, pravděpodobně se jedná o detoxikaci rostlin, o ochrannou funkci rostliny před napadením škůdci či o feromony. Dalšími důvody mohou být tvorba růstových látek nebo látek se specifickou úlohou při reprodukci rostlin (barviva, vůně), popřípadě jako látky inkrustující a impregnující. Řada těchto látek ovlivňuje životní funkce lidského organismu, jsou tedy látkami účinnými.

V závislosti na počtu isoprenových jednotek a také podle počtu uhlíků v molekule dělíme terpeny na monoterpeny (10 uhlíků), seskviterpeny (15 uhlíků), diterpeny (20 uhlíků), triterpeny (30 uhlíků), tetraterpeny (40 uhlíků) a polyterpeny (n počet uhlíků).

10-20 uhlíkaté terpeny tvoří podstatnou část silic, pryskyřic a hořčín. Vyšší terpeny jsou pevného skupenství a v rostlinách se vyskytují volné nebo vázané (saponiny, karoteny, lykopen, kaučuk, gutaperča).

Terpeny, fenylypropany, acetogeniny, sirné i dusíkaté sloučeniny jsou součástí rostlinných silic. V rostlinných orgánech se koncentrují ve žláznatých trichomech (máta, meduňka), v siličných kanálcích plodů (anýz, fenykl) nebo v siličných buňkách (pepř). Jehličnaté stromy *Pinaceae* obsahují silice ve všech orgánech rostlinného těla. Společnou vlastností silic je lipofilní charakter, z čehož se odvíjí technologie získávání silic - extrakcí pomocí tuků, destilací vodní parou nebo lisováním za studena.

Pro farmaceutické účely jsou vhodné silice rostlin z čeledí *Apiaceae* (miříkovité), *Astraceae* (hvězdicovité), *Lauraceae* (vavřínovité), *Myrtaceae* (myrtovité), *Pinaceae* (borovicovité) a *Zingiberaceae* (zázvořníkovité). Silice se užívají zejména jako stomachika, karminativa, rubefaciencia, antiflogistika, expektorancia, diuretika, dezinfekční a antiseptické prostředky, také jako korigencia chuti a vůně ve farmacii, potravinářství, likérnictví i v parfumerii (Bakkali *et al.* 2006, Burt 2004, Potužák & Potužáková 2006).

2.7.2 Seskviterpeny

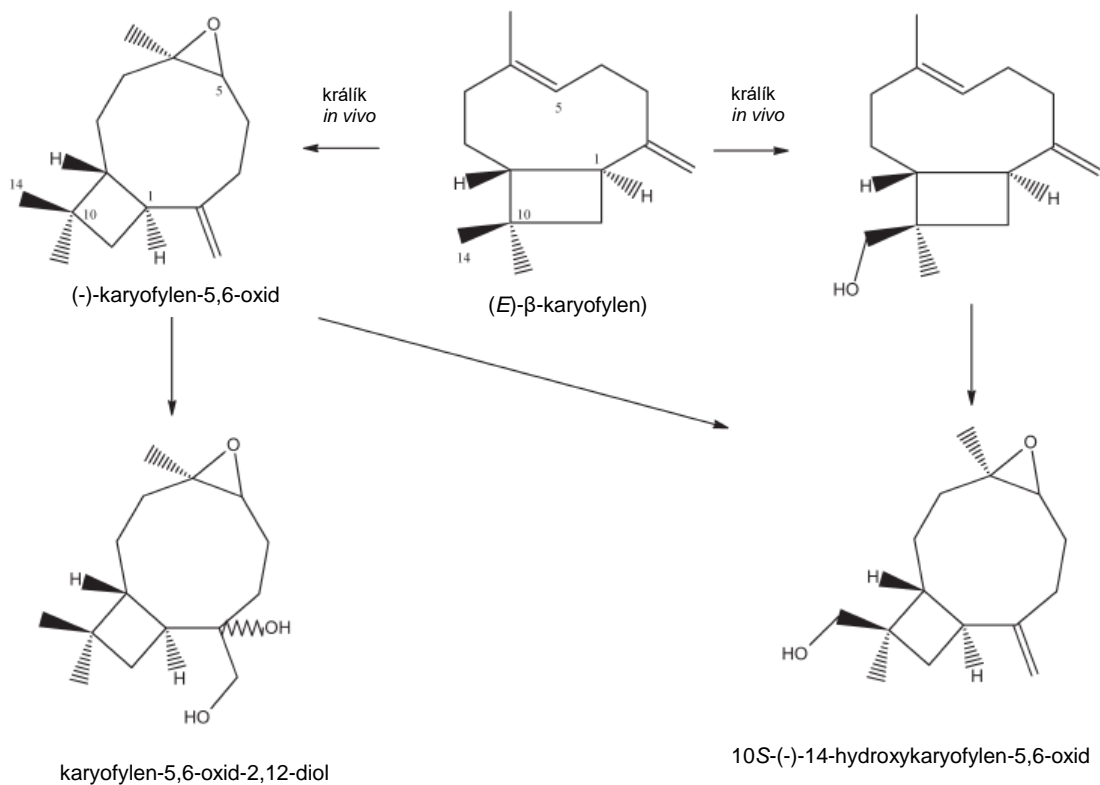
Seskviterpeny obsahují vyšší rostliny, zejména čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité), *Cactaceae* (kaktusovité), *Solanaceae* (lilkovité), *Lamiaceae* (hluchavkovité), *Araceae* (áronovité), *Piperaceae* (pepřovníkovité) a *Euphorbiaceae* (pryšcovité) (Paduch *et al.* 2007), ale i některé houby (*Allomyces macrogynus*, *Blastocladiaceae*) (Pommerville *et al.* 1990), bakterie a některé mořské bezobratlé organismy (Le Bideau *et al.* 2017).

Seskviterpeny vykazují různorodé biologické účinky, zajímavé je jejich cytotoxické, antibiotické, antimykotické, antiparazitické a protizánětlivé působení. Některé seskviterpeny jsou schopny zasahovat do buněčného cyklu nádorových linií nebo působit synergicky s jinými protinádorovými léčivy (Ambrož *et al.* 2015, Ambrož *et al.* 2017).

2.7.2.1 β -karyofylen

Bicyklický seskviterpen β -karyofylen (KAR) je jedním z nejvíce rozšířených seskviterpenů v rostlinné říši. Často se vyskytuje jako *trans*- izomer ((*E*)- β -karyofylen) ve směsi se svými dalšími izomery *iso*-karyofylenem ((*Z*)- β -karyofylenem) a α -humulenem (α -karyofylenem). Je obsažen ve velmi dobře známých bylinách, resp. kořenech – hřebíčku, bazalce, dobromysli, zázvoru, mátě, ale i v konopí, tabáku a borovicích. KAR vykazuje řadu zajímavých biologických účinků. Významný je antiproliferační a cytotoxický efekt pozorovaný na buněčných liniích, ale také antioxidační, antimikrobiální a chemo-protektivní účinky (Fidyt *et al.* 2016).

Informace o biotransformaci KAR jsou prozatím chudé, při experimentu *in vivo* na králíkovi bylo zjištěno, že KAR je konvertován na meziproduct (-)-karyofylen-5,6-oxid (obr. 12), který je dále přeměněn na [10S(-)-14-hydroxykaryofylen-5,6-oxid] nebo je hydroxylován na karyofylen-5,6-oxid-2,12-diol (Fidyt *et al.* 2016).



Obrázek 12: Metabolismus KAR *in vivo* (Fidyt *et al.* 2016).

2.7.2.2 β -karyofylen oxid

Epoxidový derivát KAR β -karyofylen oxid (KAO) je nejčastěji přítomen v meduňce, kmínu, hřebíčku, chmelu, bazalce, dobromysli, levanduli, rozmarýnu, skořici, šalvěji atd. Jeho největším zdrojem je ovšem hřebíčkovec srdčitý (*Syzygium cordatum*, *Myrtaceae*). KAO vykazuje silné protinádorové, protizánětlivé, analgetické, antimykotické, insekticidní, antioxidační a antivirové účinky (Boulogne *et al.* 2012, Fidyt *et al.* 2016, Chavan *et al.* 2010, Pan *et al.* 2016, Park *et al.* 2011).

2.7.2.3 α -humulen

Další izomer KAR, α -humulen (HUM), je také v přírodě široce rozšířený. Nejvyšší obsah HUM je ve chmelových šišticích. K nejvýznamnějším biologickým účinkům HUM patří protinádorové a protizánětlivé působení. HUM je schopen indukovat apoptózu a snížením hladiny buněčného glutathionu zvyšovat tvorbu reaktivních forem kyslíku, tato prooxidační aktivita může být zapojena v cytotoxicitě vůči nádorovým

buňkám (El Hadri *et al.* 2010, Fernandes *et al.* 2007, Legault *et al.* 2003, Rogerio *et al.* 2007).

2.7.2.4 Nerolidol

Tento alkenylový seskviterpen se vyskytuje ve dvou izomerech, *cis*-nerolidol (cNER) a *trans*-nerolidol (tNER). NER je obvyklou součástí řady potravin, silic exotických rostlin (*Myrocarpus frondosus*, *Fabaceae*; *Melaleuca Quinquenervia*, *Myrtaceae*; *Citrus aurantium*, *Rutaceae*) a kosmetických produktů. Obdobně jako cyklické seskviterpeny, oba izomery NER působí antioxidačně, antibakteriálně, protizánětlivě, neuroprotektivně, antihelminticky, antiparaziticky a protinádorově, jsou také účinné proti malárii (AbouLaila *et al.* 2010, Javed *et al.* 2016, Saito *et al.* 2016, Silva *et al.* 2017).

2.7.2.5 Farnesol

Acyklický seskviterpen farnesol (FAR) je součástí esenciálních olejů více či méně exotických rostlin (např. *Myrocarpus frondosus*, *Fabaceae*; *Abelmoschus moschatus*, *Malvaceae*; *Jasminum*, *Oleaceae*; *Rosa*, *Rosaceae* atd.). K biologickým účinkům patří zejména antioxidační, protizánětlivé, antialergické, chemoprotektivní a protinádorové působení (Joo & Jetten 2010, Ku & Lin 2015, Ku & Lin 2016, Lee *et al.* 2015, Santhanasabapathy & Sudhandiran 2015, Szűcs *et al.* 2013).

2.8 Význam studia interakcí doplňků stravy a současně podávaných léčiv

V současné době klade okolí na člověka stále větší tlak k užívání zdraví prospěšných potravin, tzv. „superpotravin“, doplňků stravy a aplikaci lidové (alternativní) medicíny. Snadná dostupnost tohoto zboží nejen v lékárnách a kamenných obchodech, ale zejména v e-shopech, může vést k nadměrné konzumaci nutraceutik bez hlubších znalostí o možných lékových interakcích a bez ohledu na možné zdravotní důsledky. Bylinné přírodní látky jsou častou součástí zejména tradiční čínské medicíny, která je stále oblíbenější i v našich zemích.

Lékové interakce jsou definovány jako změna farmakodynamických nebo farmakokinetických vlastností nebo projevů léčiva způsobená současným podáním jiného léčiva, vlivem složek potravy nebo zvyklostmi (např. kouřením).

Interakce nutraceutik a současně podávaných léčiv na základě farmakokinetiky mohou nastat v kterémkoli kroku procesu absorpce, distribuce, metabolismu anebo exkrece (ADME). Současně požitá strava může ovlivnit, snížit (anticholinergikum propantelin) nebo zvýšit (anthelmintikum triclabendazol) absorpci léčiva. Mnohá léčiva je vhodné užívat před jídlem (fenoxymethylpenicilin, levotyroxin, železo) a jiná s jídlem nebo po jídle (cefuroxil axetil, rivaroxaban). Některá léčiva mohou soutěžit se současně požitou stravou bílkovinné povahy o aktivní transportní mechanismus (antiparkinsonikum levodopa). Dieta s extrémně nízkým obsahem proteinů může vést k hypoalbuminémii, může se tak zvyšovat volná frakce některých léčiv a docházet ke vzniku nežádoucích účinků, např. krvácení u užívání warfarinu (Fender & Dobrev 2019). Sodík a lithium soutěží v ledvinách o tubulární resorpci, vysoký příjem sodíku z kuchyňské soli snižuje plazmatickou koncentraci lithia, naopak strava chudá na sodík způsobuje zvýšení koncentrace lithia (Dušek & Večeřová-Procházková 2015). Zvýšená kyselost moči, způsobená nadměrným příjmem vitamínu C, může ovlivňovat reabsorpci některých léčiv charakteru slabých kyselin (barbituráty) nebo může dokonce vést ke krystalurii (amoxicilin) a poškození ledvinových tubulů pacienta (Fogazzi *et al.* 2003, Květina & Grundmann 2003).

Nejvýznamnějšími a nejčastějšími lékovými interakcemi na farmakokinetickém principu jsou interakce na úrovni metabolismu. Aktivita enzymatického systému CYP může být zvýšena na základě indukce po opakovaném podání některých léčiv (např. barbituráty, dexamethason, fenytoin, karbamazepin, rifampicin (CYP3A4); primidon (CYP2C, CYP3A) atd.), požitím stravy (např. brukvovitá zelenina (CYP1A2), ženšen (CYP3A4)), nápojů (čaj připravený z třezalky tečkované, *Hypericum perforatum* (CYP3A4)), doplňků stravy (např. preparáty obsahující jinan dvoulaločný, *Ginkgo biloba* (CYP3A4)) nebo také kouřením cigaret (CYP1A1/2). Následkem indukce enzymů dochází k rychlejší metabolické přeměně daného léčiva nebo jiného léčiva metabolizovaného stejným enzymem. Může se tak snížit účinek řady léčiv, typicky imunosupresiv indukci CYP3A4 třezalkovými preparáty (Deng *et al.* 2008a, Perlík 2008, Zanger & Schwab 2013).

Enzymatická aktivita CYP může být inhibována také, např. cimetidinem (CYP1A2); makrolidy, azolovými antimykotiky, verapamilem, diltiazemem (CYP3A4); fluoxetinem (CYP2C9, CYP2D6), z přírodních látek je CYP3A4 inhibován grapefruitovým džusem, CYP2E1 allicinem obsaženým v česneku nebo gingeroly přítomnými v zázvoru (CYP2C9/19, CYP3A4). Snižuje se tak biotransformace současně podávaných léčiv (např. tolbutamidu, fenytoinu, warfarinu, midazolamu atd.), což může vést ke kumulaci léčiva v organismu až k intoxikaci a vzniku závažných nežádoucích účinků (Cho & Yoon 2015, Leite *et al.* 2016, Perlík 2008).

Z méně známých příkladů z poslední doby lze zmínit například interakci cytarabinu a daunorubicinu v léčbě akutní myeloidní leukémie se současným užíváním třapatky nachové (*Echinacea purpurea*). Třapatka, nutraceutikum poměrně často užívané ke zvýšení obranyschopnosti organismu, naopak snižuje účinnost léčby indukci enzymu metabolizujícího tato chemoterapeutika, CYP3A4 (Spagnuolo 2015).

Jak vyplývá z uvedených příkladů, při studiu vlastností nutraceutik je třeba sledovat možné interakce nutraceutik s léčivy, zejména těmi, která jsou přeměňována prostřednictvím enzymů první fáze metabolismu léčiv, tedy CYP.

2.8.1 Metody studia lékových interakcí

Ke studiu interakcí nutraceutik či léčiv (obecně xenobiotik) lze použít tři základní přístupy – *in vivo*, *in vitro* a *in silico*. Podle doporučení *Food and Drug Administration* (fda.gov) a evropské *European Medicines Agency* (ema.europa.eu) musí každé nově zaváděné léčivo projít důkladným testováním.

U metod *in vivo* lze uvést studie na octomilkách (*Drosophila*), na hlísticích (*Nematoda*), na larválních stadiích ryb a obojživelníků a v neposlední řadě na modelu laboratorního zvířete - myš, potkan, morče, králík, slepice, pes, koza, ovce, miniprase, prase (Badyal & Desai 2014). V rámci klinického hodnocení léčiva studie *in populo* na zdravých dobrovolnících nebo nemocných pacientech může být studie lékových interakcí prováděna za striktně daných podmínek (fda.gov, ema.europa.eu). Ve většině případů se ale jedná o prospektivní studie zaměřené na rozbor dat získaných v klinické praxi (van Puijenbroek *et al.* 2000).

V laboratorních podmínkách jsou často užívané *in vitro* metody za použití izolovaných enzymů, subcelulárních frakcí (např. mikrosomální frakce jaterního buněčného homogenitu), řezů tkání, primárních buněčných kultur, buněčných linií anebo kmenových buněk. Principem je vždy sledování změny dostupného parametru v důsledku podávání potenciálně interagujících látek. U CYP a analogicky dalších enzymů je sledována exprese různých forem, jak na úrovni mRNA (metodou PCR), tak exprese proteinů (metodou Western Blotting) a rovněž i změny aktivit příslušných enzymů. Většina studií se provádí s mikrosomální frakcí jaterního buněčného homogenátu (mikrosomy) a má charakter studia inhibice aktivit nejdůležitějších forem CYP zvolenými nutraceutiky (Grizzle *et al.* 2019).

2.8.2 Metody studia lékových interakcí *in vitro*

2.8.2.1 Inhibice CYP

Situace, kdy dochází k inhibici enzymové aktivity biotransformačních enzymů, mohou vést k závažným lékovým interakcím v důsledku zvýšení plazmatické koncentrace léčiv, která jsou metabolizována stejnými (inhibovanými) enzymy. Inhibice enzymové aktivity je poměrně rychlý proces, může nastoupit řádově během několika hodin. Nejzávažnější jsou důsledky inhibice enzymové aktivity CYP3A4 (účastní

se metabolismu více než 50 % podávaných léčiv) a CYP2D6 (metabolizuje asi 25 % podávaných léčiv). Tabulky 2- 4 shrnují typické inhibitory CYP3A4, CYP2D6 a CYP2C.

U proléčiv (*prodrug*), která ke svému terapeutickému účinku vyžadují metabolickou aktivaci, může v případě inhibice biotransformačního enzymu dojít ke snížení terapeutické dávky v důsledku nedostatečné přeměny *prodrug* na účinnou látku, např. *O*-demethylace kodeinu na morfin pomocí CYP2D6 (Stamer & Stüber 2007) nebo 2-oxidace klopidoogrelu prostřednictvím CYP2C19 (Sanguhl *et al.* 2010).

Tabulka 2: Přehled typických inhibitorů CYP3A4 (Zanger & Schwab 2013, Pelkonen *et al.* 2008).

Azamulin	Bromokryptin	Klaritromycin
Cimetidin	Clotrimazol	Midazolam
Cyklosporin	Danazol	Mikonazol
Diltiazem	Ergotamin	Nefazodon
Erytromycin	Etinylestradiol	Nifedipin
Flukonazol	Fluoxetin	Nikardipin
Fluvoxamin	Gestoden	Omeprazol
Irinotekan	Progesteron	Ritonavir
Saquinavir	Troleandomycin	Verapamil
Vorikonazol	Ketokonazol	Isoniazid
Grapefruitový džus		

Tabulka 3: Přehled typických inhibitorů CYP2D6 (Zanger & Schwab 2013, Pelkonen *et al.* 2008).

Amiodaron	Bupropion	Celecoxib
Cimetidin	Cinacalcet	Citalopram
Difenhydramin	Doxorubicin	Doxepin
Duloxetin	Escitalopram	Fluoxetin
H1-antihistaminika	Halofantrin	Haloperidol
Hydroxyzin	Chinidin	Chlorpheniramin
Chlorpromazin	Klemastin	Levomepromazin
Kokain	Methadon	Metoklopramid
Midodrin	Moklobemid	Norfluoxetin
Paroxetin	Perfenazin	Ranitidin
Ritonavir	Sertralin	Terbinafin

Tabulka 4: Přehled typických inhibitorů forem CYP2C (Zanger & Schwab 2013, Niwa & Yamazaki 2012).

Gemfibrozil	Montelukast	Trimethoprim
Bisfenol A	Amiodaron	Flukonazol
Naringenin	Nonylfenol	Vorikonazol
Sulfafenazol	Vorikonazol	kyselina tienylová
Klopidogrel	Fluoxetin	Fluvoxamin
Naringenin	Omeprazol	Tiklopidin
(+)-N-3-benzyl-nirvanol	(-)-N-3-benzyl-fenobarbital	

2.8.2.2 Mechanismy inhibice

Rozlišujeme tři typy inhibičních reakcí: reversibilní, quasi-reversibilní a irreverzibilní. Podle svých fyzikálně-chemických vlastností může inhibitor vykazovat více typů mechanismů inhibice.

Reversibilní inhibice způsobují často látky, které obsahují ve své struktuře atom dusíku (imidazoly, pyridiny, chinoliny). Tyto inhibice jsou dále klasifikovány na kompetitivní, nekompetitivní, smíšené nebo akompetitivní. Kompetitivní inhibitor se váže do aktivního místa enzymu a brání vazbě substrátu. Většinou se strukturně podobá substrátu. Nekompetitivní inhibitor se váže na jiné místo enzymu, způsobí ale konformační změnu aktivního místa a tím znemožní vazbu substrátu. Situace, kdy může dojít k vazbě inhibitoru na enzym, k vazbě inhibitoru na komplex enzym-substrát nebo také k vazbě substrátu na komplex enzym-inhibitor, je nazývána jako smíšená inhibice. V tomto případě jsou ovlivněny obě základní charakteristiky enzymové reakce, maximální rychlost reakce i Michaelisova konstanta (Lin & Lu 1998, Segel 1993, Cornish-Bowden 2012).

Quasi-reversibilní inhibice jsou způsobeny produkty produkovanými v průběhu enzymatické reakce, tzn. že vytvořené metabolity mají schopnost inhibovat aktivitu CYP. *In vitro* lze tyto inhibiční reakce zvrátit, *in vivo* však musí být enzym obnoven *de novo*. Typickým příkladem tohoto „sebevražedného“ substrátu je troleandomycin, užívaný jako specifický inhibitor CYP3A4 (Lin & Lu 1998).

Irreverzibilní inhibitory také mají schopnost inhibovat enzymovou aktivitu svými vlastními metabolity, tyto reakce jsou nazývány tzv. *mechanism based*. Inaktivace je nevratná, časově a koncentračně závislá (nejčastěji označována anglicky jako

„time-dependent inhibition“). Rovněž v tomto případě musí být enzym obnoven *de novo* (Kamel & Harriman 2013, Riley et al. 2007).

2.8.2.3 Indukce CYP

Na rozdíl od inhibice, indukce enzymové aktivity nastupuje pomaleji a přetrvává až v řádu týdnů. Indukcí enzymové aktivity enzymů se zrychluje biotransformace léčiv, tím může dojít ke snížení plazmatické koncentrace léčiva přeměňovaného indukovaným enzymem a k nedostatečnému terapeutickému efektu. Naopak zesílený farmakodynamický efekt je pozorován u proléčiv, která jsou větší měrou metabolizována na vlastní aktivní species právě indukovanou formou.

Indukce CYP je regulována zejména aryl hydrokarbonovým receptorem (AhR), pregnanovým X receptorem (PXR) a konstitutivním androstanovým receptorem (CAR).

AhR je vysoce exprimovaný transkripční faktor indukující expresi zejména rodiny CYP1 (CYP1A1/2, CYP1B1). Po vazbě induktoru (typicky PAH) na AhR dochází k přesunu do jádra a tvorbě heterodimeru, který se váže na xenobiotika responzivní elementy genů pro CYP a aktivuje tak transkripci (Hukkanen 2012).

PXR zprostředkovává indukci řady CYP (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19 a CYP3A4), některých enzymů druhé fáze metabolismu xenobiotik a také důležitých transportérů. Je exprimován zejména v játrech a tenkém střevě. Induktory jsou velmi různorodé látky z oblasti léčiv (statiny, rifampicin, klotrimazol, tamoxifen), některé endogenní (steroidy, žlučové kyseliny) a přírodní látky, např. hyperforin obsažený v třezalce tečkované (Hukkanen 2012, Kliewer et al. 2002, Kojima *et al.* 2007).

CAR, podobně jako PXR, se podílí na regulaci genů pro CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19, CYP3A4, některých enzymů druhé fáze metabolismu a také transportérů léčiv. Rovněž je exprimován v játrech, ale také v ledvinách. Na rozdíl od jiných receptorů, je CAR schopen aktivace bez ligandu, jeví tedy konstitutivní aktivitu. Po navázání induktoru na CAR se tento přesouvá z cytosolu do jádra, kde dochází k heterodimerizaci s retinoidním X receptorem a vazbě vzniklého komplexu na xenobiotika responzivní elementy DNA (Tolson & Wang 2010).

2.8.3 Metody studia lékových interakcí *in silico*

Molekulové modelování *in silico*, použité v této práci, je výpočetní nástroj, pomocí něhož lze modelovat biologické systémy na úrovni atomů. Tyto metody poskytují unikátní informace v atomovém rozlišení a mohou být doplňkem k experimentálním výsledkům. Molekulové modelování umožňuje pochopit některé zákonitosti inhibičních reakcí, nahlédnutím do aktivního místa CYP předvídat lékové interakce, odhadnout přístupnost, velikost a flexibilitu aktivního místa, odhalit ve struktuře makromolekuly proteinu CYP přístupové a výstupní kanály pro substráty a rovněž produkty enzymové reakce apod. (Otyepka *et al.* 2012).

Metodou molekulové dynamiky lze modelovat biologické systémy v čase. Tyto časové intervaly jsou velmi krátké, řádově se jedná o pikosekundy až stovky nanosekund, u menších systémů dokonce i mikrosekundy. Delší časové období tak umožňuje pozorovat změny konformace proteinů (Hendrychová *et al.* 2012).

Metody studia lékových interakcí *in silico* zahrnují predikce možnosti lékových interakcí za použití software, jako je např. DDI Predictor (ddi-predictor.org), případně náročnější počítačové metody zahrnující různé aspekty lékových interakcí a vyžadující k predikci data o typu a síle interakcí resp. inhibicí interagujících látek (simulation-plus.com). V předkládané práci jsme se zaměřili na relativně přímější přístup, kdy na základě znalostí struktury a vlastností aktivních míst enzymů byla modelována interakce studovaných látek s CYP3A4 (studie *in vitro* ukázaly relativně silnou inhibici tohoto enzymu některými seskviterpeny).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo zhodnotit interakce vybraných seskviterpenů (β -karyofylenu, β -karyofylen oxidu, α -humulenu, *trans*-nerolidolu, *cis*-nerolidolu a farnesolu) s nejdůležitějšími enzymy metabolismu xenobiotik, včetně léčiv, tedy s cytochromy P450. Cílem bylo (i) zjistit inhibiční potenciál daného nutraceutika, tj. schopnost ovlivnit katalytickou aktivitu enzymů, (ii) charakterizovat mechanismus, kterým nutraceutikum případně enzymy inhibuje, a (iii) pokusit se posoudit možné riziko lékových interakcí v případě současně podávaných léčiv metabolizovaných stejnými enzymy.

Studium interakcí seskviterpenů s cytochromy P450 bylo zaměřeno zejména na následující témata:

- Sledování vlivu vybraných seskviterpenů na enzymovou aktivitu cytochromů P450 obsažených v mikrosomální frakci lidských jater *in vitro*
- Ověření výsledků získaných *in vitro* experimenty pomocí metod *in silico*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

Směsné jaterní lidské mikrosomy, Biopredic International (Rennes, Francie):

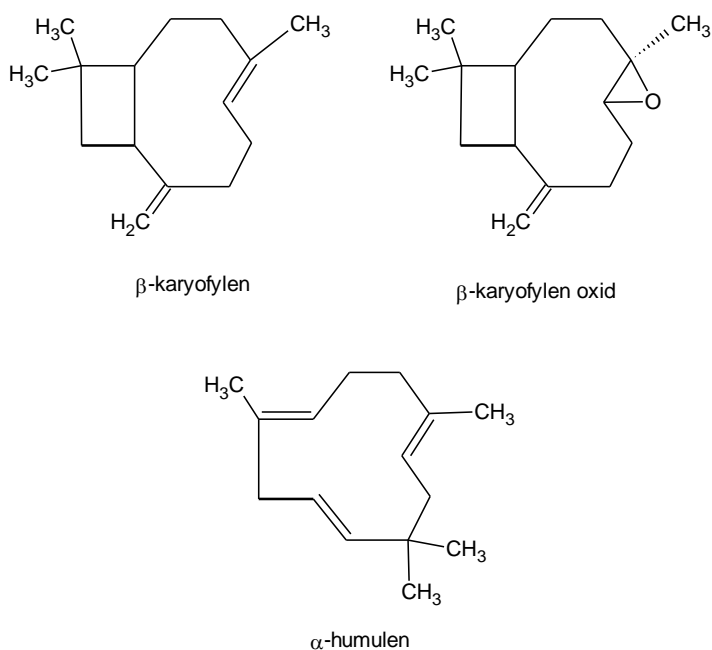
mikrosomální frakce byla získána v souladu s etickými pravidly země původu. Směsné jaterní mikrosomy byly získány od 10 mužů a 7 žen. Další detaily o enzymových aktivitách jednotlivých CYP jsou dostupné na oficiálním webu společnosti (www.biopredic.com).

$$\text{Koncentrace P450} = 14,55 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

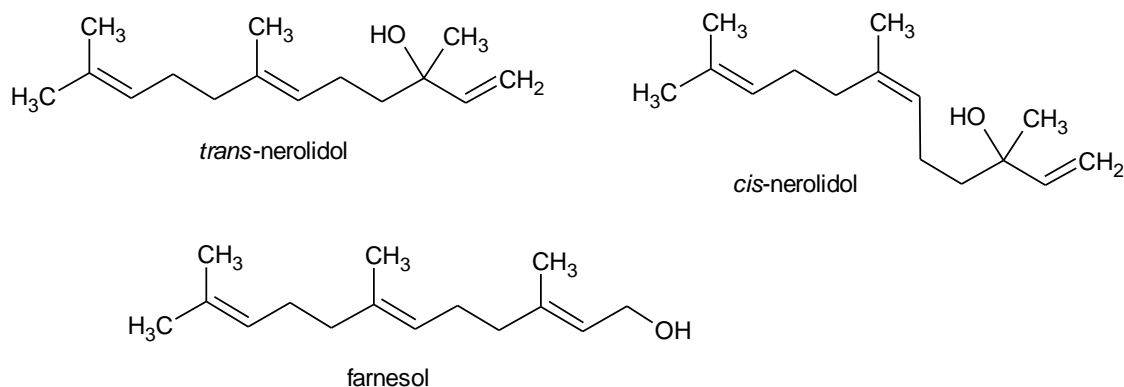
$$\text{Koncentrace proteinu} = 25,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Testované látky byly obdrženy od paní prof. RNDr. Lenky Skálové, Ph.D. z Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (*původem Sigma Aldrich, Praha, CZ*):

β -karyofylen (KAR), β -karyofylen oxid (KAO), α -humulen (HUM), *trans*-nerolidol (tNER), *cis*-nerolidol (cNER), farnesol (FAR)



Obrázek 13: Struktura cyklických seskviterpenů (Nguyen *et al.* 2017).



Obrázek 14: Struktura necyklických seskviterpenů (Špičáková *et al.* 2017).

Další použité chemikálie:

Abcam (Cambridge, UK): Midazolam (MDZ)

Fluka (Buchs, Švýcarsko): ethoxyresorufin (ETRR), 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (EFC), 4'-hydroxydiklofenak (OH-DF)

Chemos CZ (Praha, Česká republika): paklitaxel

Sigma Aldrich (Praha, CZ): bufuralol (BUF), diklofenak (DF), 1'-hydroxybufuralol (OH-BUF), 6-hydroxychlorzoxazon (OH-CLX), 1'-hydroxymidazolam (OH-MDZ), 7-hydroxykumarin (OH-KUM), 7-hydroxy-4-(trifluorometyl)kumarin (HFC), 6 α -hydroxypaklitaxel, chlorzoxazon (CLX), kumarin (KUM), S-(+)-mefenytin (MEF), isocitrátdehydrogenáza (IDH), kyselina DL-isocitronová (ISO), β -nikotinamid-adenindinukleotid fosfát (NADP⁺), resorufin (RR), testosteron (TST), trizma base

Lach-Ner (Neratovice, CZ): dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄), hydroxid draselný (KOH), hydroxid sodný (NaOH), chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), chloroform (CHCl₃), kyselina fosforečná (H₃PO₄), kyselina chloristá (HClO₄), kyselina octová (CH₃COOH), síran hořečnatý hepta hydrát (MgSO₄ · 7 H₂O), uhličitán sodný (Na₂CO₃)

Linde Technoplyn (Praha, CZ): dusík, oxid uhelnatý

Penta (Praha, CZ): kyselina chloristá (HClO₄), kyselina mravenčí (HCOOH), kyselina octová (CH₃COOH)

Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Kanada): 4-hydroxymefenytoin

Ultrafine (Manchester, UK): 6β-hydroxytestosteron (OH-TST)

VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie): acetonitril, methanol, propan-2-ol, dichlormethan

Použité chemikálie byly čistoty *p. a.* anebo *HPLC gradient grade*.

4.1.2 **Přístrojové vybavení**

analytické váhy GR-202 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie)

centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)

koncentrátor vzorků TERMOVAP TV 10 (ECOM, Praha, Česká republika)

magnetická míchačka Heidolph MR 1 000 (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika)

pH metr Schott CG 843 (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika)

suchá lázeň Major Science MD-02N (Biotech, Praha, Česká republika)

ultrazvuk K 10 (Kraintek, Podhájska, Slovensko)

vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

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

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

spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

spektrofotometr Helios-Epsilon (Spectronic Unicam, Cambridge, Velká Británie)

spektrofotometr Shimadzu UV-2401 PC (Shimadzu, Tokyo, Japonsko)

spektrofotometr Varian UV VIS 4000 (Varian Cary, Canberra, Australia/Amedis, Praha, Česká republika)

systém HPLC Shimadzu (Tokyo, Japonsko): odplyňovač DGU-20A5R, automatický dávkovač SIL-20ACXR, modul pro komunikaci CBM-20A, detektor diodového pole UV/VIS SPD-M20A, fluorescenční detektor RF-20, termostat kolony CTO-20AC

a pumpa LC-20ACXR; kolony se stacionární fází C18 LiChroCART 250 x 4 mm, velikost částic 5 µm a Chromolith® HighResolution (Merck, Darmstadt, Německo)

Software:

Microsoft office 2016 (Microsoft, Praha, Česká republika)

TECAN Infinity (Tecan Austria, Grödig, Rakousko)

Sigma plot v. 12 (SPSS, Chicago, IL, USA)

LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Statistica 12 (StatSoft ČR, Praha, Česká republika)

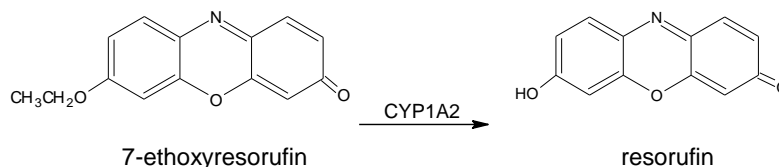
4.2 Metody

4.2.1 Stanovení enzymových aktivit různých isoformů CYP pomocí markerových substrátů

Stanovení aktivit individuálních CYP bylo prováděno podle metod použitých v naší laboratoři; popis metod je zde uveden vzhledem k tomu, že metody byly upraveny na podmínky laboratoře. Koncentrační řada testovaných látek (KAR, KAO, HUM, tNER, cNER, FAR) byla v rozmezí 0, 5, 10, 25, 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Analýzy byly vždy prováděny v duplikátech ve dvou nezávislých stanoveních. Vyhodnocení výsledků bylo realizováno pomocí softwaru Sigma Plot v. 12.0.

4.2.1.1 Stanovení enzymové aktivity CYP1A2 (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu)

Stanovení enzymové aktivity CYP1A2 se provádí pomocí markerového substrátu 7-ethoxyresorufinu (ETRR). Dochází k jeho deethylaci za vzniku fluorescenčního produktu resorufinu, který se detekuje spektrofluorimetry za excitace při 535 nm a sledování emise při 585 nm.



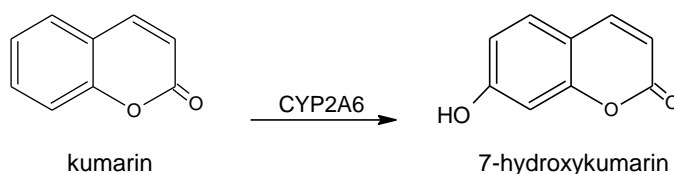
Obrázek 15: Schéma enzymatické reakce vzniku resorufinu působením CYP1A2 na 7-ethoxyresorufin.

Reakční směs o celkovém objemu 100 μl obsahovala 35 pmol CYP, ETRR o koncentraci 5,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, testovanou látku o vzrůstající koncentraci a 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH 7,4. Systém generující NADPH (NADP⁺ 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, isocitrát 5,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, isocitrát dehydrogenáza 0,3 units/ml a Mg^{2+} 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl přidán po 30 min preinkubaci při 37 °C. Reakce byla zastavena po 15 min inkubaci při 37 °C přidávkem 200 μl methanolu. Po centrifugaci při 14000 rpm při 4 °C byl supernatant přepipetován do vialek pro HPLC. Analýza metabolitu (resorufinu) byla realizována

pomocí HPLC Shimadzu (kolona LichroCart: C18, 250 x 4 mm i.d., částice o velikosti 5 μm , Merck, Darmstadt, Německo; s předkolonou 4 x 4 mm i.d., 5 μm) s isokratickou elucí, 50 μl nástřiku, teplotou kolony 25 $^{\circ}\text{C}$ a s průtokem mobilní fáze 0,8 ml/min. V 6,2. minutě byl identifikován a kvantifikován resorufin. Mobilní fází byla směs 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 o pH 7,0 a 100 % methanol v poměru 58:42 (Donato *et al.* 2004, Morse & Lu 1998).

4.2.1.2 Stanovení enzymové aktivity CYP2A6 (7-hydroxylace kumarinu)

Enzymová aktivita CYP2A6 se stanovuje pomocí substrátu kumarinu, který je hydroxylován za vzniku fluorescenčního produktu 7-hydroxykumarinu. Produkt se detekuje spektrofluorimetricky za použití excitační vlnové délky 325 nm a emisní vlnové délky 450 nm.

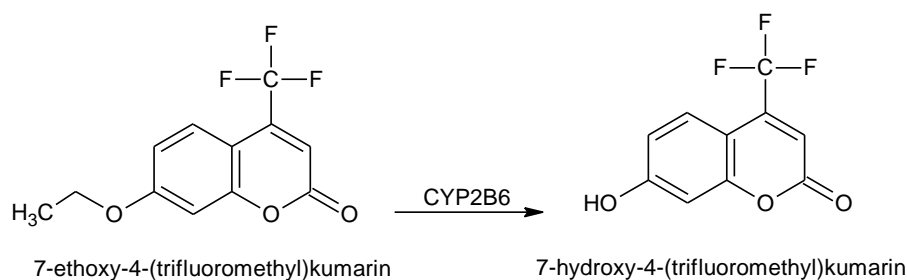


Obrázek 16: Schéma enzymatické reakce CYP2A6 a kumarinu za vzniku 7-hydroxykumarinu.

Reakční směs, jejíž objem byl pufrém (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH 7,4) doplněn na 100 μl , obsahovala 35 pmol CYP, kumarin o koncentraci 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a testovanou látku. Po 30 min preinkubaci při 37 $^{\circ}\text{C}$ byl přidán systém generující NADPH (NADP^+ 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ISO 5,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, IDH 0,3 units/ml a Mg^{2+} 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Reakce byla zastavena po 15 min inkubaci při 37 $^{\circ}\text{C}$ přidavkem 200 μl methanolu. Po centrifugaci při 14000 rpm při 4 $^{\circ}\text{C}$ byl supernatant přepipetován do vialek pro HPLC. Analýza 7-hydroxykumarinu byla realizována pomocí HPLC Shimadzu (kolona LichroCart: C18, 250 x 4 mm i.d., částice o velikosti 5 μm , Merck, Darmstadt, Německo; s předkolonou 4 x 4 mm i.d., 5 μm) s isokratickou elucí, 5 μl nástřiku, teplotou kolony 25 $^{\circ}\text{C}$ a s průtokem mobilní fáze 1,0 ml/min. Ve 3,8. minutě byl identifikován a kvantifikován metabolit. Mobilní fází byla směs 0,5 % kyseliny octové a acetonitrilu v poměru 60:40 (Souček 1999).

4.2.1.3 Stanovení enzymové aktivity CYP2B6 (O-deethylace 7-ethoxy-4-[trifluoromethyl]-kumarinu)

Pro stanovení enzymové aktivity CYP2B6 se užívá substrát 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin (EFC). Dochází k O-deethylaci za vzniku fluorescenčního produktu 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)kumarinu (HFC), který se detekuje spektrofluorimetry s excitační vlnovou délkou 410 nm a emisní vlnovou délkou 510 nm.

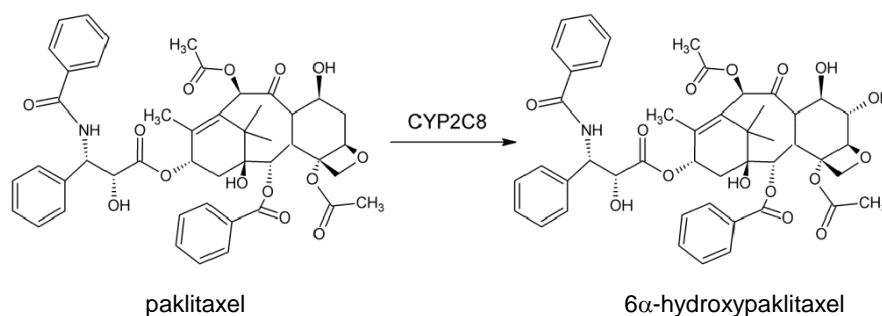


Obrázek 17: Schéma enzymatické reakce přeměny EFC vlivem CYP2B6 na HFC.

100 μ l reakční směsi obsahovalo 35 pmol CYP, EFC o koncentraci 15 μ mol \cdot l⁻¹, inhibitor o vzrůstající koncentraci a pufr 100 mmol \cdot l⁻¹ KH₂PO₄ o pH 7,4. Následovala 30 min preinkubace při 37 °C, po níž byl přidán systém generující NADPH (NADP⁺ 0,8 mmol \cdot l⁻¹, ISO 5,8 mmol \cdot l⁻¹, IDH 0,3 units/ml a Mg²⁺ 8 mmol \cdot l⁻¹). Po 15 min inkubaci při 37 °C byla reakce zastavena přidavkem 200 μ l methanolu. Následovala centrifugace při 14000 rpm při 4 °C, po které byl supernatant přepipetován do vialek pro HPLC. Analýza HFC byla realizována pomocí HPLC Shimadzu (kolona Chromolith: monolitická, 100 x 4,6 mm i.d., Merck, Darmstadt, Německo; s předkolonou 5 x 4,6 mm i.d.) s isokratickou elucí, 5 μ l nástřiku, teplotou kolony 30 °C a s průtokem mobilní fáze 0,8 ml/min. Ve 4,9. minutě byl identifikován a kvantifikován HFC. Mobilní fází byla směs 20 mmol \cdot l⁻¹ Na₂HPO₄ o pH 7,5 a 100 % acetonitrilu v poměru 7:3 (Donato *et al.* 2004, Morse & Lu 1998).

4.2.1.4 Stanovení enzymové aktivity CYP2C8 (6 α -hydroxylace paklitaxelu)

Pro stanovení enzymové aktivity CYP2C8 se užívá substrát paklitaxel (taxol). UV/VIS detekcí při 230 nm se sleduje 6 α -hydroxylovaný metabolit.

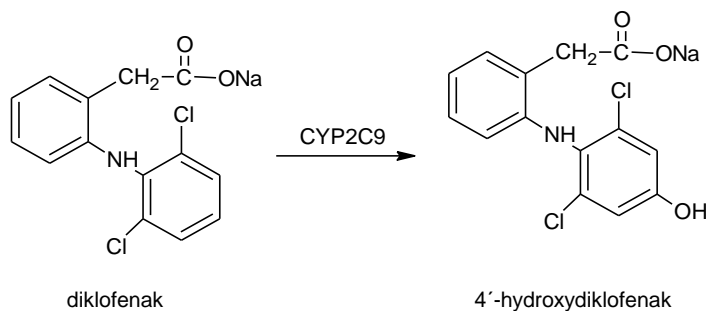


Obrázek 18: Schéma enzymatické reakce přeměny paklitaxelu vlivem CYP2C8 na 6 α -hydroxypaklitaxel.

200 μ l reakční směsi obsahovalo 70 pmol CYP, paklitaxel o koncentraci 45 μ mol \cdot l $^{-1}$, inhibitor o vzrůstající koncentraci a pufr 100 mmol \cdot l $^{-1}$ KH₂PO₄ o pH 7,4. Následovala 30 min preinkubace při 37 °C, po níž byl přidán systém generující NADPH (NADP⁺ 0,8 mmol \cdot l $^{-1}$, ISO 5,8 mmol \cdot l $^{-1}$, IDH 0,3 units/ml a Mg²⁺ 8 mmol \cdot l $^{-1}$). Po 15 min inkubaci při 37 °C byla reakce zastavena přidávkem 50 μ l ledového acetonitrilu za následného zchlazení reakční směsi na ledu. Následovala centrifugace při 14000 rpm při 4 °C, po které byl supernatant přepipetován do vialek pro HPLC. Analýza HFC byla realizována pomocí HPLC Shimadzu (kolona LichroCart: C₁₈, 250 x 4 mm i.d., částice o velikosti 5 μ m, Merck, Darmstadt, Německo; s předkolonou 4 x 4 mm i.d., 5 μ m) s gradientovou elucí (0-14. min 60 % B, 14.-17. min 10 % B, 17.-23. min 100 % B, 23.-31. min 60 % B), 50 μ l nástřiku, teplotou kolony 45 °C a s průtokem mobilní fáze 0,8 ml/min. V 9,9. minutě byl identifikován a kvantifikován 6 α -hydroxylovaný metabolit. Mobilní fází A byl 10% methanol, jako mobilní fáze B byl použit 100% methanol (Crespi *et al.* 2006a).

4.2.1.5 Stanovení enzymové aktivity CYP2C9 (4'-hydroxylace diklofenaku)

Diklofenak jako specifický substrát slouží pro stanovení enzymové aktivity CYP2C9, kdy je sledován vznik 4'-hydroxylovaného derivátu.

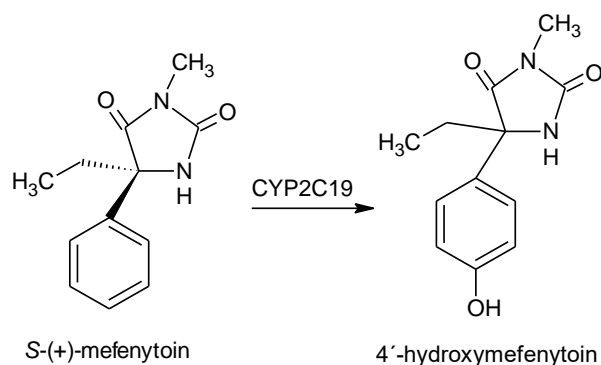


Obrázek 19: Schéma enzymatické přeměny diklofenaku na 4'-hydroxylovaný metabolit.

200 μl reakční směsi obsahovalo 35 pmol CYP, inhibitor o vzrůstající koncentraci, systém generující NADPH (NADP^+ 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ISO 5,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, IDH 0,3 units/ml a Mg^{2+} 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a pufr 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 o pH 7,4. Specifický substrát diklofenak, o výsledné koncentraci 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, byl přidán po 30 min preinkubaci při 37 °C. Po 25 min inkubaci při 37 °C byla reakce zastavena přidavkem 50 μl směsi acetonitrilu a kyseliny octové v poměru 94:6. Následovala centrifugace při 14000 rpm při 4 °C, po které byl supernatant prepipetován do vialek pro HPLC. Analýza HFC byla realizována pomocí HPLC Shimadzu (kolona Chromolith: 100 x 4,6 mm i.d., monolitická, (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou 5 x 4,6 mm i.d.) s gradientovou elucí (0-7. min 20 % B, 7.-15. min 40 % B, 15.-15,5. min 90 % B, 15,5.-18, min 100 % B, 19.-23. min 20 %B), 50 μl nástřiku, teplotou kolony 30 °C a s průtokem mobilní fáze 1,0 ml/min. V 6,55. minutě byl pomocí UV detekce při 280 nm identifikován a kvantifikován 4'-hydroxylovaný metabolit. Mobilní fází A byla směs 2,85 mM HClO_4 a acetonitrilu v poměru 7:3, jako mobilní fáze B byl použit 100% methanol (Crespi *et al.* 2006b).

4.2.1.6 Stanovení enzymové aktivity CYP2C19 (hydroxylace *S*-(+)-mefenytoinu)

Pro určení enzymové aktivity CYP2C19 se užívá markerový substrát *S*-(+)-mefenytoin. Dochází k 4'-hydroxylaci substrátu za vzniku 4'-hydroxymefenytoinu.

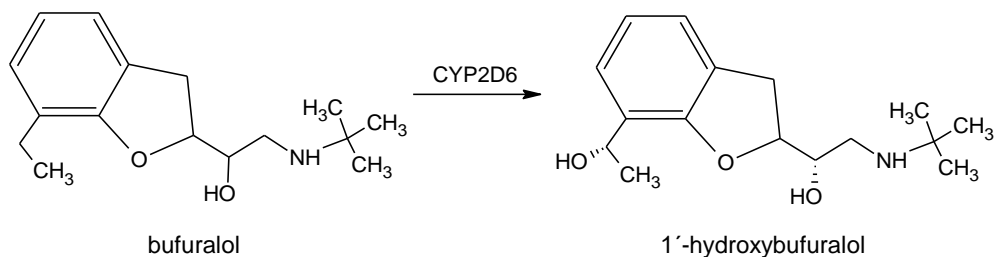


Obrázek 20: Schéma enzymatické reakce 4'-hydroxylace *S*-(+)-mefenytoinu CYP2C19.

Reakční směs o objemu 200 μl obsahovala 50 pmol CYP, inhibitor o vzrůstající koncentraci, systém generující NADPH (NADP^+ 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ISO 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, IDH 0,3 units/ml a Mg^{2+} 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a pufr 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 o pH 7,4. Po 30 min preinkubaci při 37 °C byla reakce započata přidavkem *S*-(+)-mefenytoinu o výsledné koncentraci 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následovala 25 min inkubace při 37 °C, po které byla enzymatická reakce zastavena přidavkem 20 μl 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Po vířivé extrakci reakční směsi po dobu 15 sekund do 2 ml dichlormethanu byla směs centrifugována 5 min při 3000 rpm. 1,5 ml spodní fáze extraktu bylo odpipetováno do sady čistých zkumavek a následně odpařeno dusíkem. Odparek byl rozpuštěn ve 150 μl mobilní fáze (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 o pH 2 / acetonitril v poměru 71:29) a přenesen do vialek pro HPLC. UV detekce při 200 nm byla realizována pomocí HPLC systému Shimadzu (kolona LichroCart: 250 x 4 mm i.d., (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou 4 x 4 mm i.d., 5 μm) s isokratickou elucí, 50 μl nástřiku, teplotou kolony 40 °C a s průtokem mobilní fáze 1,2 ml/min. V 3,85. minutě byl identifikován a kvantifikován 4'-hydroxylovaný metabolit (Crespi *et al.* 2006c).

4.2.1.7 Stanovení enzymové aktivity CYP2D6 (1'-hydroxylace bufuralolu)

Substrát bufuralol slouží pro stanovení enzymové aktivity CYP2D6. Bufuralol je CYP2D6 hydroxylován za vzniku fluorescenčního produktu 1'-hydroxybufuralolu.

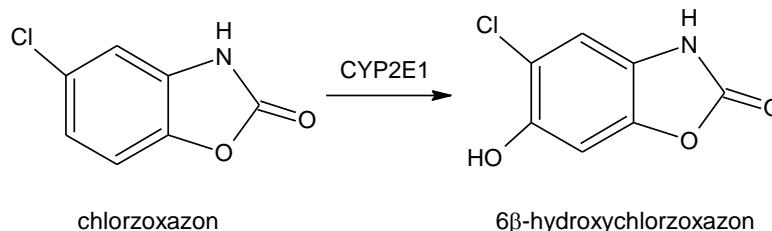


Obrázek 21: Schéma enzymatické reakce přeměny bufuralolu na 1'-hydroxybufuralol.

200 μl reakční směsi obsahovalo 67 pmol CYP, bufuralol ($14,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), inhibitor a pufr $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ o pH 7,4. Před započítím reakce přidavkem systému generujícího NADPH (NADP^+ $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ISO $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, IDH $0,2 \text{ units/ml}$ a Mg^{2+} $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byla reakční směs preinkubována po dobu 30 min při 37°C . Enzymatická reakce byla zastavena po 20 min inkubaci při 37°C přidavkem $20 \mu\text{l}$ 70% HClO_4 . Následovala centrifugace 10 min při 14000 rpm. $150 \mu\text{l}$ supernatantu bylo odpipetováno do vialek pro HPLC. Metabolit byl detekován fluorescenčně pomocí HPLC systému Shimadzu (kolona LichroCart: $250 \times 4 \text{ mm i.d.}$, (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou $4 \times 4 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$) s gradientovou elucí, $5 \mu\text{l}$ nástřiku, teplotou kolony 45°C a s průtokem mobilní fáze $1,5 \text{ ml/min}$; excitační filtr 252 nm a emise při 302 nm. V 4,5. minutě byl identifikován a kvantifikován 1'-hydroxylovaný metabolit (Crespi *et al.* 2006d).

4.2.1.8 Stanovení enzymové aktivity CYP2E1 (6 β -hydroxylace chlorzoxazonu)

Enzymová aktivita CYP2E1 se stanovuje pomocí substrátu chlorzoxazonu, který je CYP2E1 6 β -hydroxylován.

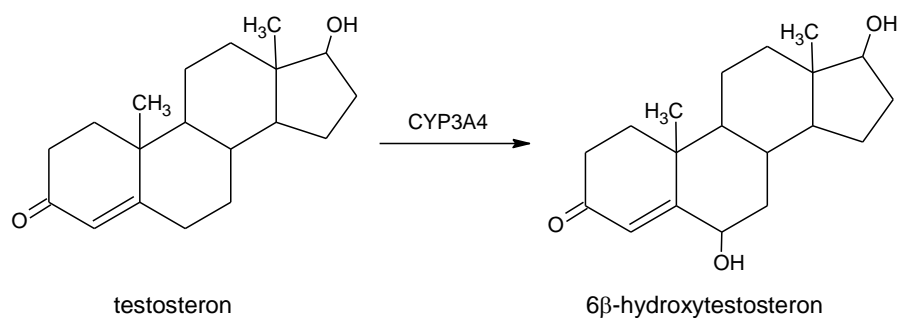


Obrázek 22: Schéma enzymatické reakce 6 β -hydroxylace chlorzoxazonu.

V reakční směsi, jejíž objem činil 1000 μ l, bylo obsaženo 160 pmol CYP, inhibitor, systém generující NADPH (NADP⁺ 0,5 mmol \cdot l⁻¹, ISO 3,5 mmol \cdot l⁻¹, IDH 0,2 units/ml a Mg²⁺ 5 mmol \cdot l⁻¹) a pufr 100 mmol \cdot l⁻¹ KH₂PO₄ o pH 7,4. Po 30 min preinkubaci při 37 °C byl k reakční směsi přidán substrát chlorzoxazon o výsledné koncentraci 26 μ mol \cdot l⁻¹. Enzymatická reakce byla zastavena po 30 min inkubaci při 37 °C přidavkem 50 μ l 42,5% H₃PO₄. Směs byla extrahována po dobu 20 sekund do 2 ml směsi propan-2-ol/chloroform (v poměru 15:85) a centrifugována 10 min při 2000 rpm. Do sady čistých zkumavek byl odpipetován a následně odpařen dusíkem 1 ml spodní fáze extraktu. Odparek byl rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (0,5% kyselina octová a acetonitril v poměru 3:1) a přepipetován do vialek pro HPLC. UV detekce při 287 nm byla realizována pomocí HPLC systému Shimadzu (kolona Chromolith: 100 x 4,6 mm i.d., monolitická, (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou 5 x 4,6 mm i.d.) s isokratickou elucí, 50 μ l nástřiku, teplotou kolony 30 °C a s průtokem mobilní fáze 1,0 ml/min. V 2,5. minutě byl identifikován a kvantifikován 6 β -hydroxylovaný metabolit (Lucas *et al.* 1996).

4.2.1.9 Stanovení enzymové aktivity CYP3A4 (6 β -hydroxylace testosteronu)

Stanovení enzymové aktivity CYP3A4 se provádí za použití metody 6 β -hydroxylace testosteronu.

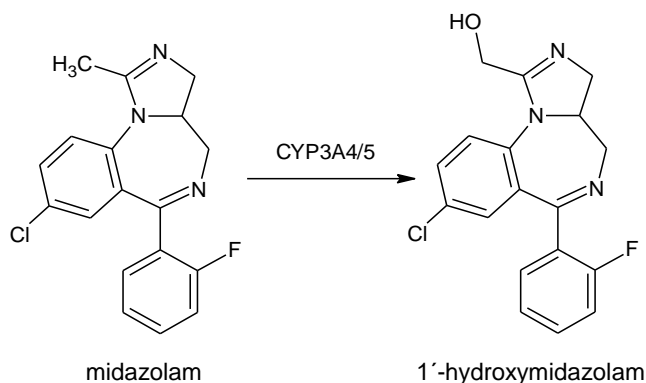


Obrázek 23: Schéma enzymatické reakce, kdy je testosteron 6 β -hydroxylován vlivem CYP3A4.

V reakční směsi bylo obsaženo 100 pmol CYP, inhibitor, systém generující NADPH (NADP⁺ 0,5 mmol·l⁻¹, ISO 4 mmol·l⁻¹, IDH 0,2 units/ml a Mg²⁺ 5 mmol·l⁻¹) a pufr (100 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄ o pH 7,4) doplňující objem reakční směsi na 500 μ l. Testosteron o výsledné koncentraci 100 μ mol·l⁻¹ byl k reakční směsi přidán po 30 min preinkubaci při 37 °C. Následovala 20 min inkubace při 37 °C, po které byla enzymatická reakce zastavena přidavkem 100 μ l směsi 1 mol·l⁻¹ Na₂CO₃ a 2 mol·l⁻¹ NaCl. Směs byla extrahována do 2 ml dichlormethanu po dobu 15 sekund a centrifugována 5 min při 3000 rpm. Extrakt (1 ml spodní fáze) byl odpipetován do sady čistých zkumavek a následně odpařen dusíkem. Odparek byl rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (64% methanol) a přepipetován do vialek pro HPLC. Produkt byl detekován při 245 nm pomocí HPLC systému Shimadzu (kolona LichroCart: 250 x 4 mm i.d., 5 μ m (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou 4 x 4 mm i.d., 5 μ m) s isokratickou elucí, 50 μ l nástřiku, teplotou kolony 30 °C a s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. V 7. minutě byl identifikován a kvantifikován 6 β -hydroxylovaný metabolit (Guengerich *et al.* 1986).

4.2.1.10 Stanovení enzymové aktivity CYP3A4 (1'-hydroxylace midazolamu)

Další možností stanovení enzymové aktivity CYP3A4 je použití jiného specifického substrátu CYP3A4 midazolamu, je sledována 1'-hydroxylace této látky.



Obrázek 24: Schéma enzymatické přeměny midazolamu na 1'-hydroxymidazolam za účasti CYP3A4.

V reakční směsi bylo obsaženo 12,56 pmol CYP, inhibitor, systém generující NADPH (NADP⁺ 0,5 mmol·l⁻¹, ISO 4 mmol·l⁻¹, IDH 0,2 units/ml a Mg²⁺ 5 mmol·l⁻¹) a pufr (100 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄ o pH 7,4) doplňující objem reakční směsi na 100 μl. Midazolam o výsledné koncentraci 2,2 μmol·l⁻¹ byl k reakční směsi přidán po 30 min preinkubaci při 37 °C. Následovala 20 min inkubace při 37 °C, po které byla enzymatická reakce zastavena přidavkem 100 μl vychlazeného methanolu. 150 μl supernatantu bylo odpipetováno do vialek pro HPLC. Metabolit byl detekován při 240 nm pomocí HPLC systému Shimadzu (kolona Chromolith: 100 x 4,6 mm i.d., monolitická, (Merck, Darmstadt, Německo), s předkolonou 5 x 4,6 mm i.d.) s isokratickou elucí, 50 μl nástřiku, teplotou kolony 30 °C a s průtokem mobilní fáze 0,8 ml/min. V 10. minutě byl identifikován a kvantifikován 1'-hydroxylovaný metabolit (Ghosal *et al.* 1996, Juřica *et al.* 2007, Kronbach *et al.* 1989).

Tabulka 5: Přehled metod provedených při studiu interakcí KAR, KAO, HUM, tNER, cNER a FAR s devíti nejvýznamnějšími CYP. Použité koncentrace specifických substrátů byly blízké hodnotě konstanty Michaelise a Mentenové (K_M), které byly stanoveny v primárních experimentech.

(EFC = 7-etoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin; ACN = acetonitril; UV = detekce v ultrafialové oblasti spektra)

CYP	Koncentrace substrátu ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Specifický substrát	Reakce katalyzovaná CYP	Obsah CYP (nmol)	Reakční objem (ml)	Činidlo k zastavení reakce	Způsob detekce	Citace
1A2	5,2	7-ethoxyresorufin	O-deethylace	35	100	200 μl methanolu	fluorescenční ex. 535 nm; em. 585 nm	Donato <i>et al.</i> 2004 Morse & Lu 1998 Souček 1999
2A6	15	kumarin	7-hydroxylace	35	100	200 μl methanolu	fluorescenční ex. 325 nm; em. 450 nm	Donato <i>et al.</i> 2004 Morse & Lu 1998
2B6	15	EFC	O-deethylace	35	100	200 μl methanolu	fluorescenční ex. 410 nm; em. 510 nm	Crespi <i>et al.</i> 2006a
2C8	45	paclitaxel	6 α -hydroxylace	70	200	50 μl acetonitrilu	UV, 230 nm	Crespi <i>et al.</i> 2006b
2C9	20	diklofenak	4'-hydroxylace	35	200	50 μl ACN/CH ₃ COOH	UV, 280 nm	Crespi <i>et al.</i> 2006c
2C19	28	S-(+)-mefenytol	4'-hydroxylace	50	200	20 μl 1 mol $\cdot\text{l}^{-1}$ HCl	UV, 200 nm	Crespi <i>et al.</i> 2006d
2D6	14,3	bupuralol	1'-hydroxylace	67	200	20 μl 70% HClO ₄	fluorescenční ex. 252 nm; em. 302 nm	Lucas <i>et al.</i> 1996
2E1	26	chlorzoxazon	6 β -hydroxylace	160	1000	50 μl 42,5% H ₃ PO ₄	UV, 287 nm	Guengerich <i>et al.</i> 1986
3A4	100	testosteron	6 β -hydroxylace	100	500	100 μl Na ₂ CO ₃ /NaCl	UV, 245 nm	Ghosal <i>et al.</i> 1996
3A4	2,2	midazolam	1'-hydroxylace	12,56	100	100 μl methanolu	UV, 240 nm	Juřica <i>et al.</i> 2007 Kronbach <i>et al.</i> 1989

4.2.2 *In silico* metody: Molekulové modelování

Struktury ligandů (MDZ, TST, KAO, tNER) byly připraveny pro dokovací proceduru pomocí softwarového balíčku MarvinSketch 15.1.5.0 (<http://www.chemaxon.com>). Molekulové modelování bylo provedeno pomocí programového balíčku Autodock Tools (Sanner 1999). Program Autodock Vina (Trott & Olson 2010) byl použit pro ukotvení ligandů do mřížky obsahující celou strukturu proteinového modelu CYP3A4 soustředěného na enzymatické centrum blízko kofaktoru hemu. Krystalová struktura enzymu CYP3A4 (PDBID: 5A1R) byla použita ke konstrukci dokovacích templátů enzym/protein. Afinita k enzymu byla odhadnuta za použití Gibbsovy volné energie (ΔG) reakce $E + L = EL$, kde L znamená ligand (substrát nebo inhibitor), E enzym a EL komplex enzym-ligand. Je třeba poznamenat, že $\Delta G = -RT \ln K$, kde R je univerzální plynová konstanta, T termodynamická teplota a K rovnovážná konstanta interakce.

5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu vybraných CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci

V prvním kroku experimentu byly stanoveny hodnoty konstant Michaelise-Mentenové (K_M) a V_{max} pro specifické substráty jednotlivých CYP (ethoxyresorufin, kumarin, EFC, paklitaxel, diklofenak, *S*-(+)-mefenytol, bufuralol, chlorzoxazon, testosteron a midazolam). Výsledné koncentrace substrátů použité v experimentech byly blízké vypočtené K_M (viz tabulka 5).

Dále byl sledován inhibiční vliv šesti vybraných seskviterpenů - β -karyofylenu (KAR), β -karyofylen oxidu (KAO), α -humulenu (HUM), *trans*-nerolidolu (tNER), *cis*-nerolidolu (cNER) a farnesolu (FAR) na enzymovou aktivitu devíti forem nejvýznamnějších CYP pro metabolismus léčiv (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4), za použití výše zmíněných specifických substrátů.

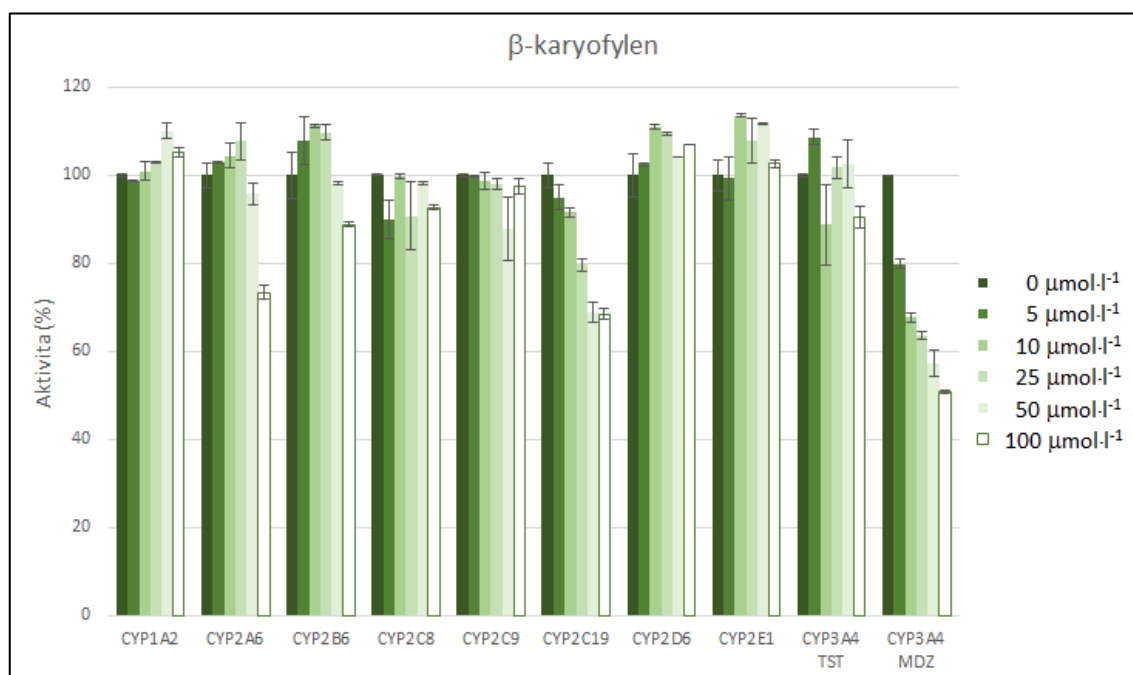
Potenciální inhibiční vliv KAR, KAO, HUM, tNER, cNER a FAR na enzymovou aktivitu CYP byl testován v koncentračním rozmezí 0, 5, 10, 25, 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztoky seskviterpenů byly připraveny jako 200 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v dimethylsulfoxidu. Kontrolní vzorky pro odečtení vlivu rozpouštědla na aktivitu CYP byly připraveny obdobným způsobem tak, aby procentuální obsah rozpouštědla byl stejný jako v testovaných vzorcích a současně nepřekročil 1 % v/v (Chauret et al. 1998).

V případě, že inhibice enzymové aktivity překročila 50 % a mohla být v určitých případech významná, byly dále provedeny studie k vysvětlení mechanismu inhibice. K tomu byly použity dva typy výnosů, podle Dixona a Lineweavera–Burka (Cornish-Bowden 2004, Segel 1993).

5.1.1 Stanovení inhibice enzymové aktivity jednotlivých CYP seskviterpenem β -karyofylenem (KAR)

Analýza stanovení inhibičního vlivu seskviterpenu KAR na enzymové aktivity devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci byla prováděna, jak je popsáno výše.

β -karyofylen neovlivnil významně enzymové aktivity jednotlivých CYP, pouze v případě CYP3A4 a specifického substrátu midazolamu (MDZ) β -karyofylen snížil katalytickou aktivitu CYP3A4 přibližně na 50 %. Enzymové aktivity CYP2A6 a CYP2C19 ovlivnil velmi mírně, v obou případech došlo ke snížení katalytické aktivity přibližně na 70 % (obr. 25).



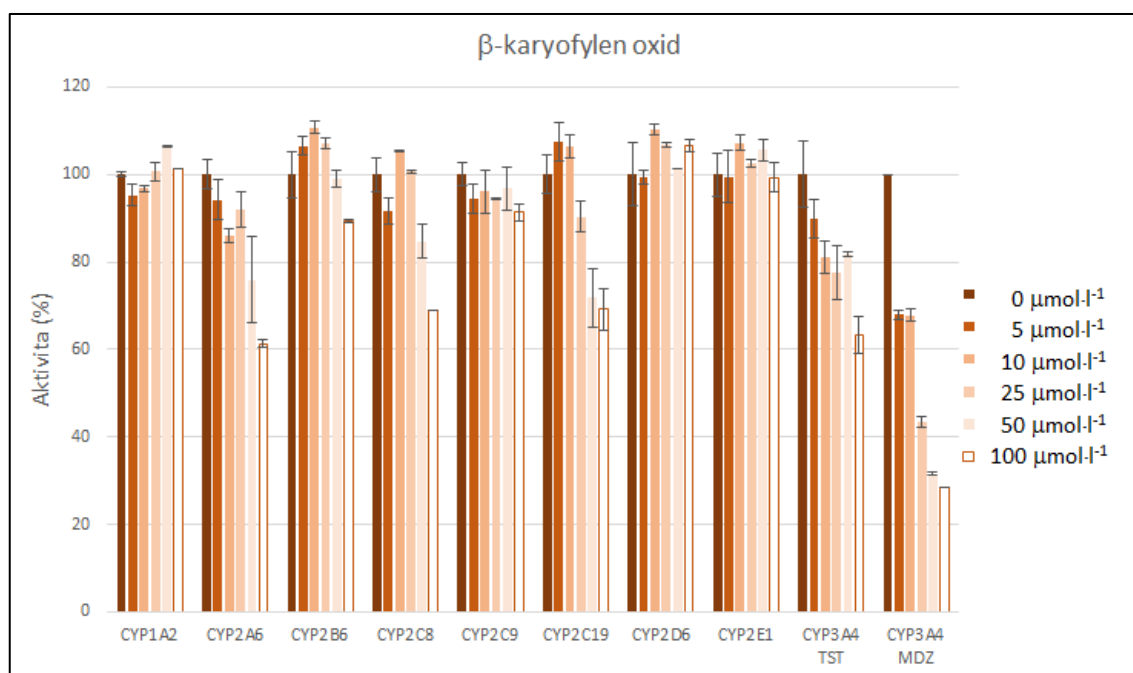
Obrázek 25: Stanovení inhibičního vlivu β -karyofyleny na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).

TST = testosteron; MDZ = midazolam

5.1.2 Stanovení inhibičního vlivu β -karyofylen oxidu (KAO) na enzymové aktivity jednotlivých CYP

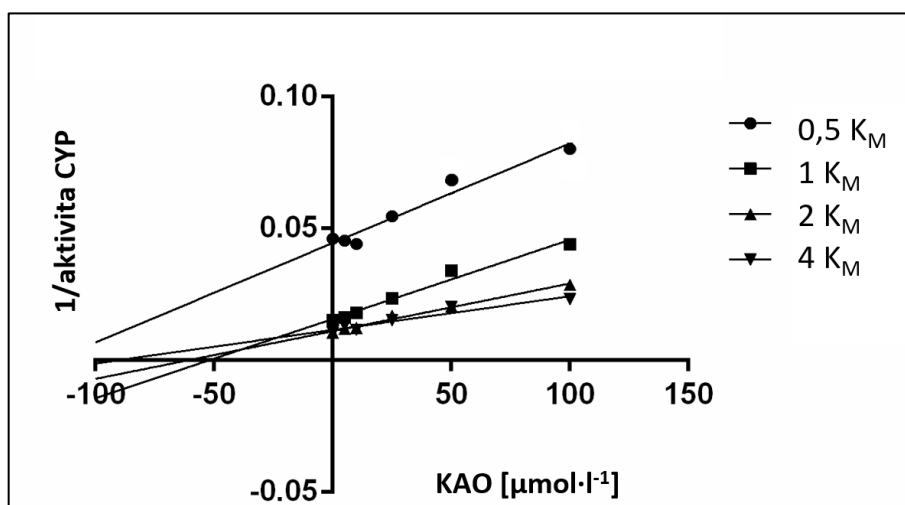
Stanovení inhibičního vlivu epoxidu KAO na enzymové aktivity devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci byla, jak je uvedeno výše. Výsledné koncentrace markerových substrátů CYP v reakční směsi byly blízké zjištěné konstantě K_M a koncentrační rozmezí KAO v reakční směsi bylo, jak je uvedeno v kap. 5.1.

β -karyofylen oxid mírně snížil katalytické aktivity CYP2A6, CYP2C8 a CYP2C19 při nejvyšší koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ přibližně na 60 %. V případě CYP3A4 a substrátu MDZ byla tato enzymová aktivita snížena až na 28 %, zatímco v případě markerového substrátu testosteronu (TST) byla enzymová aktivita CYP3A4 ovlivněna méně, na 63 % (obr. 26).

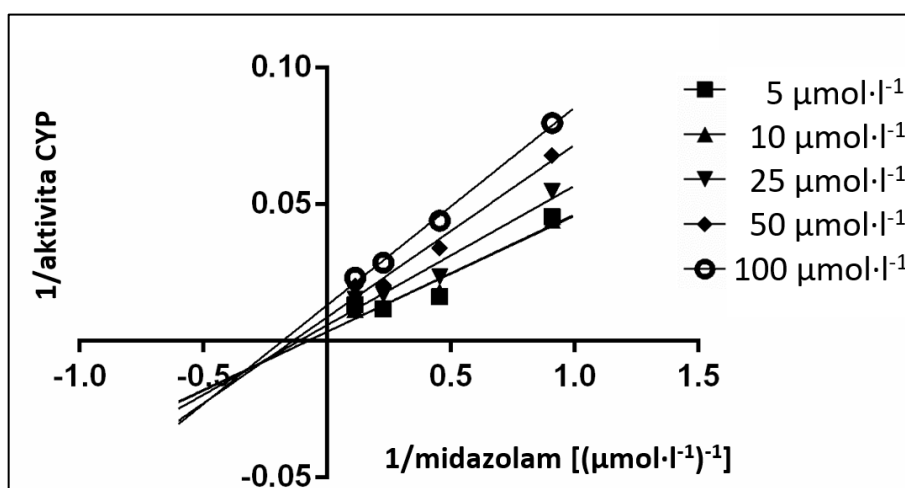


Obrázek 26: Stanovení inhibičního vlivu β -karyofylen oxidu na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).

V případě inhibičního vlivu KAO na enzymovou aktivitu CYP3A4 (substrát MDZ) byla stanovena inhibiční koncentrace, $IC_{50} = 14,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následovaly experimenty pro vysvětlení typu inhibice, byl sledován inhibiční vliv KAO na katalytickou aktivitu CYP3A4 při čtyřech koncentračních úrovních specifického substrátu MDZ ($0,5 K_M$, K_M , $2 K_M$ a $4 K_M$). Z těchto dat byly sestrojeny výnosy (obr. 27 a 28) podle Dixona a Lineweavera–Burka (Segel 1993), díky kterým byla vypočtena inhibiční konstanta, $K_i = 46,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Oba výnosy nejspíše odpovídají smíšenému typu inhibice (Segel 1993, Cornish-Bowden 2012).



Obrázek 27: Dixonův výnos inhibičního vlivu KAO na enzymovou aktivitu CYP3A4 za použití markerového substrátu MDZ ($0,5 K_M = 1,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $K_M = 2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $2 K_M = 4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a $4 K_M = 8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

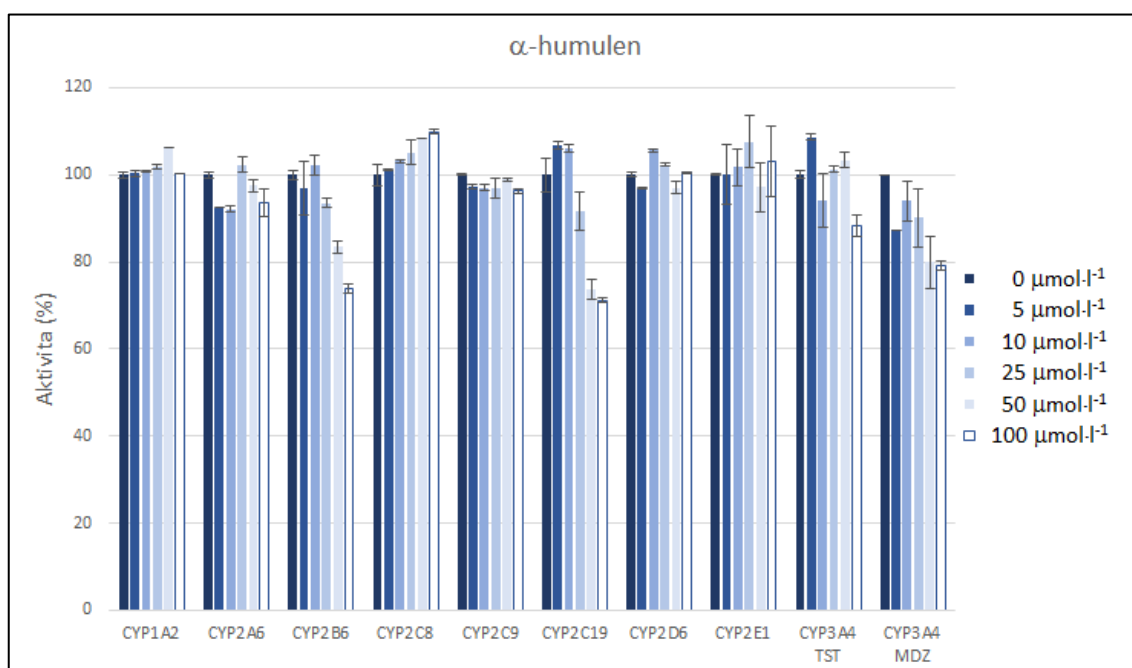


Obrázek 28: Lineweaverův–Burkův výnos inhibičního vlivu KAO na enzymovou aktivitu CYP3A4 za použití markerového substrátu MDZ.

5.1.3 Stanovení inhibičního efektu α -humulenu (HUM) na enzymové aktivity jednotlivých CYP

Izomer KAR a KAO, α -humulen, byl také testován pro jeho potenciální inhibiční vliv na katalytickou aktivitu nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci. Výsledné koncentrace markerových substrátů CYP v reakční směsi byly blízké zjištěné konstantě K_M a koncentrační rozmezí HUM v reakční směsi bylo 0 - 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

α -humulen neměl téměř žádný vliv na katalytickou aktivitu jednotlivých CYP. Pouze v případě CYP2B6 a CYP2C19 byla velmi mírně snížena enzymová aktivita CYP a to přibližně na 70 % (obr. 29).

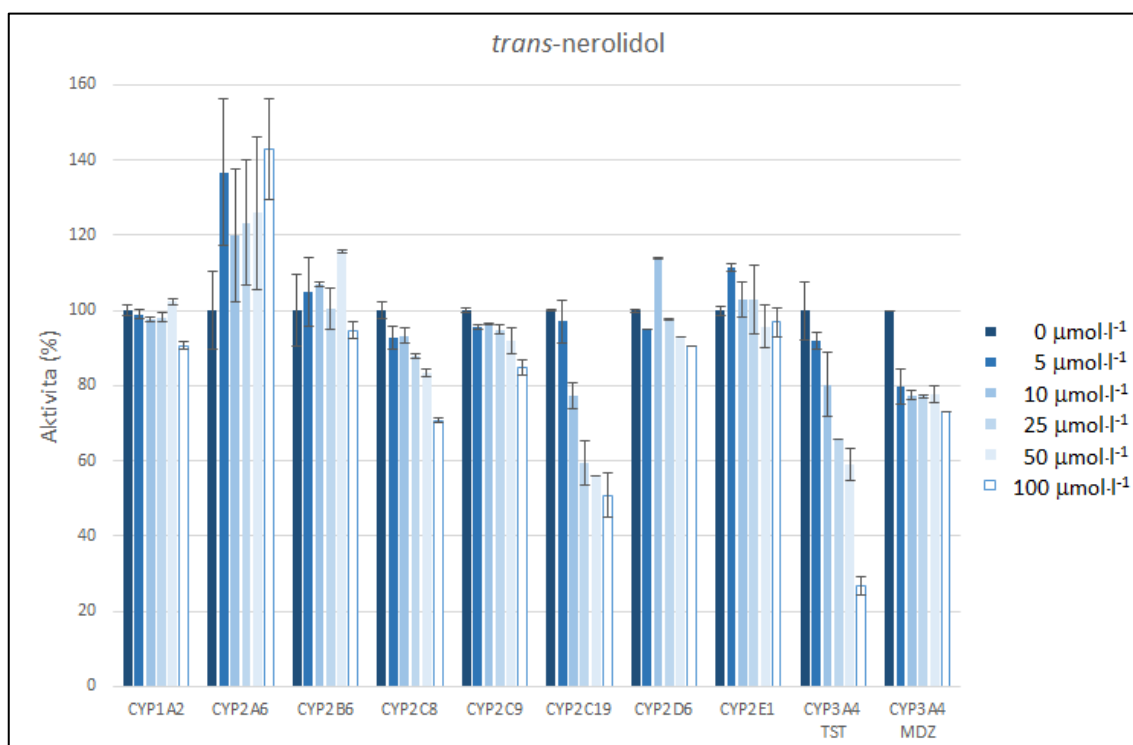


Obrázek 29: Stanovení inhibičního vlivu α -humulenu na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).

5.1.4 Stanovení inhibice na enzymových aktivit jednotlivých CYP *trans*-nerolidolem (tNER)

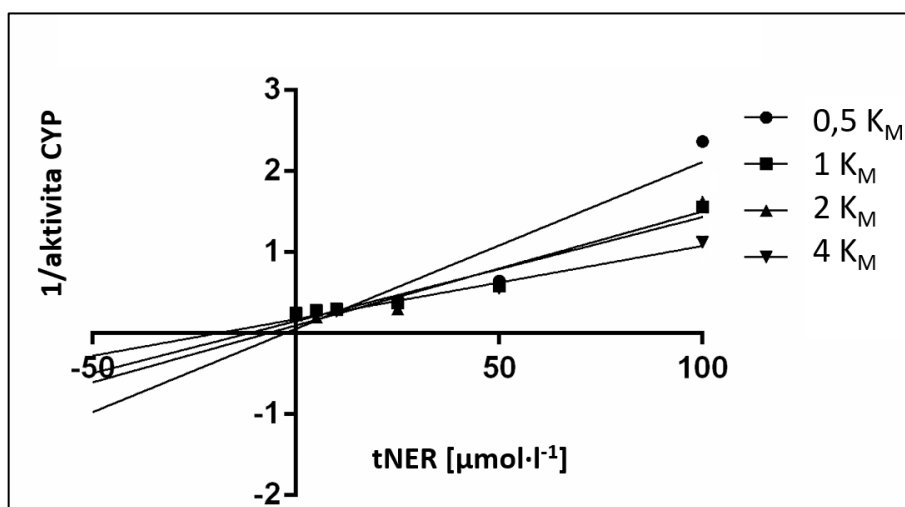
U prvního zástupce necyklických seskviterpenů tNER byl sledován inhibiční vliv na enzymové aktivity devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci. Koncentrační rozmezí tNER v reakční směsi bylo stejné jako v předchozích experimentech (kap. 5.1).

Trans-nerolidol při $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci v reakční směsi mírně ovlivnil enzymovou aktivitu CYP2C19, která byla při nejvyšší koncentraci snížena na 50 %. Katalytická aktivita CYP3A4 za použití specifického substrátu TST *trans*-nerolidolem byla ovlivněna, při $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci v reakční směsi došlo k jejímu snížení až na 28 % (obr. 30). V případě substrátu MDZ nebyla aktivita CYP významně ovlivněna.

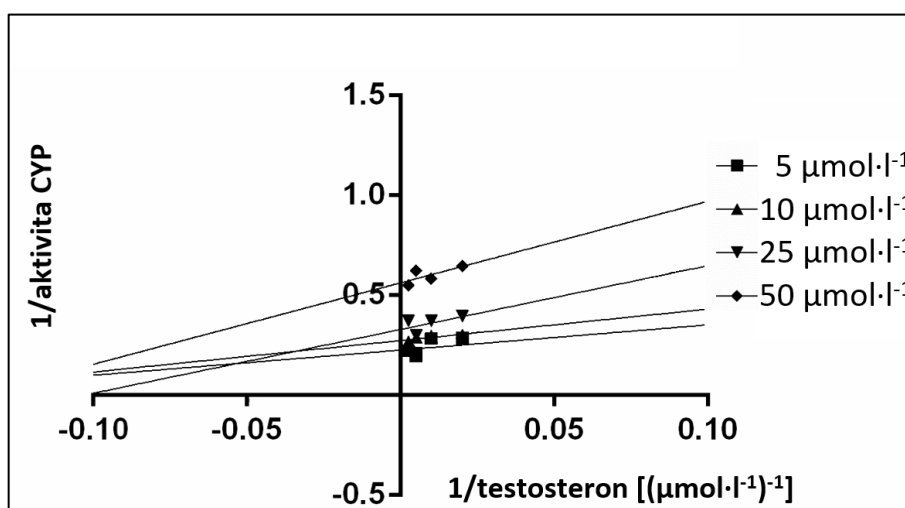


Obrázek 30: Stanovení inhibičního vlivu *trans*-nerolidolu na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).

V tomto případě byla také stanovena inhibiční koncentrace, $IC_{50} = 46,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, jako kvantifikační ukazatel inhibičního vlivu tNER na enzymovou aktivitu CYP3A4 (substrát TST). Rovněž byly provedeny experimenty pro určení typu inhibice, v tomto případě při čtyřech koncentračních úrovních specifického substrátu TST ($0,5 K_M$, K_M , $2 K_M$ a $4 K_M$). Z těchto dat byly sestrojeny výnosy podle Dixonova a Lineweaver–Burka (Segel 1993) a byla vypočtena inhibiční konstanta, $K_i = 32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Oba výnosy po srovnání možností a s ohledem na diagnostická kritéria lze připsat smíšenému typu inhibice; obr. 31 a 32 (Kotyk & Horák 1977).



Obrázek 31: Dixonův výnos inhibičního vlivu tNER na enzymovou aktivitu CYP3A4 za použití markerového substrátu TST ($0,5 K_M = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $K_M = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $2 K_M = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a $4 K_M = 400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

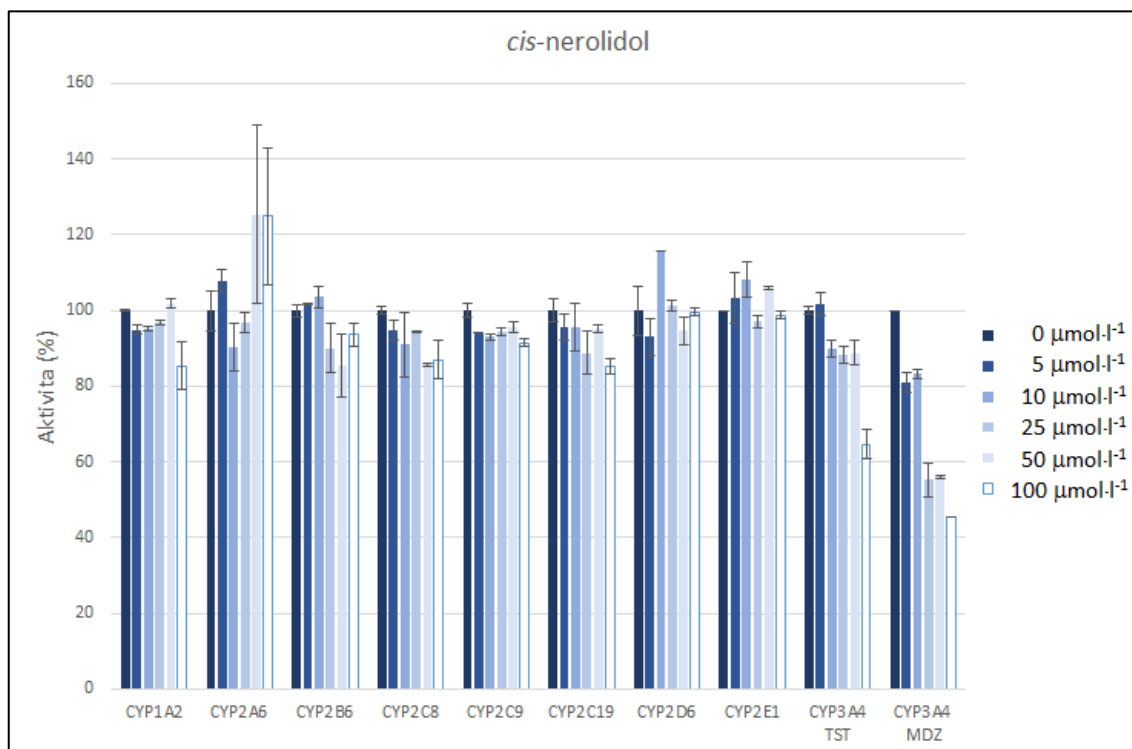


Obrázek 32: Lineweaverův–Burkův výnos inhibičního vlivu tNER na enzymovou aktivitu CYP3A4 za použití markerového substrátu TST.

5.1.5 Stanovení inhibičního vlivu *cis*-nerolidolu (cNER) na enzymové aktivity jednotlivých CYP

Dalším studovaným seskviterpenem byl izomer nerolidolu cNER. Stanovení inhibičního vlivu na enzymové aktivity devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci bylo provedeno, jak je uvedeno v kap. 5.1. včetně koncentrace markerových substrátů a koncentrací cNER v reakční směsi.

Cis-nerolidol neovlivnil významně enzymové aktivity testovaných CYP. Nicméně, v případě CYP3A4 a substrátu MDZ byla tato enzymová aktivita snížena na 45 %, zatímco v případě markerového substrátu TST byla enzymová aktivita CYP3A4 ovlivněna méně, na 65 % (obr. 33).

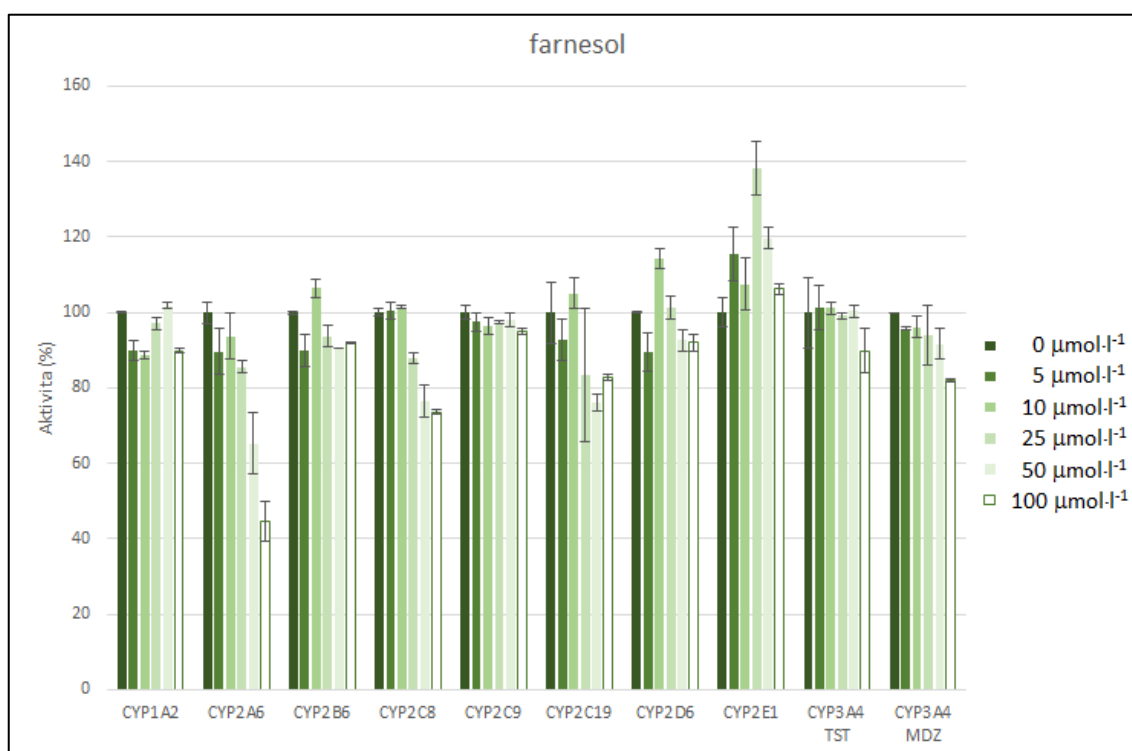


Obrázek 33: Stanovení inhibičního vlivu *cis*-nerolidolu na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).

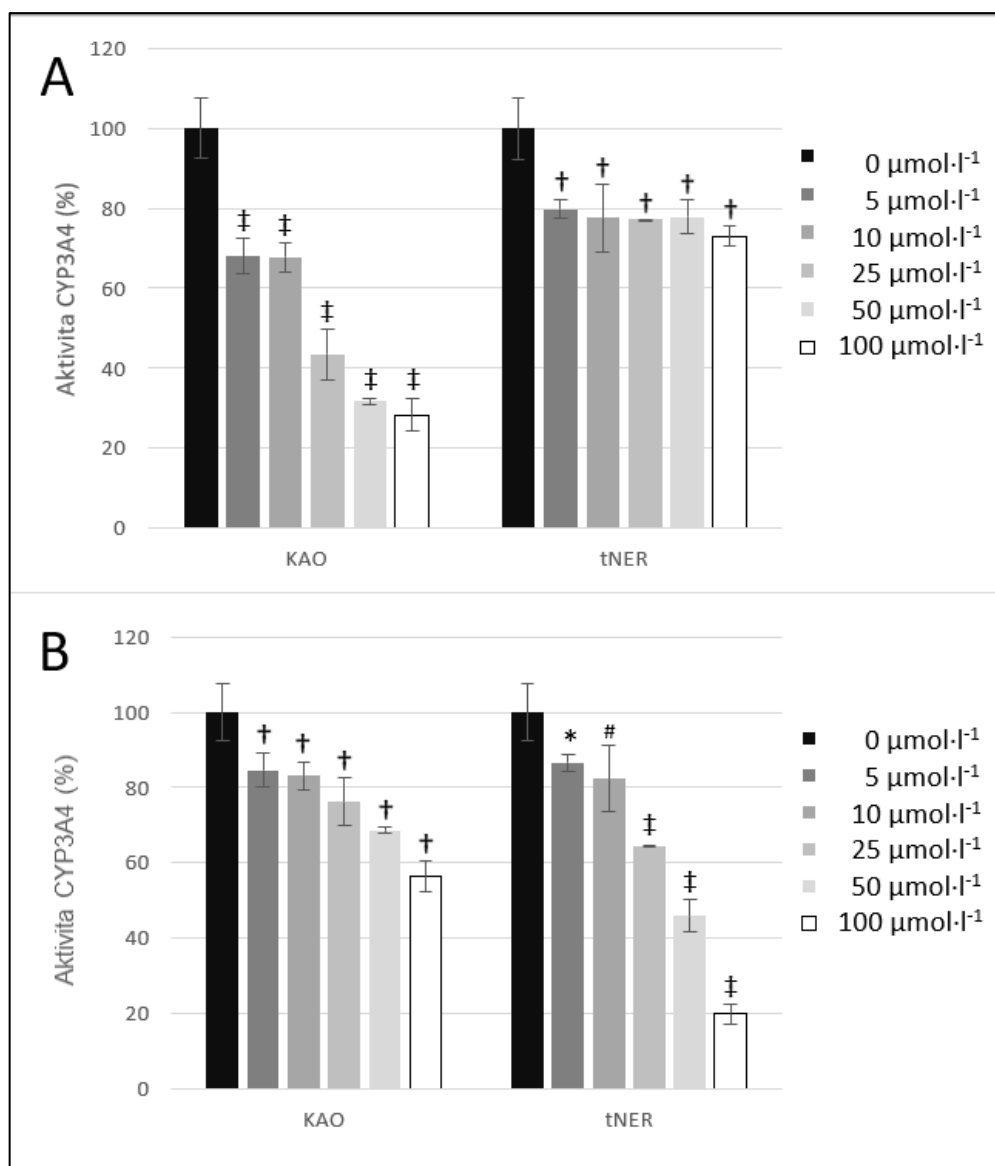
5.1.6 Stanovení inhibičního vlivu farnesolu (FAR) na enzymové aktivity jednotlivých CYP

Poslední testovanou látkou byl FAR. Stanovení inhibičního vlivu na enzymové aktivity devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v lidské jaterní mikrosomální frakci bylo stejné jako u ostatních látek (viz kap. 5.1).

Farnesol téměř neovlivnil enzymové aktivity testovaných CYP. Pouze v případě CYP2A6 byla snížena katalytická aktivita tohoto enzymu na 45 % (obr. 34).



Obrázek 34: Stanovení inhibičního vlivu farnesolu na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 v mikrosomální frakci. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4).



Obrázek 35: Souhrnné výsledky inhibičního vlivu seskviterpenů KAO a tNER na enzymovou aktivitu CYP3A4 v lidské jaterní mikrosomální frakci; substrát midazolam (A) a substrát testosteron (B). Data byla analyzována pomocí jednosměrného ANOVA testu a poté Scheffého post hoc testu. Hodnoty v grafu vyjadřují aritmetické průměry \pm směrodatné odchylky (N = 4, * p < 0,05; # p < 0,01; † p < 0,001; ‡ p < 0,0001).

5.2 Molekulové modelování interakce s CYP3A4

Cílem molekulového modelování bylo na úrovni aktivního místa CYP3A4 přispět k vysvětlení vyššího inhibičního vlivu KAR na enzymovou aktivitu tohoto enzymu za použití specifického substrátu MDZ a nižšího inhibičního vlivu v případě TST. Obdobně tomu tak bylo u tNER, kde byl při experimentech *in vitro* tento jev pozorován rovněž, ale s vyšší účinností inhibice 6 β -hydroxylace TST a nižší u substrátu MDZ.

5.2.1 Interakce β -karyofylen oxidu a *trans*-nerolidolu s aktivním místem CYP3A4

Molekulární dokování bylo použito pro analýzu interakcí dvou seskviterpenů (KAO a tNER) a dvou substrátů (MDZ a TST) v aktivním místě CYP3A4. Byly provedeny dokovací experimenty pro každou molekulu do krystalové struktury CYP3A4 a zjištěny hodnoty volné energie. Gibbsova volná energie odráží afinitu molekuly ligandu k aktivnímu místu a souvisí s rovnovážnou konstantou. Nižší hodnota Gibbsovy volné energie odpovídá vyšší afinitě k ligandu (zjednodušeně pevnější vazbě). Studované seskviterpeny vykazovaly podobné hodnoty vazebné energie v rozmezí od -6,6 do -7,6 kcal/mol (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Gibbsova volná energie (ΔG , kcal/mol) interakce testovaných látek s vazebným místem CYP3A4.

A - Gibbsova volná energie pro interakci samotných sloučenin s CYP3A4

B - Gibbsovy volné energie interakce substrátů v přítomnosti testovaných seskviterpenů v aktivním místě CYP3A4.

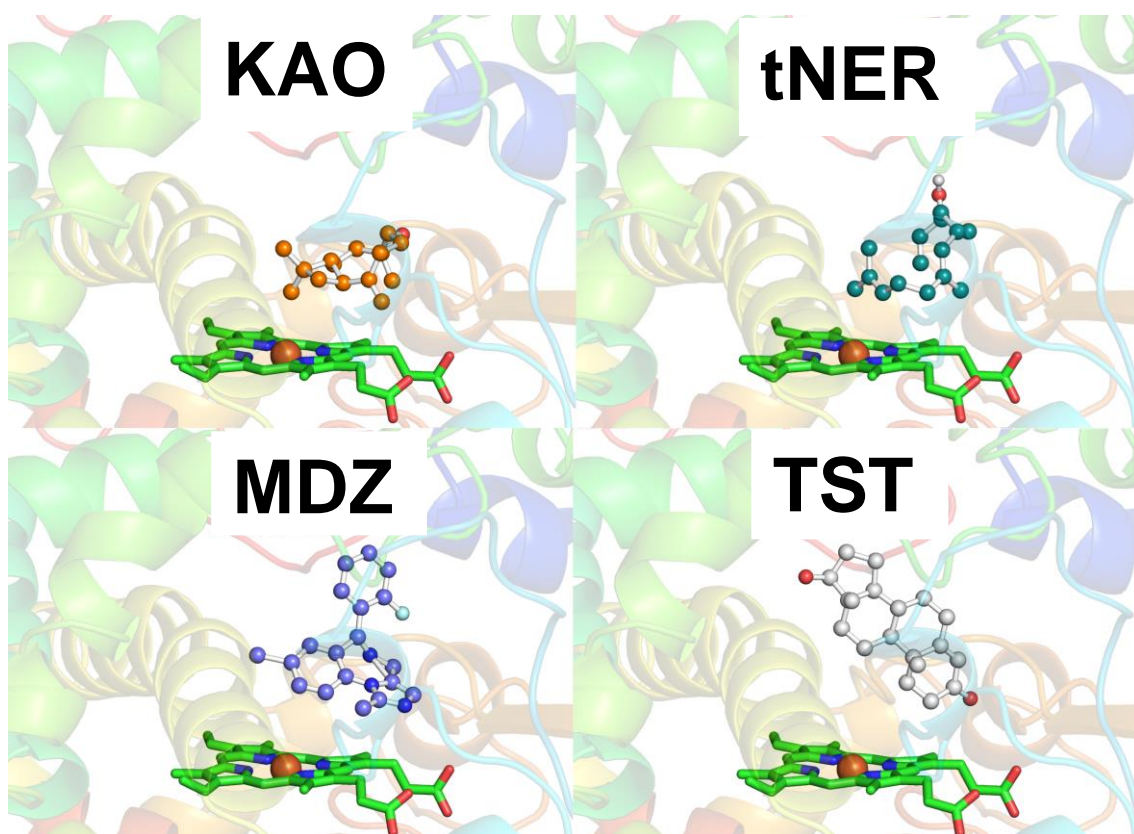
A

Testované látky	KAO	tNER	MDZ	TST
ΔG (kcal/mol)	-7,6	-6,6	-9,8	-6,6

B

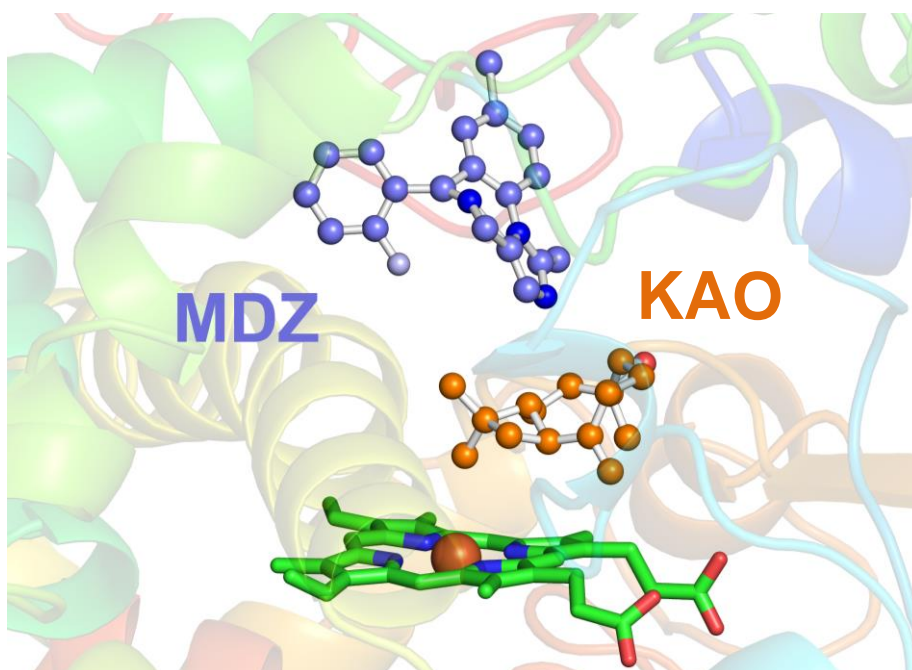
Testované látky	MDZ	MDZ+KAO	TST	TST+tNER
ΔG (kcal/mol)	-9,8	-4,5	-6,6	-3,6

Testované molekuly se váží nad hemem (obr. 36), interagují kromě hemu většinou s aminokyselinami I-helixu na obrázcích nalevo od hemu. Protože se seskviterpeny váží do podobné polohy jako prototypické substráty (MDZ a TST), mohou blokovat přístup substrátů k hemu a inhibovat enzym. Tato myšlenka je potvrzena hodnotami Gibbsových volných energií interakce MDZ a TST s CYP3A4 (-9,8 a -6,6 kcal/mol, viz tabulka 6), které jsou blízké vazebné energii seskviterpenů. Konkurenční vazebné polohy substrátů a seskviterpenů zřejmě přispěly k experimentálně pozorované inhibici. Je však třeba poznamenat, že za fyziologických podmínek je třeba vzít v úvahu další faktory, např. skutečnost, že katalytická aktivita CYP3A4 bude ovlivněna aktuálními lokálními koncentracemi interagujících sloučenin a také molekulární dynamikou obou interagujících partnerů (Berka *et al.* 2013, Paloncýová *et al.* 2014, Šrejber *et al.* 2018).



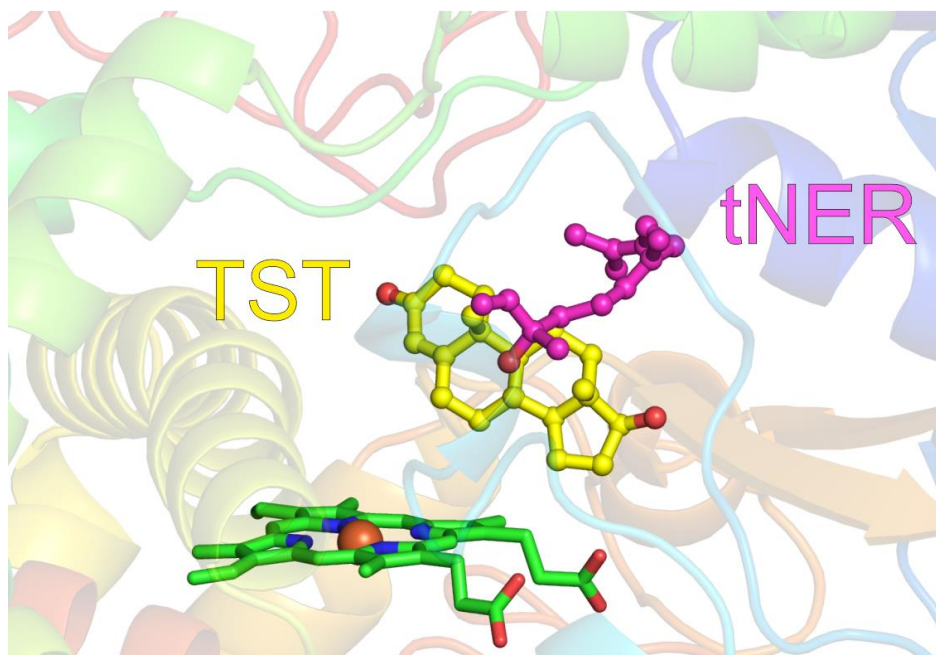
Obrázek 36: Preferovaná orientace samotných studovaných molekul (KAO, tNER, MDZ a TST) uvnitř aktivního místa CYP3A4 (PDB ID: 5A1R), jak bylo doloženo dokovacím experimentem. CYP3A4 je reprezentován sekundárními strukturními prvky (nalevo od hemu je umístěn helix I jako žlutá spirála), hem je znázorněn zeleným tyčinkovým modelem a ligandy tyčinkovým a kuličkovým modelem.

Dále byla provedena dokovací studie ukazující vazbu substrátů v přítomnosti vázaných seskviterpenů. Seskviterpeny, které byly schopné inhibovat aktivitu enzymu CYP3A4, byly KAO (inhibující významně 1'-hydroxylaci MDZ; viz obr. 26) a tNER (inhibující 6 β -hydroxylaci TST; viz obr. 30). Na obr. 37 je znázorněna vazba MDZ v přítomnosti KAO dokumentující přemístění MDZ ze středu aktivního místa, zatímco KAO obsazuje prostor nad hemem. To vysvětluje inhibici 1'-hydroxylace MDZ a je doloženo změnou ΔG MDZ z -9,8 kcal/mol na -4,5 kcal/mol, což ukazuje na snížení vazebné afinity MDZ (tabulka 6).



Obrázek 37: Vazba MDZ v přítomnosti KAO uvnitř aktivního místa CYP3A4 (PDB ID: 5A1R). CYP3A4 je reprezentován sekundárními strukturními prvky, hem je znázorněn zeleným tyčinkovým modelem, ligandy tyčinkovým a kuličkovým modelem; midazolam modře, β -karyofylen oxid oranžově.

Obdobně, přítomnost inhibující molekuly tNER v aktivním místě ovlivnila vazbu TST. tNER způsobil posun TST z původního vazebného místa (srv. polohu TST na obr. 36 a 38), což vedlo k inhibici 6 β -hydroxylace TST a ke změně ΔG TST z -6,6 kcal/mol na -3,6 kcal/mol, tedy opět ke snížení afinity TST k enzymu (tabulka 6).



Obrázek 38: Vazba TST v přítomnosti tNER uvnitř aktivního místa CYP3A4 (PDB ID: 5A1R). CYP3A4 je reprezentován sekundárními strukturními prvky, hem je znázorněn zeleným tyčinkovým modelem, ligandy tyčinkovým a kuličkovým modelem; testosteron žlutě, *trans*-nerolidol lila.

6. DISKUZE

Ačkoli jsou nutraceutika látkami přírodního původu, poskytující nejen základní nutriční hodnotu, ale i zdravotní přínosy, mohou u člověka značnou měrou interagovat s enzymovými systémy účastnicími se biotransformace léčiv. Vzhledem k perorálnímu užívání nutraceutik může k interakci s enzymy metabolismu léčiv docházet na všech úrovních metabolické cesty - absorpce, distribuce, metabolismu anebo exkrece (ADME). Nejvýznamnější jsou interakce na úrovni metabolismu léčiv s enzymy, které se zásadně podílejí na biotransformaci většiny podávaných léčiv – s lidskými jaterními cytochromy P450 (CYP).

Nejproslulejší interakcí nutraceutik s CYP je inhibice intestinálního CYP3A4 grapefruitovým džusem (He *et al.* 1998). Byl popsán případ z jara roku 2019, kdy 51-letý muž během léčby metadonem vypil asi 0,5 litru grapefruitového džusu denně. Zřejmě v důsledku inhibice CYP3A4 došlo k toxickému navýšení plazmatické koncentrace metadonu, následkem čehož nastoupily nežádoucí účinky opioidů – útlum dechu (Ershad *et al.* 2019). Pepin *et al.* uvedli ve své publikaci, že pití kyselých nápojů (pomerančového nebo grapefruitového džusu) může způsobit pomalejší rozpouštění acalabrutinibu v žaludku a způsobit tak neúplnou absorpci léčiva *in vivo* (Pepin *et al.* 2019). Enzymovou aktivitu CYP3A4 zřejmě může ovlivňovat více druhů citrusových plodů. Theile *et al.* (2017) popsal dva příklady, kdy u pacientů léčených takrolimem byla náhle zjištěna asi 2,5x vyšší plazmatická koncentrace takrolimu než v předchozích měřeních. Pacienti uvedli zvýšený příjem klementinek (*Citrus clementina*) v podzimním období. Po ukončení konzumace klementinek byla hladina takrolimu v plazmě pacientů asi během 14 dní navrácena do normálu. Vzhledem k nepřebornému množství léčiv biotransformovaných CYP3A4 může mít pití grapefruitového džusu a nadměrná konzumace citrusových plodů se současným užíváním léčiv nedožrnné důsledky.

Další velmi dobře známou interakcí nutraceutik s CYP je současné užívání léčiv a třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Třezalka tečkovaná je bylina široce užívaná u psychických poruch (Fujita 2004). K dostání je v čajích (porcovaných nebo sypaných) samostatně nebo ve směsi s jinými bylinami (obvykle s kozlíkem lékařským (*Valeriana officinalis*), meduňkou lékařskou (*Melissa officinalis*) apod.) nebo jako lihová tinktura. Ve formě tablet nebo tobolek bývá spolu s dalšími nutraceutiky užívána při depresích, anxiózních stavech, nespavosti, bolestech hlavy, bolestech svalů,

hypertenzi nebo během menopauzy (Gupta 2016). Jedna z účinných složek třezalky, hyperforin, je ligandem PXR a spouští zvýšenou expresi CYP3A4 (Anzenbacher & Zanger 2012). Zvýšená enzymová aktivita CYP3A4 může vést k rychlejšímu odbourávání léčiv (např. cyklosporin A, fenobarbital, fenytoin, perorální kontracepce), ke snížení terapeutického účinku daného léčiva a ke vzniku nežádoucích efektů. Vzhledem k faktu, že cílovou skupinou produktů („čistící čaj“, „ženský čaj“) s obsahem třezalky jsou zejména ženy, které mohou současně užívat perorální kontracepci, užívání třezalkových doplňků stravy u nich může vyvolat inter-menstruační a nepravidelné menstruační krvácení nebo nežádaná těhotenství (Berry-Bibee *et al.* 2016, Chrubasik-Hausmann *et al.* 2019, Opletal 2016). Další účinná látka třezalky tečkované, hypericin, vykazuje fototoxicitu nejen na pokožce, ale může také poškozovat zrak. Je tedy důležité během užívání doplňků stravy obsahujících třezalku tečkovanou chránit zrak před nadměrným osluněním (He *et al.* 2004).

Kořen třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) je nutraceutikum často užívané pro podporu imunity, zejména během nachlazení. Třapatka je k dostání ve formě čajů (samostatně nebo ve směsi), sirupů či kapek. Tablety, tobolky nebo pastilky většinou obsahují směs třapatky a dalších nutraceutik (např. vitamin C, ženšen, zinek) podporujících imunitu člověka. Lékové interakce současně podávaných léčiv s tímto doplňkem stravy pramení ze schopnosti třapatky inhibovat enzymovou aktivitu CYP1A2. Nežádoucí účinky tedy mohou nastat při současném užívání paracetamolu, warfarinu, diazepamu, theofylinu a dalších léčiv metabolizovaných tímto enzymem (Opletal 2016).

Jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*) je velmi oblíbeným doplňkem stravy užívaným jako nootropikum, při léčbě tinnitu, závratích, ztráty paměti, poruchy koncentrace atd. Nejčastější léková forma jinanu jsou tablety nebo tobolky (i v kombinacích, např. s luteinem, lecitinem, třapatkou nebo hořčíkem), je k dispozici i čaj nebo tinktura. Protidestičkové působení jinanu může zesilovat antikoagulační efekt léčiv snižujících srážlivost krve (Opletal 2016). Obdobné lékové interakce lze očekávat při kombinaci česneku (*Allium sativum* L.) nebo ženšenu (*Panax ginseng*) s warfarinem a dalšími antitrombotiky (Agbabiaka *et al.* 2017). Je také známá schopnost složek jinanového listu indukovat expresi CYP3A v lidských hepatocytech (Deng *et al.* 2008a).

Z výše uvedených důvodů je studium možných lékových interakcí nutraceutik s enzymy metabolismu léčiv velice důležité. Předkládaná disertační práce byla zaměřena na interakce vybraných nutraceutik, resp. seskviterpenů (β -karyofylenu (KAR), β -karyofylen oxidu (KAO), α -humulenu (HUM), *trans*-nerolidolu (tNER), *cis*-nerolidolu (cNER) a farnesolu (FAR)) s enzymy metabolismu xenobiotik první fáze - s cytochromy P450. Cílem bylo zjistit schopnost vybraných seskviterpenů ovlivňovat katalytickou aktivitu enzymů, charakterizovat mechanismus, kterým popřípadě nutraceutikum enzymy inhibuje, a pokusit se posoudit možné riziko lékových interakcí v případě současně podávaných léčiv metabolizovaných stejnými enzymy.

Léčebný potenciál výše zmíněných seskviterpenů je vysoký. Tyto přírodní látky vykazují významné biologické účinky, zejména antiproliferační a cytotoxický efekt, antioxidační, antimikrobiální, chemo-protektivní, antimykotický, antiparazitický a protizánětlivý účinek (Bártíková *et al.* 2014, Gupta 2016). Některé seskviterpeny mají schopnost zasahovat do buněčného cyklu nádorových linií anebo působit synergicky s dalšími protinádorovými léčivy (Ambrož *et al.* 2015, Ambrož *et al.* 2017). Jsou součástí farmaceuticky významných silic vyšších rostlin (*Asteraceae*, *Cactaceae*, *Solanaceae*, *Lamiaceae*, *Araceae*, *Piperaceae* a *Euphorbiaceae*) (Paduch *et al.* 2007), některých hub (*Allomyces macrogynus*, *Blastocladiaceae*) (Pommerville *et al.* 1990), bakterií a některých mořských bezobratlých organismů (Le Bideau *et al.* 2017).

Vzhledem k širokému rozšíření seskviterpenů v rostlinné říši jsou seskviterpeny běžnou součástí stravy anebo doplňků stravy člověka. Užití bylin obsahujících tyto látky je běžné v kuchyni ať v přípravě pokrmů (hřebíček, bazalka, dobromysl, zázvor, kmín, rozmarýn, skořice), nebo užívání ve formě nápojů (máta, meduňka, šalvěj, chmel), či jiným způsobem (konopí, tabák, borovice).

Studium interakcí seskviterpenů s cytochromy P450 bylo zaměřeno zejména na sledování vlivu seskviterpenů KAR, KAO, HUM, tNER, cNER a FAR na enzymovou aktivitu cytochromů P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) obsažených v lidské jaterní mikrosomální frakci *in vitro* a ověření výsledků získaných experimenty *in vitro* pomocí metod *in silico*. Studium interakcí seskviterpenů s CYP bylo provedeno za pomoci známých zavedených metod dle literatury (viz tabulka 5).

Experimentální výsledky ukazují, že β -karyofylen (KAR) neovlivnil významně enzymové aktivity jednotlivých CYP, pouze v případě CYP3A4 a specifického substrátu midazolamu (MDZ) KAR při koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v reakční směsi mírně snížil katalytickou aktivitu CYP3A4 přibližně na 50 % původní aktivity. Enzymové aktivity CYP2A6 a CYP2C19 byly tímto seskviterpenem ovlivněny mírně, v obou případech došlo ke snížení katalytické aktivity přibližně na 70 % původní aktivity (obr. 25).

α -humulen téměř neovlivňoval katalytickou aktivitu jednotlivých CYP. Pouze v případě CYP2B6 a CYP2C19 byla mírně snížena enzymová aktivita těchto CYP a to přibližně na 70 % původní aktivity (obr. 29).

Cis-nerolidol (cNER) vykazoval nižší inhibiční schopnost než *trans*-nerolidol (viz dále). Pouze v případě CYP3A4 a substrátu MDZ byla tato enzymová aktivita snížena na 45 %, zatímco v případě markerového substrátu testosteronu (TST) byla enzymová aktivita CYP3A4 cNER snížena méně (na 65 %). Na rozdíl od tNER, však byla více ovlivněna enzymová aktivita CYP3A4 za použití substrátu MDZ, než tomu bylo v případě TST (obr. 33).

Farnesol (FAR) téměř neovlivnil enzymové aktivity testovaných CYP. Pouze v případě CYP2A6 byla u nejvyšší použité koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ snížena katalytická aktivita tohoto enzymu (na 45 %, obr. 34).

β -karyofylen oxid (KAO) ovlivnil enzymové aktivity řady CYP (CYP2A6, CYP2C8 a CYP2C19), u nejvyšší použité koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ přibližně na 60 % původní aktivity (obr. 26). V případě CYP3A4 a přeměny prototypického substrátu MDZ na 1'-hydroxymidazolam byla tato enzymová aktivita snížena až na 28 % ($\text{IC}_{50} = 14,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), zatímco v případě markerového substrátu TST nebyla tato aktivita CYP3A4 významně ovlivněna (na 63 % původní aktivity). Následující experimenty při čtyřech koncentračních úrovních specifického substrátu MDZ ($0,5 K_M = 1,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $K_M = 2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 K_M = 4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $4 K_M = 8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pak poskytly výsledky pro zjištění typu inhibice. Z těchto dat byly sestrojeny výnosy podle Dixona a Lineweavera–Burka (Segel 1993) a byla vypočtena inhibiční konstanta ($K_i = 46,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Analýza inhibičního mechanismu naznačuje smíšený typ inhibice (obr. 27 a 28). Smíšená inhibice je případem, kdy dochází (do různé míry) k vazbě inhibitoru na enzym, ale rovněž k vazbě inhibitoru na komplex enzym-substrát, a dokonce i k vazbě substrátu na komplex enzym-inhibitor. Jsou tedy ovlivněny obě základní charakteristiky enzymové reakce, maximální

rychlost i Michaelisova konstanta. Takový stav je popisován (Cornish-Bowden 2004, Segel 1993) jako stav s prvky kompetitivní i nekompetitivní inhibice a označuje se jako inhibice smíšená. Pod označením „smíšená inhibice“ je možné zahrnout *de facto* různé typy inhibice; je možné tak označit i akompetitivní inhibici a rovněž nekompetitivní inhibici ve stacionárním stavu. Ze srovnání s diagnostickými kriterii vyplývá nejspíše označení jako smíšená inhibice (Kotyk & Horák 1977).

Trans-nerolidol (tNER) při $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci v reakční směsi mírně ovlivnil enzymovou aktivitu CYP2C19, která byla snížena přibližně na 50 % původní aktivity (obr. 30). tNER také ovlivňoval enzymovou aktivitu CYP3A4, ale odlišným způsobem než KAO. tNER při $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci v reakční směsi inhiboval enzymovou aktivitu CYP3A4 (substrát TST) na 28 % původní aktivity ($\text{IC}_{50} = 46,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Rovněž byly provedeny experimenty při čtyřech koncentračních úrovních specifického substrátu TST ($0,5 K_M = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $K_M = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 K_M = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a $4 K_M = 400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pro identifikaci typu inhibice. Sestrojené výnosy (obr. 31 a 32) podle Dixona a Lineweavera–Burka (Segel 1993) vypovídají opět o smíšeném typu inhibice ($K_i = 32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Obdobně jako v případě KAO se jedná nejspíše o smíšenou inhibici, která ovlivňuje katalytické vlastnosti enzymu, a to jak maximální rychlost enzymové reakce, tak afinitu substrátu k enzymu (Cornish-Bowden 2004, Segel 1993, Kotyk & Horák 1977).

Zajímavostí je, že oba seskviterpeny KAO a tNER mají schopnost inhibovat enzymovou aktivitu CYP3A4, ale každý vůči různým prototypickým substrátům (MDZ a TST). KAO se silně vázal do aktivního místa pro substrát MDZ, což dokládá *in silico* vypočtená hodnota Gibbsovy volné energie $\Delta G = -7,6 \text{ kcal/mol}$. Poté přistupující substrát MDZ již nebyl schopen pevné vazby do aktivního místa enzymu, důkazem je snížení Gibbsovy volné energie midazolamu z $-9,8 \text{ kcal/mol}$ na $-4,5 \text{ kcal/mol}$ v přítomnosti KAO (tabulka 6). tNER interaguje s CYP3A4 v podobné oblasti aktivního místa enzymu ($\Delta G = -6,6 \text{ kcal/mol}$). Proto je vazebná energie TST v přítomnosti inhibitoru tNER také snížena a to téměř o polovinu (z $-6,6 \text{ kcal/mol}$ na $-3,6 \text{ kcal/mol}$, viz tabulka 6).

Tyto rozdíly ve schopnosti KAO a tNER inhibovat enzymovou aktivitu CYP3A4 lze vysvětlit různou specifitou CYP3A4 vůči různým substrátům (TST a MDZ) a rozdílnou vazbou daného substrátu v aktivním místě enzymu. Přeměna MDZ

na 1'-hydroxymidazolam je více inhibována působením KAO ($IC_{50} = 14,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), než je tomu v případě 6 β -hydroxylace TST *trans*-nerolidolem ($IC_{50} = 46,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Nicméně rozdíl v inhibičních koncentracích IC_{50} je nevelký, zhruba trojnásobný. Inhibiční konstanty jsou v obou případech velmi podobné ($K_{i(\text{KAO})} = 46,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ($K_{i(\text{tNER})} = 32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), což vypovídá o podobné specifitě inhibičních reakcí.

Inhibiční studie s KAR, KAO, HUM, tNER, cNER a FAR nebyly, kromě našich výsledků, dosud publikovány. Lněničková *et al.* pozorovali indukci exprese CYP2B a CYP3A *in vivo* podáváním KAO a tNER myším v dávce 50 mg/kg (Lněničková *et al.* 2018). Naopak experimentální výsledky Šadibolové *et al.*, kde sledovali vliv totožných seskviterpenů KAR, KAO, HUM, tNER, cNER a FAR na aktivitu enzymů první fáze metabolismu pomocí jaterních řezů, uvádějí, že, ačkoliv jsou zmiňované seskviterpeny agonisty PXR, nevyvolávají zvýšení exprese enzymů první fáze metabolismu (Šadibolová *et al.* 2019).

Pimkaew *et al.* prováděli obdobné experimenty se složkami kurkumy (*Curcuma longa*). Zjistili, že seskviterpeny zedederon a germakron způsobují hepatotoxicitu a indukují expresi (zřejmě aktivací CAR a PXR) CYP2B6 a CYP3A4 v kultivovaných lidských hepatocytech (Pimkaew *et al.* 2013a, Pimkaew *et al.* 2013b). Dále zedederon a germakron mírně inhibují enzymovou aktivitu lidských jaterních mikrosomálních CYP (CYP2B6 a CYP3A4). Zatímco v našich experimentech nebylo ovlivnění enzymové aktivity CYP2B6 seskviterpeny pozorováno, experimentální výsledky inhibičních studií s CYP3A4 *in vitro* korelují s našimi výsledky. Pimkaew *et al.* pozorovali inhibici enzymové aktivity CYP3A4 za použití specifického substrátu midazolamu ($IC_{50(\text{zederon})} = 9,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $IC_{50(\text{germakron})} = 2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ale přeměna substrátu TST nebyla inhibována, podobně jako v případě inhibičního vlivu KAO na CYP3A4 zjištěného v našich experimentech.

Další studie zaměřená na interakce složek divoké kurkumy (*Curcuma aromatica* Salisb.) uvádí inhibiční vliv seskviterpenů (4S,5S)-(+)-germakron-4,5-epoxidu na enzymovou aktivitu čistých lidských CYP za použití odlišných specifických substrátů, než jaké byly aplikovány v našich experimentech: CYP3A4; substrát 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin ($IC_{50} = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), CYP2C9; substrát 7-methoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin ($IC_{50} = 7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a CYP1A2 3-kyano-7-ethoxykumarin ($IC_{50} = 33,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Bamba *et al.* 2011).

Podobně jako v případě KAO a tNER (Lněničková *et al.* 2018) a zedederonu a germakronu (Pimkaew *et al.* 2013b), α -bilobalid, seskviterpen přítomný v listech jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*), signifikantně zvyšoval expresi CYP2B a CYP3A v primární kultuře potkaních i lidských hepatocytů (Deng *et al.* 2008b), avšak neinhiboval významně enzymovou aktivitu CYP *in vitro* (von Moltke *et al.* 2004). Jiný seskviterpen α -bisabolol, složka esenciálního oleje heřmánku (*Matricaria recutita* L.) má schopnost inhibovat enzymovou aktivitu CYP2C9 ($IC_{50} = 46,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), CYP2D6 ($IC_{50} = 2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a CYP3A4 ($IC_{50} = 15,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Ganzera *et al.* 2006).

Hodnocení možnosti interakcí seskviterpenů s podanými léčivými je obtížné, především vzhledem k tomu, že data o hladinách těchto látek v lidské krevní plazmě nejsou k dispozici; z pokusů na modelových experimentálních zvířatech jsou data ukazující plazmatické koncentrace u myši okolo $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při podání množství α -humulenu 150 mg/kg (Chaves *et al.* 2008). Takové hladiny by po převodu mohly odpovídat poměrům u člověka; nicméně, dalším faktorem ztěžujícím přímé úvahy v tomto smyslu je rozdíl v obsahu látek (často o několik řádů) v jednotlivých kultivarech rostlin (Gupta 2016).

Tato disertační práce se soustředila na studium interakcí vybraných seskviterpenů (β -karyofylenu (KAR), β -karyofylen oxidu (KAO), α -humulenu (HUM), *trans*-nerolidolu (tNER), *cis*-nerolidolu (cNER) a farnesolu (FAR)) na katalytickou aktivitu enzymů první fáze metabolismu cytochromů P450 (CYP) *in vitro* a *in silico*. Ze získaných experimentálních výsledků vyplývá, že testované seskviterpeny KAO a tNER mají schopnost ovlivňovat enzymovou aktivitu nejvýznamnějšího enzymu první fáze metabolismu, CYP3A4. Působí však na enzymovou aktivitu CYP3A4 rozdílným způsobem. KAO snižoval schopnost CYP3A4 přeměňovat specifický substrát midazolam (MDZ) na 1'-hydroxymidazolam, zatímco tNER bránil metabolické přeměně testosteronu (TST) na jeho 6β -hydroxyderivát. Tyto interakce byly potvrzeny experimentem *in silico*, kdy se Gibbsova volná energie (ΔG) substrátu MDZ v přítomnosti KAO snížila z $-9,8 \text{ kcal/mol}$ na $-4,5 \text{ kcal/mol}$. Obdobně byla ΔG substrátu TST v přítomnosti tNER snížena z $-6,6 \text{ kcal/mol}$ na $-3,6 \text{ kcal/mol}$.

Výsledky *in vitro* i *in silico* ukazují, že v případě nadměrné konzumace stravy a doplňků stravy obsahujících seskviterpeny KAO a tNER by mohlo dojít k ovlivnění katalytické aktivity CYP3A4 a z toho plynoucím nežádoucím lékovým interakcím. Tyto úvahy by bylo ale nutné ověřit detailnějšími studiemi *in vivo*.

7. ZÁVĚR

V této disertační práci byly sledovány interakce vybraných seskviterpenů β -karyofylenu (KAR), β -karyofylen oxidu (KAO), α -humulenu (HUM), *trans*-nerolidolu (tNER), *cis*-nerolidolu (cNER) a farnesolu (FAR) s nejvýznamnějšími enzymy první fáze metabolismu - cytochromy P450 (CYP), s cílem zjistit inhibiční potenciál daného nutraceutika, charakterizovat mechanismus, kterým nutraceutikum případně enzymy inhibuje, a pokusit se posoudit možné riziko lékových interakcí v případě současně podávaných léčiv metabolizovaných stejnými enzymy.

Experimenty *in vitro* byly realizovány pomocí lidských jaterních mikrosomálních CYP za použití prototypických substrátů odrážejících enzymovou aktivitu devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4). Metodiky detekce metabolitů specifických substrátů byly v souladu se světovou literaturou. Některé výsledky experimentů byly potvrzeny metodou molekulového modelování *in silico*.

Z výsledků jednotlivých experimentů vyplývají následující poznatky:

- Seskviterpen β -karyofylen oxid vykazuje schopnost interagovat s lidským jaterním mikrosomálním CYP3A4 za použití specifického substrátu midazolamu. Hodnota inhibiční konstanty K_i $46,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indikuje relativně specifickou interakci β -karyofylen oxidu s CYP3A4. β -karyofylen oxid se chová jako smíšený inhibitor.
- Seskviterpen *trans*-nerolidol rovněž vykazuje schopnost interagovat s lidským jaterním mikrosomálním CYP3A4, ovšem za použití specifického substrátu testosteronu. Obdobně jako v předchozím případě, hodnota K_i $32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indikuje relativně specifickou interakci *trans*-nerolidolu s CYP3A4 a rovněž se *trans*-nerolidol chová jako smíšený inhibitor.

- Interakce dvou seskviterpenů β -karyofylen oxidu a *trans*-nerolidolu s CYP3A4 byly ověřeny a potvrzeny experimentem *in silico*. Hodnota Gibbsovy volné energie (ΔG) interakce substrátem midazolamem byla v přítomnosti β -karyofylen oxidu snížena z -9,8 kcal/mol na -4,5 kcal/mol. Obdobně byla ΔG v případě substrátu testosteronu v přítomnosti *trans*-nerolidolu snížena z -6,6 kcal/mol na -3,6 kcal/mol.

Výsledky *in vitro* a *in silico* experimentů v předkládané disertační práci naznačují, že v případě nadměrné a neuvážené konzumace stravy a doplňků stravy obsahujících seskviterpeny β -karyofylen oxid a *trans*-nerolidol by mohlo dojít ke snížení katalytické aktivity CYP3A4. Vzhledem k velkému významu CYP3A4 v metabolismu xenobiotik mohou z těchto interakcí plynout nežádoucí účinky současně podávaných léčiv biotransformovaných CYP3A4. Tyto domněnky by bylo ovšem nutné ověřit detailnějšími experimenty *in vivo*.

8. SOUHRN

Cílem předkládané disertační práce bylo posoudit možné interakce vybraných nutraceutik, resp. seskviterpenů – β -karyofylenu (KAR), β -karyofylen oxidu (KAO), α -humulenu (HUM), *trans*-nerolidolu (tNER), *cis*-nerolidolu (cNER) a farnesolu (FAR) s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450 *in vitro*, zjistit inhibiční potenciál daného nutraceutika, charakterizovat mechanismus, kterým nutraceutikum případně enzymy inhibuje a také nastínit mechanismus možné inhibice enzymové aktivity CYP seskviterpeny pomocí molekulového modelování *in silico*.

Experimenty *in vitro* byly realizovány pomocí lidských jaterních mikrosomálních CYP za použití prototypických substrátů odrážejících enzymovou aktivitu devíti nejvýznamnějších CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4). Některé výsledky experimentů byly potvrzeny metodou molekulového modelování *in silico*.

Z výsledků jednotlivých experimentů vyplývá, že seskviterpen KAO vykazuje schopnost interagovat s lidským jaterním mikrosomálním CYP3A4 za použití specifického substrátu midazolamu ($K_i = 46,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Seskviterpen tNER je rovněž schopen interagovat s lidským jaterním mikrosomálním CYP3A4, ovšem za použití specifického substrátu testosteronu ($K_i = 32,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V obou případech se jedná o smíšený typ inhibice. Testované seskviterpeny KAR, HUM, cNER a FAR nevykazovaly významný inhibiční vliv na enzymovou aktivitu CYP.

Interakce dvou seskviterpenů KAO a tNER s CYP3A4 byly ověřeny a potvrzeny experimentem *in silico*. Gibbsova volná energie (ΔG) substrátu midazolamu byla v přítomnosti KAO snížena z $-9,8 \text{ kcal/mol}$ na $-4,5 \text{ kcal/mol}$. Obdobně byla ΔG substrátu testosteronu v přítomnosti tNER snížena z $-6,6 \text{ kcal/mol}$ na $-3,6 \text{ kcal/mol}$.

Výsledky *in vitro* a *in silico* experimentů v předkládané disertační práci naznačují, že v případě nadměrné a neuvážené konzumace stravy a doplňků stravy obsahujících seskviterpeny KAO a tNER by mohlo dojít ke snížení katalytické aktivity CYP3A4. Vzhledem k velké významnosti role CYP3A4 v metabolismu xenobiotik mohou z těchto interakcí plynout nežádoucí účinky současně podávaných léčiv biotransformovaných CYP3A4. Tyto úvahy by bylo ale nutné ověřit detailnějšími studiemi *in vivo*.

9. SUMMARY

The aim of this work was to determine possible interactions of some nutraceuticals, resp. sesquiterpenes – β -caryophyllene (KAR), β -caryophyllene oxide (KAO), α -humulene (HUM), *trans*-nerolidol (tNER), *cis*-nerolidol (cNER) and farnesol (FAR) with human liver microsomal cytochromes P450 *in vitro*, to determine inhibitory potential of the this nutraceuticals, eventually to characterize the mechanism of inhibition and also to outline the mechanism of possible inhibition of CYP enzyme activity by sesquiterpenes using *in silico* molecular modeling.

In vitro experiments were performed using human liver microsomal CYPs and their prototypic substrates reflecting enzyme activity of the nine major CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4). Some results of experiments were confirmed by *in silico* molecular modeling.

It can be concluded based on the results that sesquiterpene KAO has the ability to interact with human liver microsomal CYP3A4 using a specific substrate of midazolam ($K_i = 46.6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Sesquiterpene tNER is also able to interact with human liver microsomal CYP3A4, but using testosterone as a specific substrate ($K_i = 32.5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). In both cases a mixed type of inhibition was found. Sesquiterpenes KAR, HUM, cNER and FAR no significant inhibitory effect on the enzyme activity of the CYPs was found.

The interaction of two sesquiterpenes KAO and tNER with CYP3A4 was verified and confirmed by *in silico* experiment. The Gibbs free energy (ΔG) of the midazolam substrate was reduced from -9.8 kcal/mol to -4.5 kcal/mol in the presence of KAO. Similarly, the ΔG of testosterone substrate in the presence of tNER was reduced from -6.6 kcal/mol to -3.6 kcal/mol.

The results of *in vitro* and *in silico* experiments in the presented thesis suggest that excessive and ill-considered consumption of dietary supplements and food supplements containing sesquiterpenes, KAO and tNER, could lower the catalytic activity of CYP3A4. Due to the important role of CYP3A4 in the metabolism of xenobiotics, these interactions may result in adverse effects of simultaneously administered CYP3A4 drugs biotransformed by CYP3A4. However, these hypotheses should be verified by more detailed *in vivo* studies.

SEZNAM LITERATURY

AbouLaila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., Igarashi, I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. *Parasitol Int*, 2010, 59(2):278-82.

Agbabiaka, T.B., Wider, B., Watson, L.K., Goodman, C. Concurrent Use of Prescription Drugs and Herbal Medicinal Products in Older Adults: A Systematic Review. *Drugs Aging*, 2017, 34(12):891-905.

Agúndez, J.A. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(6):520–531.

Ambrož, M., Boušová, I., Skarka, A., Hanušová, V., Králová, V., Matoušková, P., Sztórková, B., Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from myrica rubra on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules*, 2015, 20(8), str. 15343-15358.

Ambrož, M., Matoušková, P., Skarka, A., Zajdlová, M., Žáková, K., Skálová, L. The Effects of Selected Sesquiterpenes from Myrica rubra Essential Oil on the Efficacy of Doxorubicin in Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. *Molecules*, 2017, 22(6): E1021.

Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(5-6):737-47.

Anzenbacher, P., Zanger U.M. Metabolism of drugs and other xenobiotics. Weinheim, Německo: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012, s. 724.

Anzenbacherová, E., Bec, N., Anzenbacher, P., Hudeček, J., Souček, P., Jung, C., Munro, A.W., Lange, R. Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *Eur J Biochem*, 2000, 267(10):2916-20.

Backman, J.T., Filppula, A.M., Niemi, M., Neuvonen, P.J. Role of Cytochrome P450 2C8 in Drug Metabolism and Interactions. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(1):168-241.

Badyal, D.K., Desai, C. Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(3):257-65.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2):446-75.

Bamba, Y., Yun, Y.S., Kunugi, A., Inoue, H. Compounds isolated from Curcuma aromatica Salisb. inhibit human P450 enzymes. *J Nat Med*, 2011, 65(3-4):583-7.

Bártíková H, Hanušová V, Skálová L, Ambrož M, Boušová I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14(22):2478-94.

Belic, A., Tóth, K., Vrzal, R., Temesvári, M., Porrogi, P., Orbán, E., Rozman, D., Dvorak, Z. Monostory K. Dehydroepiandrosterone post-transcriptionally modifies CYP1A2 induction involving androgen receptor. *Chem Biol Interact*, 2013, 203(3):597-603.

- Benkaidali, L., André, F., Moroy, G., Tangour, B., Maurel, F., Petitjean, M. Four Major Channels Detected in the Cytochrome P450 3A4: A Step toward Understanding Its Multispecificity. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4).
- Berka, K., Paloncýová, M., Anzenbacher, P., Otyepka, M. Behavior of human cytochromes P450 on lipid membranes. *J Phys Chem B*, 2013, 117(39):11556-64.
- Berry-Bibee, E.N., Kim, M.J., Tepper, N.K., Riley, H.E., Curtis, K.M. Co-administration of St. John's wort and hormonal contraceptives: a systematic review. *Contraception*, 2016, 94(6):668-677.
- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2012, 10:325-347.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94(3):223-53.
- Cashman, J.R., Perotti, B.Y., Berkman, C.E., Lin, J. Pharmacokinetics and molecular detoxication. *Environ Health Perspect*, 1996, 104 Suppl 1:23-40.
- Cornish-Bowden, A., Fundamentals of enzyme kinetics. 4th, completely revised and greatly enlarged edition. ed. 2012, Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. xviii, s. 498.
- Crespi, C.L., Chang, T.K., Waxman, D.J. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of CYP2C8-Catalyzed Paclitaxel 6 α -Hydroxylation. *Methods Mol Biol*, 2006a, 320:103-107.
- Crespi, C.L., Chang, T.K., Waxman, D.J. Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol*, 2006b, 320:109-13.
- Crespi, C.L., Chang, T.K., Waxman, D.J. CYP2C19-mediated (S)-mephenytoin 4'-hydroxylation assayed by high-performance liquid chromatography with radiometric detection. *Methods Mol Biol*, 2006c, 320:115-9.
- Crespi, C.L., Chang, T.K., Waxman, D.J. CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Methods Mol Biol*, 2006d, 320:121-5.
- Deng, Y., Bi, H.C., Zhao, L.Z., Wang, X.D., Chen, J, Ou, Z.M., Ding, L., Xu, L.J., Guan, S., Chen, X., Zhou, S.F., Huang, M. Induction of cytochrome P450 3A by the Ginkgo biloba extract and bilobalides in human and rat primary hepatocytes. *Drug Metab Lett*, 2008a, 2(1):60-6.
- Deng, Y., Bi, H.C., Zhao, L.Z., He, F, Liu, Y.Q., Yu, J.J., Ou, Z.M., Ding, L., Chen, X., Huang, Z.Y., Huang, M., Zhou, S.F. Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the Ginkgo biloba extract EGb 761 in rats. *Xenobiotica*, 2008b, 38(5):465-81.

- Donato, M.T., Jiménez, N., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(7):699-706.
- Dowd, F., Johnson, B., Mariotti, A. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 7th Edition. Elsevier, USA, 2017, s. 723.
- Dušek, K., Večeřová-Procházková, A. Diagnostika a terapie duševních poruch: 2., přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2015, s. 648.
- Ekroos, M., Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(37):13682-7.
- el Hadri, A., Gomez del Rio, M.A., Sanz, J., González-Coloma, A., Idaomar, M., Ribas Ozonas, B., Benedi, J., Sanchez Reus, M.I. Cytotoxic activity of alpha-humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anal Real Acad Nal Farm*, 2010, 76:343-356.
- Ershad, M., Cruz, M.D., Mostafa, A., Mckeever, R., Vearrier, D., Greenberg, M.I. Opioid, Toxidrome Following Grapefruit Juice Consumption in the Setting of Methadone Maintenance. *J Addict Med*, 2019, [Epub ahead of print].
- European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions. London, 2012, s. 59. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf (čteno 16.10.2019).
- Fender, A.C., Dobrev, D. Bound to bleed: How altered albumin binding may dictate warfarin treatment outcome. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2019, 22:214-215.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol*, 2007, 569(3):228-36.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strządała, L., Szumny, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med*, 2016, 5(10):3007-3017.
- Fogazzi, G.B., Cantù, M., Saglimbeni, L., Daudon, M. Amoxicillin, a rare but possible cause of crystalluria. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(1):212-4.
- Food and Drug Administration. Clinical Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, and Clinical Implications Guidance for Industry. USA, 2017, s. 32. <https://www.fda.gov/media/82734/download> (čteno 16.10.2019).
- Fujita, K. Food-drug interactions via human cytochrome P450 3A (CYP3A). *Drug Metabol Drug Interact*, 2004, 20(4):195-217.
- Gaedigk, A., Simon, S.D., Pearce, R.E., Bradford, L.D., Kennedy, M.J., Leeder, J.S. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83(2):234-42.

- Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T., Leeder, J.S. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*, 2017, 19(1):69-76.
- Ganzer, M., Schneider, P., Stuppner, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci*, 2006, 78(8):856-61.
- Gerbai-Chaloin, S., Pascussi, J.M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J.M., Carrère, N., Maurel, P. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(3):242-51.
- Ghosal, A., Satoh, H., Thomas, P.E., Bush, E., Moore, D. Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24(9):940-7.
- Gonzalez, F.J., The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(1):1-8.
- Gorski, J.C., Huang S.M., Pinto, A., Hamman, M.A., Hilligoss, J.K., Zaheer, N.A., Desai, M., Miller, M., Hall, S.D. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(1):89-100.
- Grizzle, A.J., Horn, J., Collins, C., Schneider, J., Malone, D.C., Stottlemeyer, B., Boyce, R.D. Identifying Common Methods Used by Drug Interaction Experts for Finding Evidence About Potential Drug-Drug Interactions: Web-Based Survey. *J Med Internet Res*, 2019, 21(1):e11182.
- Groves, J.T. Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3e, edited by Paul R, Ortiz de Montellano. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005, 1-43.
- Guengerich, F.P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv*, 2003, 3(4):194-204.
- Guengerich, F.P. Human Cytochromes P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3e, edited by Paul R, Ortiz de Montellano. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005, 377-530.
- Guengerich, F.P., Johnson W.W. Kinetics of Ferric Cytochrome P450 Reduction by NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Rapid Reduction in the Absence of Substrate and Variations among Cytochrome P450 Systems. *Biochemistry*, 1997, 36(48):14741-50.
- Guengerich, F.P., Johnson W.W., Shimada, T., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Langouët, S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat Res*, 1998, 402(1-2):121-8.
- Guengerich, F.P., Martin, M.V., Beaune, P.H., Kremers P., Wolff, T., Waxman, D.J. 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*, 1986, 261(11): 5051-60.

- Gupta, R.C. *Nutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity*. USA: Elsevier Inc. 2016, s. 1022.
- Han, J., Xian, Z., Zhang, Y., Liu, J., Liang, A. Systematic Overview of Aristolochic Acids: Nephrotoxicity, Carcinogenicity, and Underlying Mechanisms. *Front Pharmacol*, 2019,10:648.
- Hayes, A.W., Kruger. C.L. *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*. London: CRC Press, 6th Edition, 2014, s. 2184.
- He, K., Iyer, K.R., Hayes, R.N., Sinz, M.W., Woolf, T.F., Hollenberg, P.F. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11(4):252-9.
- He, Y.Y., Chignell, C.F., Miller, D.S., Andley, U.P., Roberts, J.E. Phototoxicity in human lens epithelial cells promoted by St. John's Wort. *Photochem Photobiol*, 2004, 80(3):583-6.
- Hendrychová, T., Anzenbacherová, E., Hudeček, J., Skopalík, J., Lange R., Hildebrandt, P., Otyepka, M., Anzenbacher, P. Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(1):58-68.
- Hendrychová, T., Berka, K., Navrátilová, V., Anzenbacher, P., Otyepka, M. Dynamics and hydration of the active sites of mammalian cytochromes P450 probed by molecular dynamics simulations. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(2):177-89.
- Hukkanen, J. Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012, (5):569-85.
- Chauret, N., Gauthier, A., Nicoll-Griffith, D.A. Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1998, Jan;26(1):1-4.
- Chavan, M.J., Wakte, P.S., Shinde, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 2010, 17:149-151.
- Chaves, J.S., Leal, P.C., Pianowisky, L., Calixto, J.B. Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene alpha-humulene in mice. *Planta Med*, 2008, 74(14):1678-83.
- Chhibber-Goel, J., Singhal, V., Parakh, N., Bhargava, B., Sharma, A. The Metabolite Trimethylamine-N-Oxide is an Emergent Biomarker of Human Health. *Curr Med Chem*, 2017, 24(36):3942-3953.
- Cho, H.J., Yoon, I.S. Pharmacokinetic interactions of herbs with cytochrome p450 and p-glycoprotein. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:736431.
- Ioannides, C. *Cytochromes P450. Role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics*. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008, s. 521.

- Chrubasik-Hausmann, S., Vlachoianis, J., McLachlan, A.J. Understanding drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): impact of hyperforin content. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(1):129-138.
- Jančová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2010, 154(2):103-16.
- Javed, H., Azimullah, S., Khair, S.B.A., Ojha, S., Haque, M.E. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. *BMC Neurosci*, 2016, 17(1):58.
- Joo, J.H., Jetten, A.M. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett*, 2010, 287(2):123-35.
- Juřica, J., Dostálek, M., Konečný, J., Glatz, Z., Hadašová, E., Tomandl, J. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1-2):571-7.
- Kadiev, E., Patel, V., Rad, P., Thankachan, L., Tram, A., Weinlein, M., Woodfin, K., Raffa, R.B., Nagar, S. Role of pharmacogenetics in variable response to drugs: focus on opioids. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(1):77-91.
- Kamel, A., Harriman, S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discov Today Technol*, 2013, 10(1):e177-89.
- Kaminsky, L.S., Zhang, Z.Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther*, 1997, 73(1):67-74.
- Kiang, T.K., Ensom, M.H., Chang, T.K. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther*, 2005, 106(1):97-132.
- Kirchheiner, J., Nickchen, K., Bauer, M., Wong, M.L., Licinio, J., Roots, I., Brockmüller, J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(5):442-73.
- Klein K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., Zanger, U.M. Pathway-Targeted Pharmacogenomics of CYP1A2 in Human Liver. *Front Pharmacol*, 2010, 1:129.
- Kliwer, S.A., Goodwin, B., Willson, T.M. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev*, 2002, 23(5):687-702.
- Kohout, P. Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky, *Klin Farmakol Farm*, 2010, 24(1): 47–50.
- Kojima K, Nagata K, Matsubara T, Yamazoe Y. Broad but distinct role of pregnane x receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2007, 22(4):276-86.
- Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol*, 1989, 36(1):89-96.

- Kotyk, A., Horák, J. Enzymová kinetika. Praha: Academia, 1977, s. 268.
- Ku, C.M., Lin, J.Y. Farnesol, a sesquiterpene alcohol in essential oils, ameliorates serum allergic antibody titres and lipid profiles in ovalbumin-challenged mice. *Allergol Immunopath*, 2016, 44(2): 149–159.
- Ku, C.M., Lin, J.Y. Farnesol, a Sesquiterpene Alcohol in Herbal Plants, Exerts Anti-Inflammatory and Antiallergic Effects on Ovalbumin-Sensitized and -Challenged. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:387357.
- Květina, J., Grundmann, M. Farmakologické interakce. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2003, 1: 17-21.
- Le Bideau, F., Kousara, M., Chen, L., Wei, L., Dumas, F. Tricyclic Sesquiterpenes from Marine Origin. *Chem Rev*, 2017, 117(9):6110-6159.
- Lee, J.H., Kim, C., Kim, S.H., Sethi, G., Ahn, K.S. Farnesol inhibits tumor growth and enhances the anticancer effects of bortezomib in multiple myeloma xenograft mouse model through the modulation of STAT3 signaling pathway. *Cancer Lett*, 2015, 360(2):280-93.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, 2003, 69:402-407.
- Leite, P.M., Martins, M.A.P., Castilho R.O. Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:14-21.
- Lin, J.H., Lu, A.Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 35(5):361-90.
- Lněničková, K., Svobodová, H., Skálová, L., Ambrož, M., Novák, F., Matoušková, P. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. *Xenobiotica*, 2018, 48(11):1089-1097.
- Lucas, D., Menez, J.F., Berthou, F. Chlorzoxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Methods Enzymol*, 1996, 272:115-23.
- Mathews, J.M., Etheridge, A.S., Black, S.R. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(11):1153-7.
- Martínková, J., Grim, J., Hojdíková, H., Chládek, J., Chládková, J., Kulda, K., Libiger, J. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s. 2018, s. 520.
- McDonald, M.G., Au, N.T., Rettie, A.E. P450-Based Drug-Drug Interactions of Amiodarone and its Metabolites: Diversity of Inhibitory Mechanisms. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(11):1661-9.
- Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliever, S.A. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(13):7500-2.

- Morse, M.A., Lu, J. High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 708(1-2):290-3.
- Murphy, S.E. Nicotine Metabolism and Smoking: Ethnic Differences in the Role of P450 2A6. *Chem Res Toxicol*, 2017, 30(1):410-419.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1):1-42.
- Niwa, T., Yamazaki, H. Comparison of cytochrome P450 2C subfamily members in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(8):1145-59.
- Nunoya, K., Yokoi, Y., Kimura, K., Kodama, T., Funayama, M., Inoue, K., Nagashima, K., Funae, Y., Shimada, N., Green, C., Kamataki, T. (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502) as a novel substrate for cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 277(2):768-74.
- Omura, T., Sato, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem*, 1964, 239:2370-8.
- Opletal, L. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, sv. 3. Nutraceutika. Sekundární metabolity rostlin. Praha: Karolinum, 2016, s. 700.
- Otyepka, M., Berka, K., Anzenbacher, P. Is There a Relationship Between the Substrate Preferences and Structural Flexibility of Cytochromes P450? *Current Drug Metabolism*, 2012, 13, 130-142.
- Pan, Z., Wang, S.K., Cheng, X.L., Tian, X.W., Wang, J. Caryophyllene 439 oxide exhibits anti-cancer effects in MG-63 human osteosarcoma cells via the inhibition of cell migration, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2016, 11:817-823.
- Paduch, R., Kandefér-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007, 55(5):315-27.
- Palonciová, M., DeVane, R., Murch, B., Berka, K., Otyepka, M. Amphiphilic drug-like molecules accumulate in a membrane below the head group region. *J Phys Chem B*, 2014, 118(4):1030-9.
- Park, K.R., Nam, D., Yun, H.M., Lee, S.G., Jang, H.J., Sethi, G., Cho, S.K., Ahn, K.S. beta-caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 2011, 312:178-188.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*. 2008, 82(10):667-715.

- Pepin, X.J.H., Moir, A.J., Mann, J.C., Sanderson, N.J., Barker, R., Meehan, E., Plumb, A.P., Bailey, G.R., Murphy, D.S., Krejsa C.M., Andrew, M.A., Ingallinera, T.G., Slatter, J.G. Bridging in vitro dissolution and in vivo exposure for acalabrutinib. Part II. A mechanistic PBPK model for IR formulation comparison, proton pump inhibitor drug interactions, and administration with acidic juices. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 142:435-448.
- Perlík, F. *Základy klinické farmakologie*. První vydání. Praha: Galén, 2008, s. 192.
- Petřek, M., Košinová, P., Koča, J., Otyepka, M. MOLE: a Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels. *Structure*, 2007, 15(11):1357-63.
- Petřek, M., Otyepka, M., Banáš, P., Košinová, P., Koča, J., Damborský, J. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*, 2006,7:316.
- Phillips, I.R., Shephard, E.A. Drug metabolism by flavin-containing monooxygenases of human and mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13(2):167-181.
- Phillips, I.R., Shephard, E.A. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(6):294-301.
- Pimkaew, P., Suksen, K., Somkid, K., Chokchaisiri, R., Jariyawat, S., Chuncharunee, A., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P. Zederone, a sesquiterpene from *Curcuma elata* Roxb, is hepatotoxic in mice. *Int J Toxicol*, 2013a, 32(6):454-62.
- Pimkaew, P., Küblbeck, J., Petsalo, A., Jukka, J., Suksamrarn, A., Juvonen, R., Auriola, S., Piyachaturawat, P., Honkakoski, P. Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrene with the human cytochrome P450 system. *Toxicol In Vitro*, 2013b, 27(6):2005-12.
- Pommerville, J.C., Strickland, J.B., Harding, K.E. Pheromone interactions and ionic communication in gametes of aquatic fungus *Allomyces macrogynus*. *J Chem Ecol*, 1990, 16(1):121-31.
- Potužák, M., Potužáková, J. *Přednášky z farmakognosie, fytofarmaka, nutraceutika*. MILLS, s.r.o. Praha 2006.
- Rahman, A., Korzekwa, K.R., Grogan, J., Gonzalez, F.J., Harris, J.W. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res*, 1994, 54(21):5543-6.
- Riley, R.J., Grime, K., Weaver, R. Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007, 3(1):51-66.
- Ritter, J.K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact*, 2000, 129(1-2):171-93.
- Rogerio, A.P., Andrade, E.L., Leite, D.F.P., Figueiredo, C.P., Calixto, J.B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. *Br J Pharmacol*, 2009, 158:1074-1087.

- Sangkuhl, K., Klein, T.E., Altman, R.B. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20(7):463-5.
- Saito, A.Y., Marin Rodriguez, A.A., Menchaca Vega, D.S., Sussmann, R.A.C., Kimura, E.A., Katzin, A.M. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(6):641-646.
- Sanner, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J Mol Graph*, 1999, 17:57-61.
- Santhanasabapathy, R., Sudhandiran, G. Farnesol attenuates lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in Swiss albino mice by regulating intrinsic apoptotic cascade. *Brain Res*, 2015, 1620:42-56.
- Shield, A.J., Thomae, B.A., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Weinshilboum, R.M. Human catechol *O*-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(2):151-160.
- Segel, I.H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Wiley-Interscience, New York, 1993, 100-224.
- Schenkman, J.B., Jansson, I. Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods Mol Biol*, 2006, 320:11-8.
- Silva, M.P., de Oliveira, R.N., Mengarda, A.C., Roquini, D.B., Allegretti, S.M., Salvadori, M.C., Teixeira, F.S., de Sousa, D.P., Pinto, P.L.S., da Silva Filho, A.A., de Moraes, J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 50(3):467-472.
- Souček P. Novel sensitive high-performance liquid chromatographic method for assay of coumarin 7-hydroxylation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 29;734(1):23-9.
- Spagnuolo, P. Interactions Between Nutraceutical Supplements and Standard Acute Myeloid Leukemia Chemotherapeutics. *J Pharm Pharm Sci*, 2015, 18(4):339-43.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek P. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*, 1999, 93:229-237.
- Stamer, U.M., Stüber F. Codeine and tramadol analgesic efficacy and respiratory effects are influenced by CYP2D6 genotype. *Anaesthesia*, 2007, 62(12):1294-5; author reply 1295-6.
- Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. DNA Adducts Formed by Aristolochic Acid Are Unique Biomarkers of Exposure and Explain the Initiation Phase of Upper Urothelial Cancer. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10) E2144.
- Strassburg, C.P. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(5):555-71.
- Suchý, D., Komzárková, I., Grundmann, M. Základní charakteristiky vybraných imunopresiv. *Klin Farmakol Farm*, 2004, 18(2): 90-95.

- Surh, Y.J. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfoconjugation. *Chem Biol Interact*, 1998, 109(1–3):221–235.
- Szűcs, G., Murlasits, Z., Török, S., Kocsis, G.F., Pálóczi, J., Görbe, A., Csont, T., Csonka, C., Ferdinandy, P. Cardioprotection by Farnesol: Role of the Mevalonate Pathway. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013, 27(4):269-77.
- Šadibolová, M., Zárybnický, T., Smutný, T., Pávek, P., Šubrt, Z., Matoušková, P., Skálová, L., Boušová, I. Sesquiterpenes Are Agonists of the Pregnane X Receptor but Do Not Induce the Expression of Phase I Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): E4562.
- Šrejber, M., Navrátilová, V., Paloncýová, M., Bazgier, V., Berka, K., Anzenbacher, P., Otyepka, M. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J Inorg Biochem*, 2018, 183:117-136.
- Theile, D., Hohmann, N., Kiemel, D., Gattuso, G., Barreca, D., Mikus, G., Haefeli, W.E., Schwenger, V., Weiss, J. Clementine juice has the potential for drug interactions - *In vitro* comparison with grapefruit and mandarin juice. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 97:247-256.
- Tiihonen, J., Hallikainen, T., Lachman, H., Saito, T., Volavka, J., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Ryyänänen, O.P., Koulu, M., Carvonen, M.K., Pohjalainen, T., Syvälahti, E., Hietala, J. Association between the functional variant of the catechol-*O*-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Mol Psychiatry*, 1999, 4(3):286-289.
- Tolson, A.H., Wang, H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(13):1238-49.
- Trott, O., Olson, A.J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem*, 2010, 31:455-461.
- Tsuda, N., Watari, H., Ushijima, K. Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(2):241-53.
- Ujiie, S., Sasaki, T., Mizugaki, M., Ishikawa, M., Hiratsuka, M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine *S*-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18(10):887–893.
- Van Booven, D., Marsh, S., McLeod, H., Carrillo, M.W., Sangkuhl, K., Klein, T.E., Altman, R.B. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20(4):277-81.
- van Puijenbroek, E.P., Egberts, A.C., Heerdink, E.R., Leufkens, H.G. Detecting drug-drug interactions using a database for spontaneous adverse drug reactions: an example with diuretics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 56(9-10):733-8.

von Moltke, L.L., Weemhoff, J.L., Bedir, E., Khan, I.A., Harmatz, J.S., Goldman, P., Greenblatt, D.J. Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(8):1039-44.

Wang, X., Shi, G.R., Liu, Y.F., Li, L., Chen, R.Y., Yu, D.Q. Aristolochic acid derivatives from the rhizome of *Aristolochia championii*. *Fitoterapia*, 2017, 118:63-68.

Williamson, G., DuPont, M.S., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Musk, S.R.R., Fenwick, G.R., Rhodes, M.J.C. Induction of glutathione S'-transferase activity in hepG2 cells by extracts from fruits and vegetables. *Food Chem*, 1997, 60(2):157-160.

Zanger, U.M., Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1):103-41.

Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M. Functional pharmacogenetics /genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(6):1093-108.

Zhou, S.F., Wang, B., Yang, L.P., Liu, J.P. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev*, 2010, 42(2):268-354.

Žourková, A., Hadašová, E., Pulkrábková, L., Robeš, M., Ravčuková, B. Léčba antidepressivny: volba dle aktivity CYP2D6 a pohlaví. *Čes a slov Psychiat*, 2006, 102(4):183-188.

SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

1. Práce související s disertační prací

- Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF:

Špičáková, A., Szotáková, B., Dimunová, D., Myslivečková, Z., Kubíček, V., Ambrož, M., Lněničková, K., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L. Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. *Molecules*, 2017, 22:1-11.

DOI 10.3390/molecules22040509

Nguyen, LT., Myslivečková, Z., Szotáková, B., **Špičáková, A.**, Krasulová, K., Anzenbacher, P. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. *Chem Biol Interact*, 2017, 278:123-128.

DOI 10.1016/j.cbi.2017.10.021

V tisku:

Špičáková A., Bazgier V., Skálová L., Otyepka M., Anzenbacher P. β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol affect enzyme activity of CYP3A4 – *in vitro* and *in silico* studies. *Physiol Res*, 2019.

- Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Špičáková, A., Szotáková, B., Myslivečková, B., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L. Evaluation of possible inhibition of human liver drug metabolizing cytochromes P450 by nerolidol and farnesol. *Interdiscip Toxicol*, 10(Suppl. 1):36. *TOXCON 2017*, 21.-23.6.2017, Plzeň -posterová prezentace.

Špičáková, A., Szotáková, B., Myslivečková, B., Anzenbacher, P., Skálová, L. Evaluation of possible inhibition of human liver drug metabolizing cytochromes P450 by cyclic sesquiterpenes. *Interdiscip Toxicol*, 10(Suppl. 2):48. 67. *Česko-Slovenské farmakologické dny*, 2.-4.10.2017, Stará Lesná, Slovensko - posterová prezentace.

Špičáková, A., Krasulová, K., Dvořák, Z., Anzenbacher, P. Metabolismus léčiv: Příklady porozumění některým zákonitostem na molekulární úrovni. Sborník abstrakt, str. 27. *XXII. Biologické dny 2019, Moderní trendy biomedicínského výzkumu*, 9.-10.9.2019, Brno – ústní prezentace.

Špičáková, A., Bazgier, V., Skálová, L., Otyepka, M., Anzenbacher, P. Inhibitory effect of β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on enzyme activity of CYP3A4 – *in vitro* and *in situ* studies. Sborník abstrakt, str. P34. 69. *Česko-Slovenské farmakologické dny*, 11.-13.9.2019, Praha - posterová prezentace.

2. Ostatní publikace v oblasti metabolismu xenobiotik

- Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF:

Anzenbacherová, E., **Veinlichová, A.**, Mašek, V., Anzenbacher, P. Comparison of "high throughput" micromethods for determination of cytochrome P450 activities with classical methods using HPLC for product identification. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005, 148(2):353-356.

Matal, J., Orság, J., Nekvindová, J., Anzenbacherová, E., **Veinlichová, A.**, Anzenbacher, P. Experimental approaches to studies on drug metabolism and drug interaction in man: interaction of acyclic nucleoside phosphonates with human liver cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenase 3. *Neuroendocrinol Lett*, 2006, 27(Suppl. 2):27-36.

Nekvindová, J., Mašek, V., **Veinlichová, A.**, Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Zídek, Z. Inhibition of human liver microsomal cytochrome activities by adefovir and tenofovir., *Xenobiotica: the fate of foreign compounds in biological systems (online verze)*, 2006, 36(12):1166-1177.

Jančová, P., Anzenbacherová, E., Papoušková, B., Lemr, K., Lužná, P., **Veinlichová, A.** Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *DMD*, 2007, 35(11):2035-2039.

Matal, J., Anzenbacherová, E., **Veinlichová, A.**, Nobilis, M., Anzenbacher, P. Interaction of nabumetone with cytochromes P450 *in vitro*: comparison of the man and pig. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2007, 151(S1):53-54.

Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Zídek, Z., Buchar, E., Kmoníčková, E., Potměšil, P., Nekvindová, J., **Veinlichová, A.**, Holý, A. *In vivo* study of the effect of antiviral acyclic nucleotide phosphonate (R)-9-[2-(phosphonomethoxy)-propyl]adenine (PMPA, tenofovir) and its prodrug tenofovir disoproxil fumarate on rat microsomal cytochrome P450. *Physiol Res*, 2008, 57(5):761-767.

Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., **Tunková, A.**, Adamus, M. Možné interakce rokuronia s jaterními mikrosomálními cytochromy P450. *Klin Farmakol Farm*, 2009, 23(3):108-110.

Matal, J., Matušková, Z., **Tunková, A.**, Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. *Neuroendocrinol Lett*, 2009, 30(Suppl.):36-40.

Veinlichová, A., Jančová, P., Šiller, M., Anzenbacher, P., Kuča, K., Jun, D., Fusek, J., Anzenbacherová, E. Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K-48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 *in vitro*. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(3):449-453.

Matal, J., **Tunková, A.**, Šiller, M., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Isolation of two cytochrome P450 forms, CYP2A19 and CYP1A, from pig liver microsomes. *J Vet Pharmacol Therap*, 2009, 32(5):470-476.

Matušková, Z., **Tunková, A.**, Anzenbacherová, E., Večeřa, R., Šiller, M., Tlaskalová-Hogenová, H. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats. *Neuroendocrinol Lett*, 2010, 31(Suppl. 2):46-50.

Matušková, Z., Šiller, M., **Špičáková, A.**, Anzenbacherová, E., Zachařová, A., Tlaskalová-Hogenová, H. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and the activity of cytochromes P450 and on the CYP mRNA level in the intestine and the liver of male rats. *Neuroendocrinol Lett*, 2011, 32(1):8-14.

Zachařová, A., Šiller, M., **Špičáková, A.**, Anzenbacherová, E. Škottová, N., Anzenbacher, P. Rosuvastatin suppresses the liver microsomal CYP2C11 and CYP2C6 expression in male Wistar rats. *Xenobiotica*, 2012, 42(8):731-736.

Kopečná Zapletalová, M., Vanduchová, A., **Špičáková, A.**, Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Interaction of anthocyanins with human liver microsomal cytochromes P450, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2013, 157 (Suppl. 1): S56-S59.

Anzenbacherová, E., **Špičáková, A.**, Jourová, L., Ulrichová, J., Adamus, M., Bachleda, P. Interaction of rocuronium with human liver cytochromes P450, *J Pharmacol Sci*, 2015, 127(2):190-195.

Špičáková, A., Anzenbacher, P., Lišková, B., Kuča, K., Fusek, J., Anzenbacherová, E. Evaluation of possible inhibition of human liver drug metabolizing cytochromes P450

by two new acetylcholinesterase oxime-type reactivators, *Food Chem Toxicol*, 2016, 88:100-104.

- Prvoautorské přednášky/postery přednesené na veřejných odborných fórech

Veinlichová, A., Mašek, V., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Srovnání "HIGH THROUGHPUT" mikrometod stanovení aktivit cytochrom P450 a klasických metod s použitím HPLC. Sborník abstrakt, str. 41. *XXIII. Xenobiochemické symposium*, 16.-19.5.2005, Valtice - posterová prezentace.

Veinlichová, A., Nekvindová, J., Mašek, V., Jančová, P., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Strnad, M. Influence of aromatic cytokinins on activities of human liver microsomal cytochromes P450. Sborník abstrakt přednášek, str. 21. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6189959216*, 18.-20.5.2006, Sepetná – ústní prezentace.

Veinlichová, A., Mašek, V., Anzenbacher, P., Janalík, J., Anzenbacherová, E. Interaction of aromatic cytokinins with human liver microsomal cytochromes P450. Sborník abstrakt přednášek, str. 10. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6189959216*, 15.-16.12.2006, Olomouc – ústní prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, E., Šiller, M., Jančová, P., Kuča, K., Anzenbacher, P. Example of interaction of potential drugs (acetylcholinesterase reactivators) with human liver microsomal cytochromes P450. Sborník abstrakt přednášek, str. 11-12. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6189959216*, 24.-26.5.2009, Hustopeče - ústní prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, E., Šiller, M., Jančová, P., Kuča, K., Jun, D., Anzenbacher, P. Interaction of two acetylcholinesterase reactivators with human liver microsomal cytochromes P450. *Interdiscip Toxicol*, 2(2):155. *14th Interdisciplinary Toxicology Conference*, 1.-3.6.2009, Brno - posterová prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Adamus, M. Interakce rokuronia s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450. Sborník abstrakt, str. 50. *XXV. Xenobiochemické symposium*, 22.-25.9.2009, Mikulov - posterová prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, E., Kuča, K., Jun, D., Fusek J., Anzenbacher, P. Interaction of acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 with human liver microsomal cytochromes P450. Sborník abstrakt, str. 4. *Biotechnologie v medicíně*, 27.5.-29.5.2010, Vílanec u Jihlavy - ústní prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, E., Kuča, K., Jun, D., Fusek J., Anzenbacher, P. Binding of new acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 to human microsomal cytochromes P450 and inhibition of their activities. *Interdiscip Toxicol*, 3(3):89. *TOXCON 2010: Borderless toxicology*, 6.-10.9.2010, Stará Lesná, Slovensko - posterová prezentace.

Tunková, A., Anzenbacherová, Jančová, P., Křen, V., Anzenbacher, P. Effect of model flavonolignan on metabolism of warfarin in rats *in vitro*. *Interdiscip Toxicol*, 4(2):63-64. *TOXCON 2011*, 17.-20.5.2011, Praha - posterová prezentace.

Špičáková, A., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. Interaction of anthocyanidins with human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4 *in vitro*. *F E B S Journal*, 279: 403-404. *22nd IUBMB and 37th FEBS*, 4.-9.9.2012, Sevilla, Španělsko - posterová prezentace.

Špičáková, A., Anzenbacher, P., Kuča, K., Anzenbacherová, E. Evaluation of possible inhibition of human liver drug metabolizing cytochromes P450 by two acetylcholinesterase oxime-type reactivators. *VRI*, sborník abstrakt, str. 49. *XXIX. Xenobiochemické symposium*, 24.-26.5.2017, Telč - posterová prezentace.

Špičáková, A., Kraus, P., Anzenbacher, P., Strnad, M. Interaction of new potential anticancer drugs with human liver microsomal cytochromes. *Interdiscip Toxicol*, 11(1): 105. *TOXCON 2018: 23rd Interdisciplinary Toxicology Conference*, 19.-22.6.2018, Stará Lesná, Slovensko - posterová prezentace.

Špičáková, A., Kraus, P., Anzenbacher, P., Strnad, M. New potential anticancer drugs and their effect on human liver microsomal cytochromes P450. Sborník abstrakt, str. 121. 68. *Česko-Slovenské farmakologické dny*, 5.-7.9.2018, Hradec Králové - posterová prezentace.

Špičáková, A., Kraus, P., Strnad, M., Anzenbacher, P. Interaction of novel CDK inhibitors with human liver cytochromes P450. *Interdiscip Toxicol*, 9(12) Suppl. 1: 46-47. *24. Mezioborové toxikologická konference TOXCON 2019*, 26.-28.6.2019, Vyhne, Slovensko - posterová prezentace.