

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium interakcí derivátů oxaliplatiny s lidskými
cytochromy P450**

Bakalářská práce

Autor:	Monika Harvanová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5.5.2011

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 5.5.2011

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu Mgr. Vlastimilovi Maškovi, Ph.D. za odborné vedení, paní doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za cenné připomínky a pracovníkům Ústavu farmakologie LF UPOL za všestrannou pomoc, kterou mi během řešení bakalářské práce poskytovali. V neposlední řadě děkuji také panu Mgr. Pavlovi Štarhovi, Ph.D. za poskytnutí testovaných látek.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Monika Harvanová
Název práce	Studium interakcí derivátů oxaliplatin s lidskými cytochromy P450
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Práce je studiem interakcí vybraných forem cytochromů P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) se čtyřmi deriváty oxaliplatin obsahujícími roskovitin anebo jeho methoxy-derivát jako ligand. Potenciální protinádorová aktivita těchto látek je založena na inhibici cyklin-dependentních kinas, proteinů účastnících se v regulaci buněčného cyklu. Interakce testovaných látek s cytochromy P450 se projevila v inhibici enzymatických aktivit jednotlivých forem. Významná inhibice enzymové aktivity testovanými látkami při koncentraci 200 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byla prokázána pro CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4. Klinicky významná inhibice enzymové aktivity byla určena při očekávané plasmatické koncentraci testovaných látek, kterou lze pravděpodobně srovnávat s plasmatickou hladinou oxaliplatin - 11 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Z experimentu vyplynula klinicky významná inhibice cytochromu P450 3A4, který byl testovanými látkami inhibován o více než 60%.</p>
Klíčová slova	cytochromy P450, oxalipatina, roskovitin
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Monika Harvanová
Title	Study of interactions of oxaliplatin derivatives with human cytochromes P450
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Pharmacology , Faculty of Medicine, Palacky University at Olomouc
Supervisor	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>The purpose of this thesis is the study of interactions of selected forms of cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) with four oxaliplatin derivatives containing roscovitine or its methoxy-derivative as a ligand. Potential anticancer activity of these substances is based on the inhibition of cyclin-dependent kinases, proteins involved in cell cycle control. Interaction of tested compounds with cytochrome P450 has reflected in inhibition of enzymatic activities of selected forms. Significant inhibition of enzyme activity has been demonstrated for CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 at concentrations 200 and 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Clinically significant inhibition of enzyme activity was determined at the expected plasma concentrations of tested substances, which is probably comparable to plasma level of oxaliplatin - 11$\mu\text{mol.l}^{-1}$. The experiment resulted in clinically significant inhibition of cytochrome P450 3A4 which was inhibited by tested substances by more than 60%.</p>
Keywords	cytochromes P450, oxaliplatin, roscovitine
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

ÚVOD.....	- 7 -
TEORETICKÁ ČÁST	- 8 -
1. LIDSKÉ CYTOCHROMY P450.....	- 8 -
1.1 ÚVOD.....	- 8 -
1.2 NÁZVOSLOVÍ	- 9 -
1.3 STUDOVANÉ FORMY CYTOCHROMŮ P450	- 10 -
1.3.1 Cytochrom P450 1A2.....	- 10 -
1.3.2 Cytochrom P450 2A6.....	- 10 -
1.3.3 Cytochrom P450 2B6.....	- 11 -
1.3.4 Cytochrom P450 2C.....	- 11 -
1.3.5 Cytochrom P450 2D6.....	- 11 -
1.3.6 Cytochrom P450 2E1	- 12 -
1.3.7 Cytochrom P450 3A4.....	- 12 -
1.4 STRUKTURA	- 13 -
1.5 KATALYTICKÁ AKTIVITA A REAKTIVITA.....	- 14 -
2. INTERAKCE CYTOCHROMŮ P450 SE XENOBIOTIKY	- 16 -
2.1 ÚVOD.....	- 16 -
2.2 INDUKCE.....	- 16 -
2.3 INHIBICE	- 17 -
3. STUDIUM INHIBICE CYTOCHROMŮ P450 DERIVÁTY PLATINY	- 19 -
3.1 CISPLATINA A JEJÍ DERIVÁTY	- 19 -
3.2 EFEKT PLATINOVÝCH KOMPLEXŮ NA AKTIVITU CYTOCHROMŮ P450	- 20 -
3.3 STUDOVANÉ DERIVÁTY OXALIPLATINY	- 21 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 23 -
LITERATURA	- 24 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 27 -

Cíle práce

- studium interakcí vybraných derivátů oxaliplatiny s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450, konkrétně formami CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4
- charakterizace interakcí pomocí specifických enzymatických aktivit na základě přeměny markerových substrátů forem CYP a stanovení inhibice enzymatické aktivity
- určení klinicky významně inhibovaných forem cytochromů P450

Úvod

V terapii nádorových onemocnění je již několik desetiletí známá cisplatina, jejíž protinádorová aktivita byla prokázána v roce 1969. V souvislosti s jejím úspěšným využitím, ale hlavně s cílem snížit negativní účinky na lidské zdraví je zájmem vědy syntetizovat další analoga této sloučeniny. V nedávné době byly testovány deriváty jejího neaktivního geometrického isomeru – transplatiny. Objevují se i účinná analoga platinových derivátů druhé generace – karboplatiny a oxaliplatiny. Bylo prokázáno, že některé látky ze skupiny derivátů platiny s protinádorovou aktivitou inhibují cytochromy P450 – enzymy, které se účastní důležitých biosyntetických reakcí a reakcí I. fáze biotransformace xenobiotik, hlavně léčiv. Metabolismus léčiva může být omezen při současném podání s protinádorovou látkou, která inhibuje formu cytochromu P450 podílející se na jeho biotransformaci. Prokázaná inhibice může znemožnit nebo omezit využití potenciálního léčiva.

Tato práce je studiem interakcí cytochromů P450 se čtyřmi deriváty oxaliplatiny obsahujícími roskovitin anebo jeho methoxy-derivát jako ligand. Roskovitin je selektivním inhibitorem cyklin-dependentních kinas – enzymů regulujících buněčný cyklus, který byl nedávno úspěšně testován *in vivo* u pacientů s nádorovým onemocněním plic. Výsledky studia poskytují informace o interakcích těchto látek s cytochromy P450 a přispívají tak k posouzení možnosti využití těchto látek v terapii s ohledem na lékové interakce.

Teoretická část

1. Lidské cytochromy P450

1.1 Úvod

Cytochrom P450 (*EC 1.14.14.1*) označuje velkou skupinu enzymů účastnících se na důležitých biosyntetických a biotransformačních reakcích. Je možné předpokládat, že tato skupina enzymů je přítomna ve všech živých organismech, jelikož formy cytochromů P450 byly nalezeny u bakterií (s výjimkou enterobakterií, např. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) (Guengerich, 2003), rostlin a různých živočišných druhů. Z evolučního hlediska se jedná o velmi starý systém hemoproteinů, který se objevil mnohem dříve než např. hemoglobin (Stiborová, 1999).

U bakterií je počet známých objevených forem cytochromů P450 více než 20 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Předpokládá se, že mikroorganismy využívají tyto enzymy k hydroxylaci organických látek, které po této aktivaci mohou sloužit jako zdroj energie (Stiborová, 1999). Celkový počet cytochromů P450 u rostlin, určený studiem genomu *Arabidopsis thaliana* převyšuje číslo 300. Rostlinné cytochromy P450 jsou zahrnuty v syntéze pigmentů a rostlinných regulátorů a v syntéze rostlinných toxinů (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Na lidské cytochromy P450 se soustřeďuje největší pozornost. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé formy cytochromů P450 (Guengerich, 2003), které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin. Tyto enzymy jsou zahrnuty v biosyntéze nízkomolekulárních látek s regulační funkcí, jako jsou steroidy, prostaglandiny, tromboxan, deriváty mastných kyselin a deriváty kyseliny retinové, které se účastní na různých úrovních procesů v lidském organismu. Lidské cytochromy P450 hrají důležitou roli i v biotransformaci endogenních, ale zejména exogenních látek. Exogenními substráty těchto enzymů jsou xenobiotika. V první fázi biotransformace jsou přeměňovány na polárnější produkty, které pak mohou být vyloučeny z organismu a nedochází k jejich bioakumulaci.

Převážná většina lidských cytochromů P450 podílejících se na oxidaci xenobiotik je exprimována v játrech. Cytochromy P450 mohou být produkovány i v mimojaterních tkáních – v mozku, plicích, ledvinách, kůži (např. CYP3A4). Většina je vázána na membránu endoplasmatického retikula, 5 z těchto enzymů se primárně vyskytuje v mitochondriích

(Guengerich, 2002). Játra jsou hlavním oxidačním místem léčiv a jiných xenobiotik. I navzdory nízkým koncentracím cytochromů P450 v extrajaterních tkáních hrají i tyto enzymy důležitou roli v metabolismu.

Majoritní zastoupení v biotransformaci xenobiotik mají formy cytochromů P450 patřící do rodin 1-3, konkrétně formy CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Procentuální podíl jednotlivých forem na biotransformaci zahrnuje tab.1.

Tab.1 Podíl jednotlivých forem cytochromů P450 na metabolismu léčiv u člověka

<i>CYP</i>	<i>zastoupení v játrech v %</i>	<i>podíl na biotransformaci v %</i>
1A2	12	3
2A6	4	< 1
2B6	0,2	< 1
2C	20	15
2D6	4	25
2E1	6	1
3A4	30	53

Upraveno dle: Květina & Grundman (2003)

1.2 Názvosloví

Pojmenování cytochrom P450 má původ v charakteristické vlastnosti těchto enzymů, kterou je UV absorpční maximum při 450 nm pokud jsou v komplexu s oxidem uhelnatým a v redukované formě. Velké množství objevených genů cytochromů P450 si vynutilo zavedení jednotné nomenklatury, která je založená na shodě sekvencí aminokyselin v proteinovém řetězci jednotlivých forem.

Od roku 1991 je používáno označení CYP, které je následováno arabskou číslicí označující číslo rodiny, např. CYP21 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Toto číslo je spojeno s funkcí enzymu (v konkrétním příkladě enzym působí jako steroid-21-hydroxylasa) anebo je voleno zcela libovolně. Enzymy náležící do jedné rodiny by měly mít podobnou sekvenci aminokyselin, limitem je 40% shody. Rodiny jsou dále diferencovány na podrodiny. Toto

členění je založeno na vyšší shodě sekvencí, která činí 55%. Podrodiny v rámci jedné rodiny jsou následně značeny např. CYP3A, CYP3B apod. Individuální členové rodiny nebo podrodiny jsou značeny arabskou číslicí, např. CYP3A4, CYP3A7. Pro označení nového individuálního člena by se měla nová sekvence cytochromu P450 lišit o více než 3%. (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

1.3 Studované formy cytochromů P450

1.3.1 Cytochrom P450 1A2

Cytochrom P450 1A2 po dlouhou dobu známý jako P-448 byl prvně charakterizován v jaterních mikrosomech u potkana po indukci methylcholanthrenem (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Dříve se předpokládalo, že je tento enzym „zlým“ P450 enzymem, který je odpovědný za nežádoucí účinky, jako je aktivace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a jiných karcinogenních toxických látek. U člověka nalezneme 2 členy CYP1A podrodiny: CYP1A1 a CYP1A2. První je lokalizován v mimojaterních tkáních a v jaterní tkáni přítomen pouze v malých množstvích po indukci, např. látkami obsaženými v cigaretovém kouři. CYP1A2 je hlavně jaterním enzymem, jehož substráty jsou aromatické aminy a PAH. Většina léčiv metabolizovaných CYP1A2 je substrátem i jiného cytochromu P450 a jejich metabolická dráha je obvykle velmi složitá.

Je známo, že hladina CYP1A2 se mění v závislosti na složení stravy. Pro příklad, rostliny čeledi *Brassicaceae* zvyšují aktivitu a rostliny čeledi *Apiaceae* snižují aktivitu CYP1A2. Substráty CYP1A2 jsou malé planární molekuly, převážně slabé báze (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

1.3.2 Cytochrom P450 2A6

Cytochrom P450 2A6 u člověka tvoří 4% z celkového množství P450. Metabolizuje substráty, které významně ovlivňují lidské zdraví, např. nikotin, nitrosaminy, kumarin, látky používané při léčbě AIDS (zidovudin, azidothymidin) (Stiborová, 1999).

1.3.3 Cytochrom P450 2B6

Hladina cytochromu P450 2B6 v lidském organismu je velmi nízká. Z celkového množství P450 tvoří CYP2B6 pouze 0,2% a hraje významnou roli v metabolismu protinádorových léčiv jako jsou cyklofosfamid a ifosfamid (Stiborová, 1999).

1.3.4 Cytochrom P450 2C

Tato podrodina CYP enzymů zahrnuje 4 hlavní členy: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10, CYP2C19. První z enzymů se nejeví jako moc důležitý v metabolismu léčiv, ukázalo se, že jeho substráty jsou pouze kyselina retinová (tretinoin), warfarin a paklitaxel. Na druhé straně, CYP2C9 a CYP2C19 metabolizují značně důležitá léčiva. CYP2C10 se liší od CYP2C9 málo ve struktuře a substrátové specifitě a tyto dva enzymy se často vyskytují společně. Typickými substráty CYP2C9 jsou nesteroidní protizánětlivé látky a hypoglykemika.

Substráty CYP2C9 jsou lipofilní látky aniontového charakteru. Substráty CYP2C19 jsou neutrální nebo slabě bazické a středně lipofilní molekuly schopné účastnit se tvorby vodíkové vazby. (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

1.3.5 Cytochrom P450 2D6

Cytochrom P450 2D6 je v lidském organismu kvantitativně málo zastoupen, avšak v podílu na metabolismu léčiv obsazuje druhé místo po CYP3A4. Tato forma cytochromu P450 je mezi lékaři a jinými zdravotními specialisty pravděpodobně nejpůlárnější, a to pro jeho genetický polymorfismus. Ten způsobuje přítomnost 3 hlavních fenotypů oxidativního metabolismu léčiv tohoto enzymu. Tyto 3 fenotypy jsou klasifikovány jako pomalí metabolizátoři, rychlí metabolizátoři, a ultrarychlí metabolizátoři (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Substráty CYP2D6 enzymu mají schopnost vázat bazický atom (dusíku), což vedlo ke spekulacím, že v aktivním místě obsahuje karboxylový zbytek. (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

1.3.6 Cytochrom P450 2E1

2E podrodina je prezentována u člověka v jedné formě označené jako 2E1. Tento enzym je známý pro účast v metabolismu etanolu a acetonu. CYP2E1 se účastní i metabolismu mnoha malých molekul jako jsou halogenované uhlovodíky, acetaldehyd, benzen a styren. Z léčiv je tento enzym schopen metabolizovat i těkavá anestetika jako je halotan, enfluran, isofluran chlorzoxason a další. Jinou skupinou substrátů CYP2E1 jsou nitrosaminy. Je známo více než deset genů CYP2E1, z nichž některé jsou spojeny s tvorbou proteinů s pozměněnou aktivitou. Aktivita CYP2E1 může poklesnout účinkem některých látek obsažených v potravinách, jako je například diallylsulfát obsažený v česneku nebo v cibuli (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Jako substráty CYP2E1 vystupují malé molekuly, hydrofilní a neutrální povahy. Se substrátem jsou v aktivním místě tvořeny jedna nebo dvě vodíkové vazby. (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

1.3.7 Cytochrom P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 je nejdůležitějším z enzymů P450, které se účastní metabolismu léčiv u člověka. Jeho důležitost nevyplývá pouze z jeho hladiny v játrech, která může dosáhnout až 60% z celkového cytochromu P450, ale hlavně z účasti v metabolismu většiny léčiv se známou metabolickou dráhou. Naneštěstí se jedná o nestabilní enzym s komplikovaným mechanismem účinku, což přispívá ke ztížení možnosti studia *in vitro*. Jak vyplývá z hladiny známého endogenního metabolického produktu 6 β -hydroxykortisolu, aktivita enzymu CYP3A4 se mění během dne, a to s maximem večer mezi 17 a 21 hodinou (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

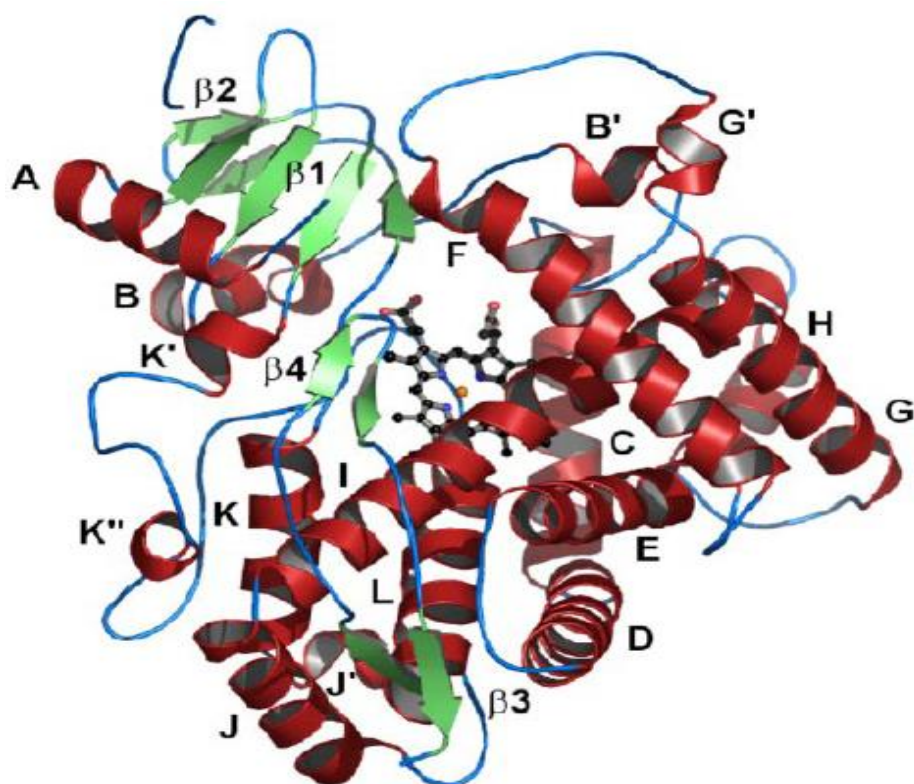
Spektrum známých léčiv, které jsou metabolizovány enzymem CYP3A4 je velmi široké. Z léčiv, které jsou substráty CYP3A4 jsou to hlavně blokátory kalciových kanálů dihydropyridinové struktury (např. nifedipin), některá makrolidová antibiotika (např. erytromycin) a azolová antimykotika (např. klotrimazol, ketokonazol).

1.4 Struktura

Struktury forem cytochromů P450 se vyznačují společnými znaky a na obecné úrovni jsou si velice podobné. Proteinová struktura je založená na sérii helixů a smyček. Helixy jsou označeny písmeny A až L. Helixy I a L jsou kontaktním místem pro hem. Residua helixu B a helix I jsou vazebným místem pro substrát. Jiným helixem, který je kontaktním místem pro substrát je helix F (Guengerich, 2002) (obr. 2).

Nejkonzervativnější částí sekvence cytochromu P450 je oblast obsahující cystein, který vystupuje jako thiolátový ligand hemového železa. Do těchto míst vedly zásahy při experimentech s místně řízenou mutagenezí ke změně katalytické selektivity (Guengerich, 2002). Tato sekvence je unikátní pro každý cytochrom P450 a je identifikačním znakem.

Další strukturně vysoce konzervativní část představuje oblast kolem treoninu, který společně se sousední kyselinou glutamovou tvoří část transportního protonového systému (viz. kapitola 1.5).

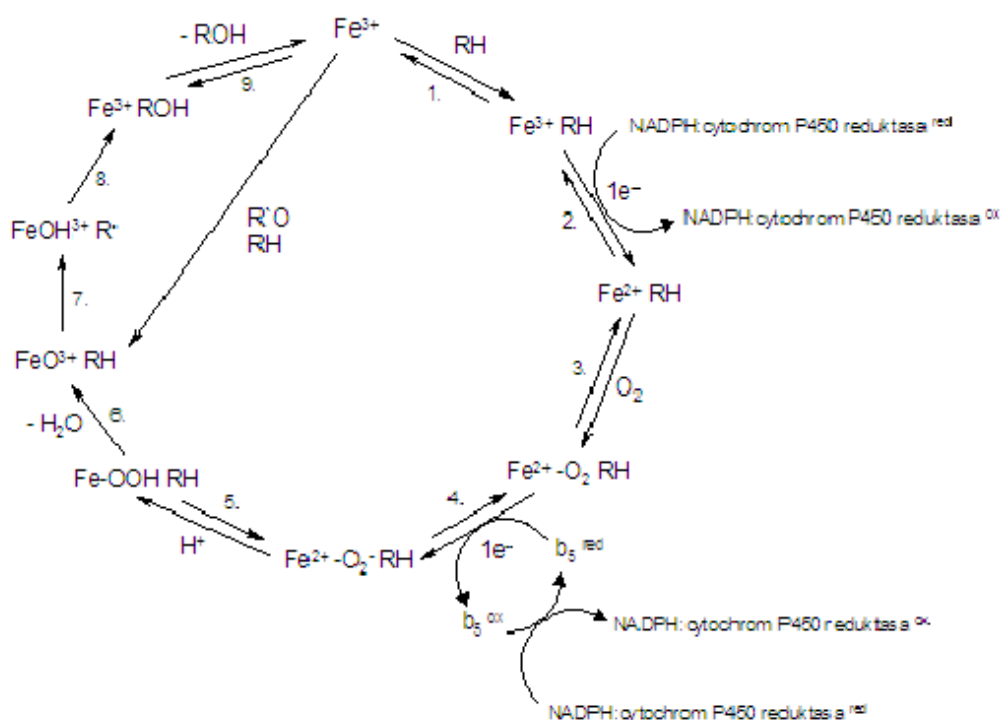


Obr.2 Struktura cytochromu P450 2D6

(převzato z Rowland et al. (2005), Crystal structure of human cytochrome P450 2D6, *J. Biol. Chem.*, **281**, p. 7618)

1.5 Katalytická aktivita a reaktivita

Obecný základ katalytické aktivity cytochromů P450 znázorňuje obr.3. Důležitým enzymem kooperujícím s cytochromem P450 je flavoprotein NADPH-cytochrom P450-reduktasa (*EC 1.6.2.4*). Enzym má dvě domény - flavinadenindinukleotid FAD a flavinadeninmononukleotid FMN. FAD přijímá dva elektrony, které jsou nutné k redukci cytochromu P450 v jeho enzymatickém cyklu z NADPH a přes FMN je přenáší na cytochrom P450. Obecně lze tento proces vyjádřit $\text{FADH} / \text{FMNH}_2 \rightarrow \text{FAD} / \text{FMN}$ (Guengerich, 2002).



Obr. 3 Katalytický systém cytochromu P450

(převzato z Guengerich P. (2002) Cytochromes P450 In Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics (Costas Ioannides, ed.), J. Wiley & sons, Chichester, UK)

Ve stručnosti, železitý ion hemu váže substrát v kroku 1. Ve druhém kroku je transportován jeden elektron z enzymu NADPH-cytochrom P450 - reduktasa na cytochrom P450 a železitý ion je redukován na ion železnatý. Třetí krok zahrnuje vazbu kyslíku na železnatý ion. V kroku 4 je druhý elektron z NADPH-cytochrom P450-reduktasy transportován na komplex $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$. Bylo prokázáno, že v některých případech může mít tento elektron původ

v cytochromu b_5 (Guengerich, 2002). Pátý krok zahrnuje protonizaci $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ komplexu na $\text{Fe}^{2+}\text{-OOH}$, kterou zprostředkovává Thr/Asp/ H_2O transportní systém. V kroku 6 dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O v komplexu za vzniku FeO^{3+} . Sedmý krok zahrnuje oddělení vodíkového atomu, případně nevázebného nebo π elektronu ze substrátu a následně krok 8 poskytuje produkt cyklu. Ten je uvolněn v kroku 9, kdy současně dochází k regeneraci počátečního železitého iontu, který pak může vázat další substrát.

Dřívější studia reaktivity cytochromů P450 byla založena na hledání malé mobilní molekuly oxidačního činidla, např. superoxidu O_2^- . Z pohledu dnešní vědy je odpovědí na otázku reaktivity cytochromů P450 interakce substrátu s Fe-O komplexem (Guengerich, 2002).

Cytochromy P450 katalyzují oxidační přeměny substrátu. K těmto reakcím patří aromatická a alifatická *hydroxylace* typická pro alkany a steroly, *dehydrogenace*, *jednoelektronová redukce a oxidace* typická pro PAH, *oxygenace heteroatomů* v heterocyklických sloučeninách, *oxidativní deaminace*, *epoxidace*, *dehalogenace*, *dealkylace*, *oxidace olefinů a alkynů* a *oxidace aromatických cyklů*, která je typická nejen pro cytochromy P450, ale také pro mnoho dalších enzymů ze skupiny oxygenas (Guengerich, 2002).

2. Interakce cytochromů P450 se xenobiotiky

2.1 Úvod

V klinické praxi představuje interakce cytochromů P450 se xenobiotiky komplexní problém. Jeho řešení předchází otázka efektu xenobiotik na aktivitu těchto enzymů, který se projevuje v indukci nebo v inhibici metabolismu. Výsledek může při současném podání dvou látek vést k lékové interakci. Léková interakce je proces vzájemného ovlivnění dvou léčiv, který se projevuje měřitelnými změnami v trvání a síle jejich účinku. Může vznikat jak na úrovni inhibice, tak na úrovni indukce a může být nežádoucí anebo cílená (např. podávání antidot k zeslabení působení jedu nebo jeho vyloučení z organismu, kombinovaná léčba pomocí cytostatik vedoucí ke zvýšení jejich účinku).

Studium těchto interakcí poskytuje cenné informace potřebné k volbě dávkování léčiva a k posouzení případných kontraindikací.

2.2 Indukce

U některých forem cytochromů P450 byla prokázána indukce jejich aktivity působením látek odlišných od jejich substrátů (příklady některých známých induktorů uvádí tab. 2). Tento efekt může mít vážné následky spočívající v nepříznivé extenzivní biodegradaci. Zvýšení aktivity nebo hladiny cytochromů P450 může být také důsledkem vlivu přijímané potravy nebo kouření.

Příkladem, kdy podání látky způsobuje indukci konkrétního cytochromu P450 je užívání barbiturátů a některých steroidů, které indukují CYP3A4 (Kousalová et al., 2003). Současné podání těchto látek s jiným léčivem způsobí jejich zvýšenou metabolizaci a proto je potřebná zvýšená dávka tohoto léčiva.

Jiným zajímavým příkladem je důsledek, který byl pozorován při současném podání imunosupresiva cyklosporinu A a extraktu z třezalky tečkované pacientovi po transplantaci. Působení látek obsažených v tomto extraktu vyvolává indukci CYP3A4, a to se projeví v poklesu hladiny imunosupresiva, které je substrátem tohoto enzymu. To může vést až k odvržení transplantátu v důsledku selhání léčby (Mai et al., 2000).

Tab. 2 Příklady induktorů cytochromů P450

<i>CYP</i>	<i>Induktor</i>
1A1	PAH
1A2	PAH, nitrosaminy
2B6	fenobarbital
2C8/9/10	rifampicin, barbituráty
2D6	dexamethazon
2E1	etanol, isoniazid
3A4	rifampicin, barbituráty, extrakt třezalky tečkované

Upraveno dle: Květina & Grundman (2003)

2.3 Inhibice

Jsou známy látky, které působí jako inhibitory cytochromů P450 s různým stupněm selektivity. Nejedná se pouze o léčiva, ale také o přírodní látky, které jsou běžnou součástí stravy (naringenin nebo jiné flavonoidy) (Guengerich, 1992). Typickým příkladem jsou látky obsažené v grapefruitové šťávě. Inhibice metabolismu léčiva se projevuje jeho zvýšenou koncentrací v plasmě, zatímco koncentrace metabolitu je snížena. Inhibitory mohou být klasifikovány na základě mechanismu jejich působení a zahrnují kompetitivní i nekompetitivní inhibitory.

Kompeticí je současné podání dvou léčiv, které soutěží o vazbu v aktivním místě metabolizujícího enzymu. Obecně pak jedno léčivo je inhibitorem léčiva druhého. Jako příklad lze uvést kompetici blokátorů kalciových kanálů dihydropyridinové struktury (např. nifedipin) a prokinetika cisapridu (Kousalová et al., 2003).

Současné podávaná léčiva nemusí být substrátem stejného cytochromu P450. Jeho aktivita však může být léčivem ovlivněna, a to vede k lékové interakci.

Přehled některých známých inhibitorů cytochromů P450 uvádí tab. 3.

Tab. 3 Příklady inhibitorů cytochromů P450

<i>CYP</i>	<i>Inhibitor</i>
1A2	amitriptylin, imipramin, norfloxacin, ofloxacin
2B6	fluvoxamin
2C19	amitriptylin, imipramin
2D6	metadon, haloperidol, rofinavir, cimetidin
3A4	verapamil, naringenin

Upraveno dle: Květina & Grundman (2003)

3. Studium inhibice cytochromů P450 deriváty platiny

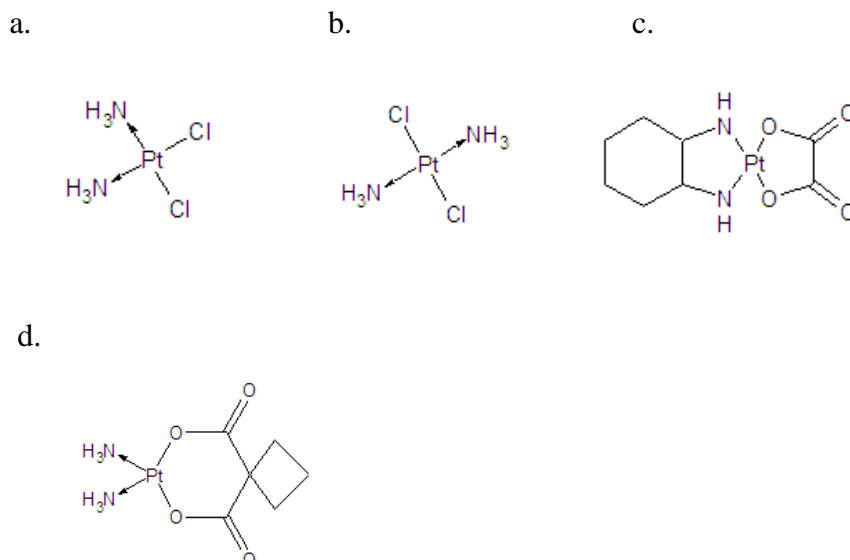
3.1 Cisplatina a její deriváty

Protinádorová aktivita *cisplatiny* (cis-diammindichloroplatnatého komplexu) je známá už od roku 1969 (Rosenberg et al., 1969). V souvislosti s úspěšným využitím této látky jako protinádorového léčiva měli vědci v posledních desetiletích snahu syntetizovat další analoga této sloučeniny. Jejich cílem bylo rozšířit možnosti léčby, předcházet klinické rezistenci na používaná protinádorová léčiva a vyvinout látku, která odstraní nedostatky v terapii cisplatinou, které reprezentuje hlavně neurotoxicita a nefrotoxicita. Ta byla prokazatelná i u dalších syntetizovaných derivátů platiny, nicméně mechanismus podmiňující tento efekt nebyl objasněn. Jedna z možností vysvětlení tohoto působení zahrnuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů během jejich metabolisme, které mohou způsobit oxidativní poškození biomembrán, peroxidaci lipidů a iniciaci apoptózy (Matsushima et al., 1998).

Protinádorová terapeutická aktivita derivátů platiny je založená na kovalentní modifikaci DNA. Publikováno bylo mnoho studií, které dokumentují strukturu různých aduktů platnatých komplexů s DNA a jejich cytostatický vliv, např. vliv na replikaci DNA (Brabec et al., 2002).

V současné době se pozornost soustřeďuje na dva deriváty platiny, které se řadí do tzv. druhé generace platnatých komplexů a které představují alternativu v léčbě nádorových onemocnění – karboplatinu a oxaliplatinu. K tomu přispívají nižší projevy toxicity a především účinky nedosažitelné v terapii cisplatinou (Chabner et al., 2006). Výsledky studií prohlubují hypotézu, podle které je strukturální modifikace cisplatiny možností ovlivnění a rozšíření spektra účinnosti její derivátů (Brabec & Kašpárková, 2002).

Karboplatina (*cis*-diammin-cyklobutan-1,1'-dikarboxylátoplatnatý komplex) je naproti cisplatině, která je účinná hlavně při léčbě karcinomu varlat, úspěšně využívána v terapii karcinomů plic a močového měchýře. *Oxaliplatin* (diammin-cyklohexan-oxalátoplatnatý komplex) je řešením problému spojeného s resistencí nádorů a buněčných linií. Je prvním protinádorovým komplexem ze skupiny derivátů platiny s prokazatelnou úspěšností v léčbě karcinomu vaječníků (Brabec & Kašpárková, 2002). Struktury popsaných derivátů platiny jsou znázorněné na obr.4.



Obr.4 a. cisplatina, b. transplatina, c. oxaliplatina, d. karboplatina

Možnost využití v protinádorové terapii nalézají i deriváty transplatiny (trans-diammindichloroplatinatého komplexu) - neúčinného geometrického isomeru cisplatiny. Nedávno byla představená skupina těchto sloučenin, které vykazují cytotoxickou aktivitu. Jejich struktura je prezentována substitucí vodíkového atomu aminoskupiny transplatiny zbytkem krátkého alifatického řetězce, např. 2-methylbutyl- nebo sek-butyl-anebo substituentem komplexnější struktury, kterým je např. hydroxymethylpyridin. (Mašek et al., 2009).

3.2 Efekt platinových komplexů na aktivitu cytochromů P450

Už dřívější studia prokázala, že některé látky s protinádorovým účinkem ze skupiny derivátů platiny inhibují aktivitu cytochromů P450 (Ando et al., 1998). V důsledku inhibice těchto léčiva-metabolizujících enzymů může docházet k lékovým interakcím při současném podání protinádorové látky a látky s jiným terapeutickým efektem.

Cisplatina a její deriváty vykazují ve srovnání s deriváty transplatiny menší efekt na aktivitu vybraných forem cytochromů P450, a to je z hlediska lékových interakcí pozitivní pro možnost jejich využití (Mašek et al., 2009). Žádná anebo minimální inhibice byla prokázána u carboplatiny a oxaliplatiny, a vzhledem k tomu je i použití těchto látek považováno za bezpečné (Mašek et al., 2009).

Pozornost je věnována i derivátům transplatiny, které představují možnost řešení rezistence na cisplatinu. Jejich působení se do značné míry liší od působení cisplatiny,

vyznačují se hlavně odlišnostmi na úrovni vazby na DNA a vyšší cytotoxicitou (Prokop et al., 2004). Důležité je ale zejména to, že vykazují mnohem vyšší interakci s cytochromy P450 než deriváty založené na *cis* geometrii (Mašek et al., 2009).

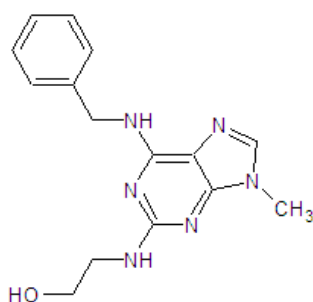
3.3 Studované deriváty oxaliplatiny

Vliv oxaliplatiny na aktivitu cytochromů P450 je minimální. To je z hlediska lékových interakcí pozitivum pro její terapeutické využití.

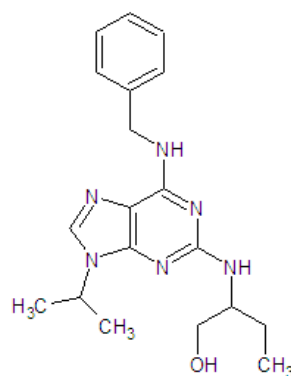
Experimentální část této práce se soustřeďuje na studium interakcí cytochromů P450 s některými deriváty oxaliplatiny. Ligandem ve struktuře oxaliplatiny je roskovitin (6-benzylamino -2- [(1-hydroxymethyl)propyl-amino] – 9 –isopropylpurin) (obr.5b) anebo jeho methoxy-deriváty (obr.6).

Roskovitin je odvozený od rostlinného hormonu 6-benzylaminopurinu. Patří do skupiny 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Řadí se mezi látky inhibující cyklin-dependentní kinasy (CDK) – proteiny regulující buněčný cyklus, které se tak účastní i v nádorové transformaci. Nedávno byl úspěšně testován *in vivo* u pacientů s nádorovým onemocněním plic (Trávníček et al., 2010). Prvním účinným inhibitorem z této skupiny byl *olomoucín* (6-benzylamino -2- [(2-hydroxyethyl)amino] – 9 – methylpurin) (obr.5a) (Veselý et al., 1994) se selektivním působením na některé CDK.

a.

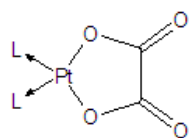


b.

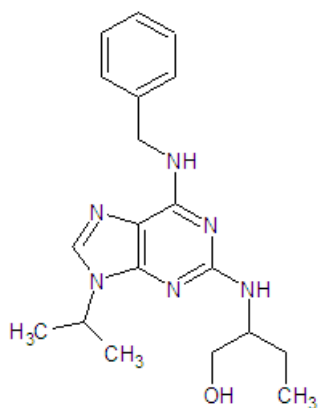


Obr. 5 Struktura a. olomoucínu, b. roskovitinu

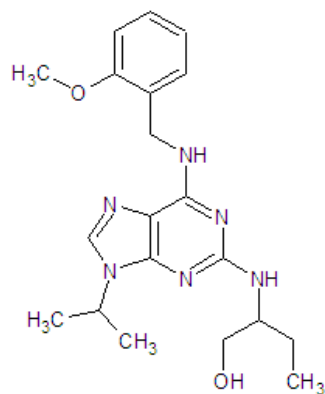
a.



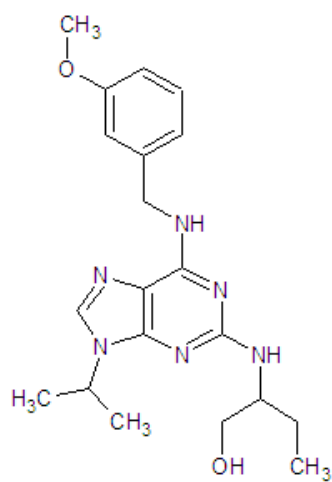
b.



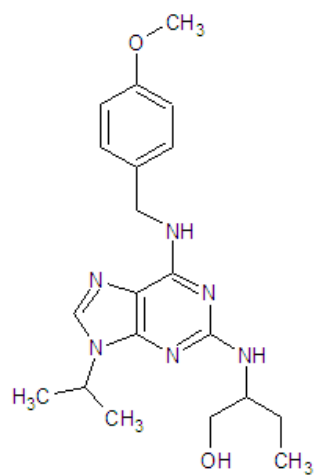
c.



d.



e.



Obr. 6 Studované deriváty oxaliplatiny: a. strukturní základ (L = ligand), b. ligand pro PS218, c. ligand pro PS219, d. ligand pro PS216, e. ligand pro PS22

Seznam použitých zkratk

ACN - acetonitril

CDK - cyklin-dependentní kinasy

CYP - cytochrom P450

ISO - isocitrát

IDH - isocitrátdehydrogenasa

PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky

RFU - relativní jednotka fluorescence

RLU - relativní jednotka luminiscence

Literatura

1. Ando Y., Shimizu T., Nakamura T., Mushiroda T., Nakagawa T., Kodama T., Kamataki T. (1998), Potent and non-specific inhibition of cytochrome P450 by JM219, a new oral platinum agent, *Br J Cancer*, **78**, 1170-1174
2. Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol Life Sci* , **58**, 737-747
3. Brabec V. (2002), DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair, *Prog Nucleic Acid Res*, **78**, 1-68
4. Brabec V., Kasparkova J. (2002), Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs, *Drug resist update*, **5**, 147 – 161
5. Chabner B.A., Amrein P.C., Druker B.J., Michaelson M.D., Mitsiades C.S., Goss P.E. (2006), Antineoplastic agents In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (Brunton E.E., ed.), pp. 1315-1403
6. Crespi C.L., Chang T.K., Waxman D.J. (1998a) CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Methods Mol Biol*, **107**: 141-145
7. Crespi C.L., Chang T.K., Waxman D.J. (1998b), Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac-4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography In Cytochrome P450 protocols (Philips I.R. & Shepard E.A. eds.), pp. 129-140, Humana Press, Totowa (NJ)
8. Donato M.T., Jimenez N., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (2004) Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes, *Drug Metab Dispos* **32**, 699-706
9. G. Gordon Gibson, P. Scett (2001) Introduction to drug metabolism, pp. 2-8, Nelson Thornes Publishers, Cheltenham, UK

10. Guengerich P. (2003) Cytochrome P450, drugs and diseases, *Mol Interv*, **3**, 194-204
11. Guengerich P. (2002) Cytochromes P450 In Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics (Costas Ioannides, ed.) pp. 33-65, J. Wiley & sons, Chichester, UK
12. Guengerich P. (1992) Characterizations of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J*, **6**, 745 – 748
13. Guengerich F.P, Martin M.V, Beaune P.H, Kremers P., Wolff T., Waxman D.J.(1986) : Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, *J Biol Chem*, **261**(11): 5051-5060
14. Hlavica P., Lewis D. F.V. (2001) Allosteric phenomena in cytochrome P450-catalyzed monooxygenations, *Eur J Biochem*, **268**, 4817-4832
15. Kousalová L., Baranová J., Anzenbacher P. (2003) Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4, *Klin Farmakol Farm*, **17**, 151 - 157
16. Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of Olomoucine II, *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 3283-3286
17. Květina J., Grundman M. (2003), Farmakologické interakce, *Klin Farmakol Farm*, **1**, 17-21
18. Lucas D., Menez J.F., Berthou F. (1996) : Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1. *Meth Enzymol*, **272**, 115-123
19. Mai I., Kruger H., Budde K., Johne A., Brockmoller J., Neumayer H., Roots I. (2000), Hazardous pharmacokinetic interaction of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) with the immunosuppressant Cyclosporin, *Int J Clin Pharmacol*, **38**, 500-502
20. Mašek V., Anzenbacherová E., Machová M., Brabec V., Anzenbacher P. (2009) Interaction of antitumor platinum complexes with human liver microsomal cytochromes P450, *Anticancer drugs*, **20**, 305 – 311

21. Matsushima H., Yonemura K., Ohishi K., Hishida A. (1998) The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal silure in rats, *J Lab Clin Med*, **131**, 518-526
22. Prokop R., Kašpárková J., Nováková O., Martinez A., Moreno V., Brabec V. (2004) DNA interactions of new antitumor platinum complexes with trans geometry activated by 2-methylbutylamin or sec-butylamine ligand, *Biochem Pharmacol*, **67**, 1097 – 1109
23. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E., Mansour V.H. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents, *Nature*, **222**, 385-386
24. Rowland P., Blaney E., Smyth M., Jones J., Leydon R., Oxbrow A., Lewis C., Tennant M., Modi S., Eggleston D., Chenery R., Bridges A. (2005), Crystal structure of human cytochrome P450 2D6, *J Biol Chem*, **281**, p. 7618
25. Shord S.S., Bernard S.A., Lindley C., Blodgett A., Mehta V., Churchel M.A. (2002) Oxalplatin biotransformation and pharmacokinetics: a pilot study to determine the possible relationship to neurotoxicity, *Anticancer Res*, **22**, 2301 - 2309
26. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemické listy*, **93**, 229 – 237
27. Šiller M., Anzenbacher P., Anzenbacherova E., Dolezal K., Popa I., Strnad M. (2009) Interactions of olomoucine II with human liver microsomal cytochromes P450, *Drug Metab Dispos*, **37**, 1198-1202
28. Trávníček Z., Štarha P., Popa I., Vrzal R., Dvořák Z. (2010) Roscovitine-based CDK inhibitors acting as N-donor ligands in the platinum(II)oxalato complexes: Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity, *Eur J Med Chem*, **45**, 1609 - 1614
29. Veselý J., Havlicek L., Strnad M., Blow J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meier L. (1994), Inhibition of cyclin dependent kinases by purine analogues, *Eur J Biochem*, **224**, 771-786
30. Waxman DJ, Chang TK (1998) Use of 7-ethoxycoumarin to monitor multiple enzymes in the human CYP1, CYP2, and CYP3 families, *Methods Mol Biol*, **107**, 175-179

Seznam použitých zkratk

ACN - acetonitril

CDK - cyklin-dependentní kinasy

CYP - cytochrom P450

ISO - isocitrát

IDH - isocitrátdehydrogenasa

PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky

RFU - relativní jednotka fluorescence

RLU - relativní jednotka luminiscence

