

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav farmakologie

Mgr. Jaroslav Matal

**POROVNÁNÍ LIDSKÝCH A PRASEČÍCH BIOTRANSFORMAČNÍCH
ENZYMŮ SE ZŘETELEM NA CYTOCHROMY P450 1A2, 2A19 A
UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASU 1A6**

Disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Olomouc 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená práce je původním dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu ze které jsem čerpal, v práci řádně cituji a je uvedena v seznamu literatury.

V Olomouci

.....

(podpis)

Děkuji svému školiteli, prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za odborné vedení mé práce, praktické rady a připomínky, za prostor pro práci, důvěru a podporu během celého mého doktorského studia. Současně děkuji doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za praktické rady a zkušenosti, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Velice rád bych též poděkoval všem současným i bývalým kolegům z Ústavu farmakologie LF UP za pomoc, podporu a vytváření nesmírně příjemného pracovního prostředí. Dík patří též všem, kteří byť slovem podpory, přispěli k vypracování této práce. Nakonec bych rád poděkoval své rodině a blízkým za jejich podporu a nesmírnou obětavost.

1	Přehled současného stavu problematiky.....	6
1.1	Úvod.....	7
1.2	Metabolismus xenobiotik.....	8
1.2.1	Cytochromy P450.....	11
1.2.1.1	Cytochromy P450 - jejich vlastnosti a funkce.....	11
1.2.1.2	Nomenklatura cytochromů P450.....	16
1.2.2	Nejdůležitější formy lidských CYP a jejich vlastnosti.....	16
1.2.2.1	CYP1A1/2.....	20
1.2.2.2	CYP2B6.....	21
1.2.2.3	CYP2C.....	22
1.2.2.3.1	CYP2C8.....	22
1.2.2.3.2	CYP2C9 (CYP2C9/10).....	22
1.2.2.3.3	CYP2C19.....	24
1.2.2.4	CYP2D6.....	25
1.2.2.5	CYP2E1.....	28
1.2.2.6	CYP3A4 (CYP3A4/5/7).....	29
1.2.2.7	CYP2A6.....	33
1.2.3	Nejdůležitější enzymy II. fáze metabolismu xenobiotik.....	33
1.2.3.1	Glukuronidace.....	33
1.2.3.1.1	Nejdůležitější formy UGT.....	34
1.2.4	Experimentální modely metabolismu xenobiotik.....	35
1.2.4.1	Potkan.....	36
1.2.4.2	Králík.....	37
1.2.4.3	Pes.....	38
1.2.4.4	Opice.....	39
1.2.4.5	Prase (miniprase).....	40
1.2.4.5.1	Prase a metabolismus skatolu.....	42
1.2.4.5.2	Prase a bioartifciální jaterní náhrady (BAL).....	43
2	Cíle disertační práce.....	47
3	Materiál a metody.....	49
3.1	Materiál.....	50
3.2	Přístroje.....	51
3.3	Software.....	51
3.4	Rekrystalizace kyseliny cholové.....	51
3.5	Jaterní tkáň.....	52
3.6	Příprava jaterní mikrosomální frakce prasete.....	52
3.6.1	Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	53
3.6.2	Stanovení obsahu proteinu.....	53
3.7	Solubilizace mikrosomů.....	54
3.8	Chromatografie supernatantu solubilizátu na oktyl-agaróze.....	54
3.9	Dialýza izolovaných frakcí.....	55
3.10	Chromatografie na hydroxylapatitu.....	55
3.11	Odstranění detergentu.....	55
3.12	Charakterizace cytochromů P450.....	56
3.12.1	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	56
3.12.2	Western blotting.....	56
3.13	Stanovení enzymových aktivit izolovaných CYP.....	57
3.13.1	Rekonstituovaný systém s CYP1A2 – dealkylace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu.....	57
3.13.2	Rekonstituovaný systém s CYP2A19 – hydroxylace kumarinu v poloze 7.....	58
3.13.3	Inhibice 7-ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylace pomocí furafylinu v rekonstituovaném systému.....	58
3.13.4	Inhibice 7-hydroxylace kumarinu v rekonstituovaném systému.....	59
3.14	Biotransformace skatolu prasečími CYP.....	60
3.14.1	Inkubace skatolu s prasečími jaterními mikrosomy.....	60
3.14.2	Rekonstituovaný systém se skatolem s izolovanými CYP1A, 2A19 a 2E1.....	60
3.14.3	Inhibice tvorby metabolitů skatolu v rekonstituovaném systému s prasečími izolovanými CYP.....	61
3.14.3.1	Inhibice s CYP1A2.....	61
3.14.3.2	Inhibice s CYP2A19.....	61
3.14.3.3	Inhibice s CYP2E1.....	62
3.15	Stanovení enzymové kinetiky UGT1A6 v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice.....	62
3.16	Stanovení glukuronidů silybinu v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice.....	63
4	Výsledky.....	65
4.1	Příprava mikrosomů a solubilizace.....	66
4.2	Chromatografie na oktyl-agaróze.....	66
4.3	Chromatografie na hydroxylapatitu (HA).....	68
4.4	Stanovení enzymových aktivit izolovaných CYP.....	71
4.4.1	Stanovení aktivity CYP1A2 – dealkylace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu.....	71
4.4.2	Stanovení aktivity CYP2A6/19 – hydroxylace kumarinu v poloze 7.....	72
4.4.3	Inhibiční experimenty s izolovanými CYP v rekonstituovaném systému.....	73
4.5	Biotransformace skatolu.....	74
4.5.1	Biotransformace skatolu v jaterní mikrosomální frakci prasete.....	75
4.5.2	Biotransformace skatolu v rekonstituovaném systému s CYP1A2, CYP2E1 a CYP2A6/19 u člověka a prasete.....	75
4.6	Stanovení enzymové kinetiky UGT1A6 v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice.....	77
4.7	Stanovení glukuronidů silybinu v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice.....	79
5	Diskuse.....	81
6	Závěr.....	90
7	Literatura.....	92
8	Seznam zkratk.....	112
9	Publikované práce.....	115
9.1	Publikace v odborných časopisech s IF.....	116
9.2	Publikace v časopisech bez IF.....	116
9.3	Přehledné články.....	116
9.4	Příspěvky na konferencích.....	117

1 Přehled současného stavu problematiky

1.1 Úvod

Lidstvo je v důsledku svého rozvoje čím dál více vystavováno působení nejrůznějších cizorodých látek – xenobiotik, ať už jsou to potravinářské chemikálie, pesticidy, alkaloidy, průmyslové látky znečišťující životní prostředí nebo léky. Kvůli extensivnímu využívání chemických látek a z toho pramenícího znečištění životního prostředí, jsou všechny živočišné druhy více či méně ohroženy a někdy hrozí i jejich vyhubení. Znalost toho, jak xenobiotika ovlivňují organismy, je důležitým aspektem v boji s tímto nebezpečím. Detailní poznání toho, jak xenobiotika působí je nutná pro správné pochopení oborů jako je farmakologie, toxikologie, výzkum rakoviny a mnoha dalších oborů.

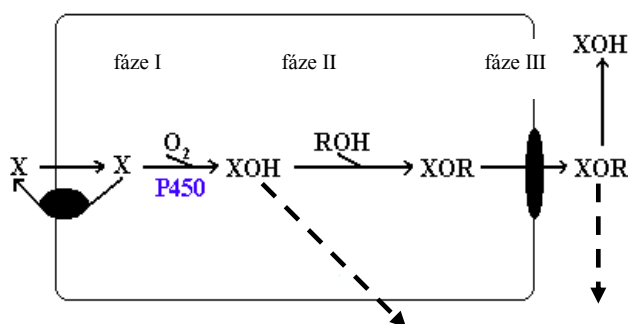
Cytochromy P450 jsou enzymy, které jsou primárně odpovědné za metabolismus xenobiotik v organismech na téměř všech fylogenetických stupních vývoje. Zúčastňují se také přeměn látek, které jsou tělu vlastní – endobiotik, jako je např. přeměna cholesterolu na steroidní hormony a biosyntéza prostaglandinů. Role cytochromů P450 v biotransformaci endobiotik není zatím do detailu objasněna, nicméně v budoucnosti se očekává pokrok právě v této oblasti.

Jelikož velké množství nežádoucích účinků léčiv je způsobeno metabolismem zprostředkovaným různými formami cytochromů P450, jeví se jako zásadní poznat detailně jejich podíl na metabolismu. Jelikož je z hlediska etického a právního nepřijatelné provádět preklinické testy na lidech, je už dlouhou dobu cílem experimentátorů najít takový zvířecí model, který by byl svým metabolismem co nejvíce podobný člověku. Jako nejpoužívanější modely při studiu metabolismu xenobiotik jsou v současnosti potkan, králík, opice, prase a pes. Extrapolace výsledků z těchto experimentálních zvířat (hlavně v případě potkana) není jednoduchá a naráží na mnohá úskalí. Proto je stále častěji věnována pozornost individuálním formám CYP (a i jiných enzymů zapojených do biotransformace) u experimentálních zvířat s cílem vytipovat nejvhodnější kandidáty pro studium metabolických přeměn. Tato práce je příspěvkem k porovnání vlastností enzymů zapojených do metabolismu léčiv u experimentálních zvířat (zejména u prasete) a u člověka. Ukazuje se totiž, že prase je výborným modelem pro studium metabolismu látek u člověka a používá se rovněž jako experimentální model v dermatologii. Velice zajímavě se jeví možnost použití prasečích orgánů, hlavně jater při tvorbě bioarteficiálních náhrad.

1.2 Metabolismus xenobiotik

Metabolismus xenobiotik má především za úkol odstranit z organismu látky, které jsou pro něj potenciálně škodlivé. Tento děj se v organismu odehrává ve dvou fázích. Reakce první fáze mají za cíl zvýšení polariry látky. Děje se tak vnesením nebo odkrytím funkčních skupin pomocí oxidace, redukce nebo hydrolýzy. Změna struktury spojená s těmito ději může mít za následek také změnu účinku látky. Metabolity první fáze tak mohou být neúčinné, stejně účinné a nebo více účinné, jak je tomu v případě takzvaných prodrugs. Druhá fáze metabolismu představuje reakce, při kterých dochází k vazbě vytvořených funkčních skupin z první fáze s funkčními skupinami endogenních polárních molekul (konjugace s kys. glukuronovou, glutathionem, acetylace apod.). Výsledkem konjugačních reakcí druhé fáze je vytvoření polárního a snadno eliminovatelného produktu. Vytvořené konjugáty většinou nemají farmakologicky pozorovatelný účinek. V malém počtu případů však mohou vést konjugační reakce ke vzniku účinnějšího metabolitu a podílet se na toxických dějích. Někdy se do metabolismu xenobiotik zapojují proteiny s transportní funkcí, jejichž úkolem je přenášet metabolity z buňky ven do extracelulárního prostoru. Tyto transportéry jsou exprimovány v různých tkáních. Pro děje, kterých se zúčastňují, se používá název "metabolismus třetí fáze". Vzniklé metabolity jsou z těla nejčastěji vylučovány močí nebo žlučí (Martínková et al., 2000).

Obr. 1: Schéma biotransformace a exkrece látek (Martínková et al., 2000).



Na metabolismu cizorodých látek se v organismu podílí celá řada různých enzymů, lokalizovaných v různých tkáních a v různých subcelulárních jednotkách.

Mezi nejdůležitější enzymové systémy podílející se na metabolismu xenobiotik patří cytochromy P450, flavinové monooxygenázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy, peroxidázy, UDP-glukuronosyltransferázy, sulfotransferázy, N-acetyltransferázy a další (Parkinson, 1996). V Tabulce 1 jsou znázorněny nejdůležitější biotransformační systémy a reakce, včetně jejich subcelulární lokalizace.

Tab. 1: Nejdůležitější reakce a hlavní biotransformační enzymy včetně lokalizace (Parkinson, 1996) ER – endoplasmatické retikulum

REAKCE	ENZYMOVÝ SYSTÉM	LOKALIZACE
Fáze I		
<i>oxidace</i>	Cytochromy P450 (CYP)	ER
	Flavinové monooxygenázy (FMO)	ER
	Monoaminoxidázy (MAO)	mitochondrie
	H ₂ O ₂ závislé peroxidázy (POD)	ER, extrahepatálně
	Prostaglandin H syntázy (PGS)	ER, extrahepatálně
	Alkoholdehydrogenázy (ADH)	cytosol
	Dihydrodioldehydrogenázy	cytosol
	Aldehyddehydrogenázy (ALDH)	ER, mitochondrie, cytosol
	Aldehydoxidáza	cytosol
<i>redukce</i>	NADPH:P450 oxidoreduktáza	ER
	Aldehydreduktázy	cytosol
	Ketoreduktázy	cytosol
	Aldehydoxidázy	cytosol
	Aldehyddehydrogenázy	cytosol, ER, mitochondrie
	Nitroreduktázy	cytosol, ER, střevní bakterie
	Azoreduktázy	ER, střevní bakterie
	NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza	cytosol
	Epoxidhydrolázy	ER, cytosol
<i>hydrolýza</i>	Karboxylesterázy/Amidázy	ER, cytosol, mitochondrie
	Pseudocholinesterázy	cytosol, plazma
Fáze II		
<i>glukuronidace</i>	UDP-glukuronosyltransferázy (UGT)	ER
<i>sulfatace</i>	Sulfotransferázy	cytosol
<i>konjugace s glutathionem</i>	Glutathion-S-transferázy (GST)	cytosol, ER
<i>acetylace</i>	N-acetyltransferázy (NAT)	cytosol
<i>methylace</i>	Methyltransferázy, S-methyltransferázy	cytosol, ER
<i>konjugace s aminokys.</i>	Acyltransferázy	cytosol, mitochondrie

U obratlovců jsou játra hlavním orgánem, ve kterém probíhá biotransformace xenobiotik. Enzymy účastníci se metabolismu xenobiotik nejsou ale umístěny jen

v játrech, ale i v dalších orgánech; hlavně v těch, které jsou místem primárního kontaktu xenobiotika s organismem. Těmito orgány jsou například kůže, plíce, nosní sliznice, oko a gastrointestinální trakt. Biotransformační enzymy se ale vyskytují i v orgánech, které nejsou v první linii kontaktu s xenobiotiky, což je důsledkem toho, že tyto enzymy mají také své fyziologické funkce. Mezi tyto orgány patří například ledviny, nadledviny, slinivka, slezina, srdce, mozek, varlata, vaječníky, placenta, krevní destičky, aorta (Krishna a Klotz, 1994; Kapitulnik a Strobel, 1999; Pávek a Dvořák, 2008). Jak již bylo zmíněno, játra jsou hlavním orgánem, ve kterém probíhají chemické procesy. Nadneseně lze říci, že jsou hlavní chemickou továrnou těla, neboť chemicky modifikují nejen nutrienty, ale i cizorodé látky, které se do organismu dostanou různými cestami. Na biotransformaci xenobiotik se podílí více enzymových systémů. Tyto enzymy se vyskytují hlavně v membránách endoplazmatického retikula (ER) jater, ke kterým mají xenobiotika (vzhledem ke své lipofilní povaze) přirozenou afinitu, neboť membrány ER jsou tvořeny lipidovou dvouvrstvou. Membrány ER po diferenční centrifugaci jaterního homogenátu vytvoří drobné uzavřené měchýřky (mikrosomy), které jsou výborným zdrojem biotransformačních enzymů a široce se používají ke studiu metabolismu látek.

Mezi nejvýznamnější metabolické systémy patří bezesporu cytochromy P450 (CYP). Je to dáno nejen jejich širokou substrátovou specificitou, ale hlavně skutečností, že jsou ve vysokých koncentracích přítomny v játrech, tedy nejdůležitějším metabolickém orgánu. Dalšími orgány, kde se CYP vyskytují, jsou např.: ledviny, plíce, střevo, mozek, krevní destičky, kostní dřeň. Tyto enzymy se vyskytují nejen u vyšších organismů, ale také u prokaryotických buněk bakterií a u rostlin, kde jsou zodpovědné za tvorbu barviv a toxinů (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Kousalová et al, 2004). CYP hrají také nezastupitelnou úlohu při tvorbě steroidních hormonů, cholesterolu, žlučových kyselin, vitamínu D, eikosanoidů a při hydroxylaci mastných kyselin (Hsu et al, 2007; Spiecker a Liao, 2006). Kromě zmíněných fyziologických funkcí jsou CYP zodpovědné za většinu hydroxylačních reakcí první fáze metabolismu xenobiotik. Jejich detailní poznání je tudíž důležité nejen z pohledu metabolismu léčiv, ale také pro objasnění mechanismu vzniku karcinogenních metabolitů (Guengerich a Shimada, 1991). Další z úloh CYP je např. přeměna neaktivních forem léčiv (prodrugs) na formy farmakologicky účinné (Patterson a Murray, 2002).

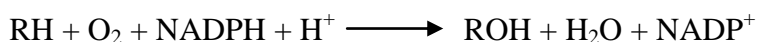
1.2.1 Cytochromy P450

1.2.1.1 Cytochromy P450 - jejich vlastnosti a funkce

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) jsou svou povahou hemové proteiny podobně jako např. peroxidázy, katalázy, cytochrom c oxidasa a NO syntasa (White a Marletta, 1992). Evolučně jsou velmi staré, jejich vývoj trvá už 1,5 miliardy let a ačkoli je jejich substrátová specifita velmi rozmanitá, všechny obsahují vysoce konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazebného místa pro hem. Označení cytochrom má význam spíše historický, neboť toto označení je používáno pro enzymy účastnící se transportu elektronů (např. v dýchacím řetězci mitochondrií). Druhá část názvu "P450", vznikla díky objevu pigmentu potkaních jater, který byl v redukované formě po vazbě oxidu uhelnatého schopen absorbovat světlo o vlnové délce 450 nm (mezi jednotlivými formami se liší v rozmezí 447-452 nm), ačkoli běžně hemoproteiny absorbují při 420 nm (Klingenberg, 1958; Omura a Sato, 1964).

Hemová skupina cytochromu P450 je hem b (protoporfyrin IX), podobně jako u hemoglobinu a myoglobinu; u cytochromů P450 je však rozdíl v tom, že železo v hemové skupině je oxidované (Fe^{3+}). Další důležitý rozdíl spočívá v aktivaci molekulárního kyslíku působením protilehlého, pátého ligandu hemového železa, kterým je thiolátová síra cysteinového zbytku. Cytochrom P450 působí společně s dalšími enzymy lokalizovanými v membráně ER. Jsou jimi flavoprotein NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CYPOR) a cytochrom b_5 (hemoprotein), přičemž společně tvoří tzv. jaterní mikrosomální monooxygenázový systém (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

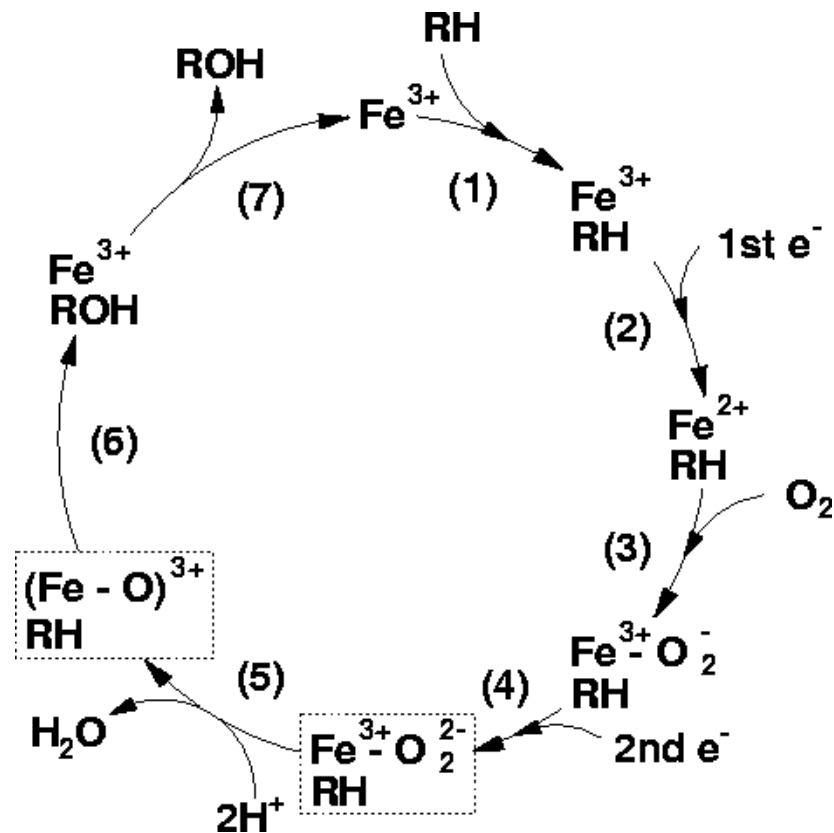
Monooxygenasová reakce katalyzovaná CYP se dá souhrnně vyjádřit následující rovnicí:



Současně s oxygenací vzniká molekula vody, což vedlo k historickému označení cytochromů P450 názvem oxidasy se smíšenou funkcí. Reakční cyklus CYP je poměrně složitý, stručně ho lze popsat v několika krocích (viz. Obrázek 2).

1. Vazba substrátu (RH). Po vazbě substrátu dojde ke konformační změně, která vede k přeměně hexakoordinované formy hemu na pentakoordinovanou a k současné změně spinového stavu hemového železa (z nízkospinového na vysokospinový). Uvedené změny vedou k usnadnění transportu elektronů z NADPH (zprostředkovává CYPOR) a k redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} .
2. Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} .
3. Vazba kyslíku na volné šesté koordinační místo hemového železa za tvorby $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)$.
4. Druhá redukce. V tomto kroku komplex přijímá druhý elektron od CYPOR nebo cytochromu b_5 a vzniká komplex, který lze psát jako peroxid.
5. Komplex reaguje se dvěma protony, za vzniku molekuly vody a komplexu $(\text{Fe}-\text{O})^{3+} \text{RH}$. Dochází tak k rozpadu vazby O-O.
6. Tvorba produktu. Atom O vázaný na Fe, je navázán na molekulu RH, což vede ke vzniku hydroxylované formy substrátu (ROH), která je produktem reakce
7. Uvolnění produktu. Produkt reakce je uvolněn a enzym se vrací do původního stavu (s oxidovaným Fe^{3+} v nízkospinovém hexakoordinovaném stavu).

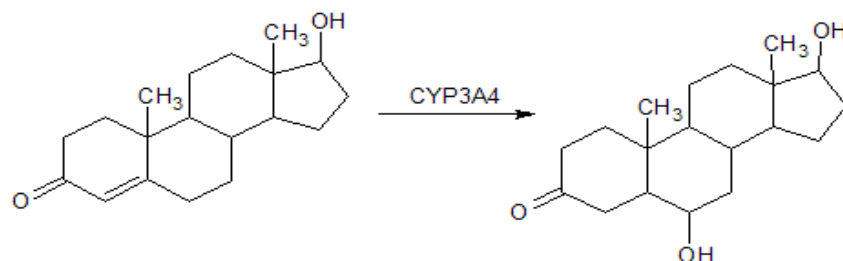
Kroky 5-6 jsou odvozeny teoreticky a nebyly dosud jednoznačně objasněny (Isin a Guengerich, 2008).



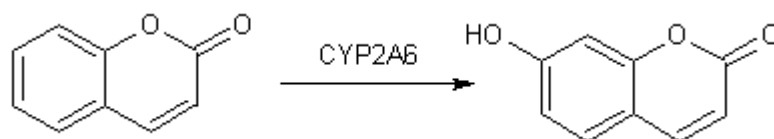
Výsledkem celého popsaného děje je hydroxylovaný substrát. Tato reakce je zřejmě nejdůležitější reakcí CYP a může být výchozím krokem pro další reakce (nejčastěji vazba endogenních molekul při II. fázi metabolismu). Z fyziologického hlediska je zajímavá i reakce, při které dochází k odštěpení postranního řetězce cholesterolu prostřednictvím několikanásobné hydroxylace. Tato reakce je katalyzována mitochondriální formou CYP, jmenovitě CYP11A1 (dříve nazýván CYP450sc) (Chung et al., 1986). Dalšími reakcemi typickými pro jednotlivé formy CYP jsou např. N-dealkylace, O-dealkylace, deaminace, dehalogenace a další, kdy se vždy v prvním kroku předpokládá vznik hydroxylovaného substrátu (Parkinson, 1996).

Příklady reakcí katalyzovaných jednotlivými formami CYP:

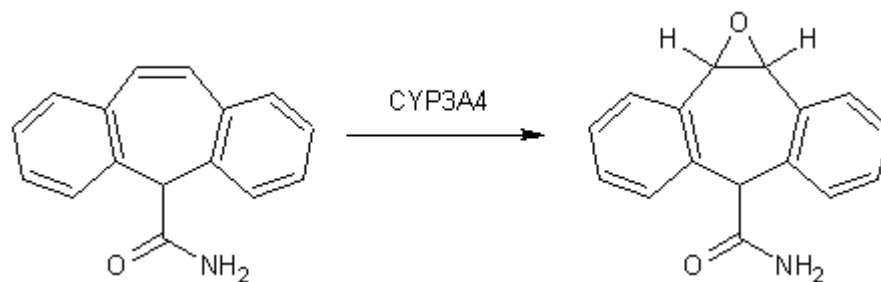
- hydroxylace alifatického uhlíku – testosteron



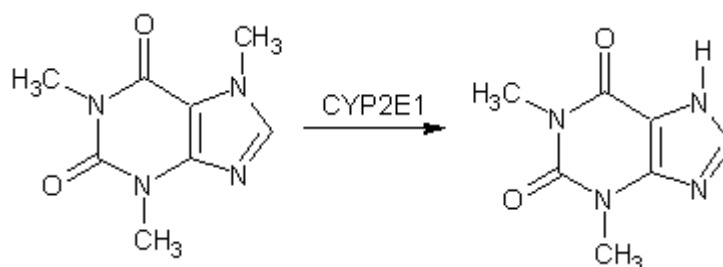
- hydroxylace aromatického uhlíku - kumarin



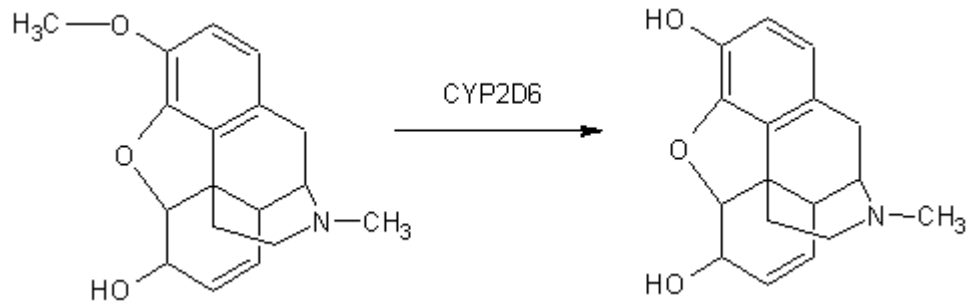
- epoxidace dvojně vazby – karbamazepin



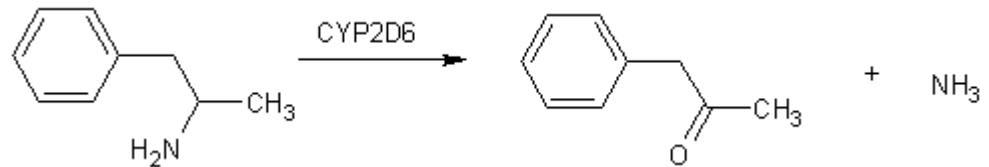
- *N*-demethylace – kofein



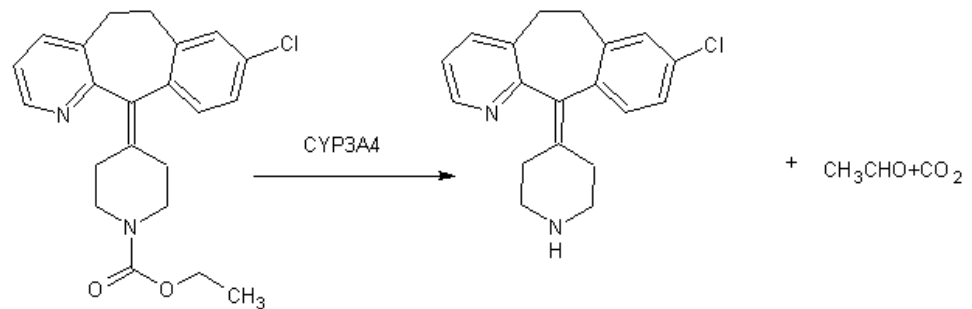
- *O*-demethylace – kodein



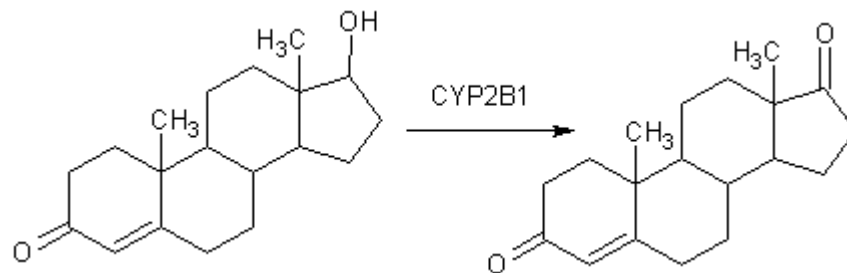
- oxidativní deaminace – amfetamin



- štěpení esteru – loratadin



- dehydrogenace



1.2.1.2 Nomenklatura cytochromů P450

Jelikož se počet známých forem CYP neustále rozrůstá (k 20.8. 2009 bylo známo 11 294 různých forem CYP u všech živých organismů), bylo nutné navrhnout otevřené a systematické třídění. Současné názvosloví je založeno na podobnosti primární struktury a je platné od roku 1996 (Nelson et al., 1996). Všechny cytochromy P450 dohromady tvoří nadrodinu označovanou zkratkou CYP. Další členění je na tzv. rodiny. Rodiny jsou označovány arabskou číslicí ihned za zkratkou CYP. Aby mohl být CYP zařazen do stejné rodiny, musí vykazovat 40% homologii v sekvenci aminokyselin (dodnes je známo 781 rodin CYP). Další členění je na podrodiny. Podrodiny jsou označovány velkým písmenem. Do stejné podrodiny řadíme CYP které vykazují alespoň 60% homologii. Posledním znakem v nomenklatuře je opět arabská číslice a určuje individuální formu CYP. Například nejvýznamnější enzym v metabolismu xenobiotik u člověka, CYP3A4 je čtvrtým členem podrodiny A patřící do rodiny 3. Přehled současného stavu nomenklatury je možno najít na adrese <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.

1.2.2 Nejdůležitější formy lidských CYP a jejich vlastnosti

Lidský genom má 57 genů pro cytochromy P450 a funkce jim odpovídajících enzymů je alespoň do určité míry známá. Podle současných znalostí se metabolismu xenobiotik zúčastňuje 15 jednotlivých forem CYP, z nichž nejdůležitější jsou CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 a CYP4F12. Typickou vlastností těchto CYP je široká a překrývající se substrátová specificita. Naproti tomu CYP podílející se na metabolismu endogenních substrátů mají substrátovou specificitu zpravidla užší (Guengerich et al., 2005). V lidských játrech, jako nejdůležitějším orgánu biotransformace, zaujímají CYP zhruba 2% obsahu celkového mikrosomálního proteinu. V ostatních tkáních je jejich obsah nižší, viz Tabulka 2.

Tab. 2: Celkový obsah CYP ve vybraných tkáních u člověka (Pelkonen et al., 2008).

Tkáň	Obsah CYP (nmol/mg mikrosomálního proteinu)
játra	0,3-0,6
nadledviny	0,23-0,54
tenké střevo	0,03-0,21
mozek	0,1
ledviny	0,03
plíce	0,01
varlata	0,01

Expres a aktivita některých forem CYP vykazuje velkou interindividuální variabilitu, která je způsobená jednak vlivy okolního prostředí - indukce nebo inhibice xenobiotiky (Honkakoski a Negishi, 2000; Lin a Lu, 2001; Rendic a Di Carlo, 1997), tak věkem (Sotaniemi et al., 1997), patologickým stavem (Villeneuve a Pichette, 2004) a genetickými předpoklady. Posledně jmenovaný faktor je primárně dán genetickým polymorfismem CYP, tedy množstvím aktivního CYP každého jednotlivce. Pokud je metabolismus látky zprostředkován pouze jednou formou enzymu, může genetický polymorfismus vést ke klinicky významné změně účinku léčiva. Pokud se však na metabolismu spolupodílí více forem CYP, nemá ovlivnění jedné z forem většinou dopad na hladinu léčiva v organismu (Kirchheiner et al, 2001). Z hlediska schopnosti biotransformovat určitou látku se lidská populace obvykle rozděluje na pomalé (PM), střední (IM), normální (EM) a ultrarychlé (UM) metabolisátory. K určení typu metabolismu látky se používá určení genotypu např. metodou PCR (polymerase chain reaction), RFLP (polymorfismus v délce restričních fragmetů), elektroforetickými metodami jako je SSCP (analýza jednovláknového konformačního polymorfismu) a jednak určení fenotypu pomocí metabolismu modelové látky.

U pomalých metabolisátorů se v důsledku přítomnosti defektních alel léčivo nemetabolisuje vůbec nebo jen v omezené míře. Tito jedinci jsou vystaveni největšímu riziku toxicity (kvůli vysokým hladinám léčiva) nebo selhání terapie u léčiv, vyžadujících pro svůj účinek metabolickou aktivaci (prodrugs). Označení IM

se u jednotlivých autorů liší. Někteří takto označují nositele jedné funkční a jedné defektní alely, zatímco jiní nositele dvou alel s nižší metabolickou aktivitou. EM tvoří většinu populace a mají obě alely genu funkční (tedy kódují plně aktivní protein nebo protein s aktivitou sniženou relativně málo) a léčiva tedy metabolisují normálně. UM mají ve své genetické výbavě více kopií genu pro daný enzym a dochází tedy u nich k jeho vyšší expresi. Tito lidé léčivo metabolisují intenzivněji a obvykle proto vyžadují větší dávky pro dosažení žádoucího terapeutického efektu. Nejvyšší míra polymorfismu a s tím spojená rizika jsou popisována u CYP2D6 a CYP2C9, naproti tomu u formy CYP2B6 nebyl dosud popsán (Ingelman-Sundberg at al., 2007).

Nejenom polymorfismus CYP, ale i současné užívání více léčiv nebo doplňků stravy může vést ke vzniku nežádoucích účinků díky alteracím v metabolismu. Pokud látka funguje jako induktor určité formy CYP, zvyšuje se množství aktivního enzymu a tím se zrychluje metabolismus látek metabolisovaných touto formou. Pokud látka danou formu CYP inhibuje, zpomaluje se metabolismus zprostředkovaný touto formou a dochází ke kumulaci léčiva v organismu. Přehled nejdůležitějších CYP včetně lokalizace a typických induktorů, které se účastní metabolismu xenobiotik je shrnut v Tabulce 3.

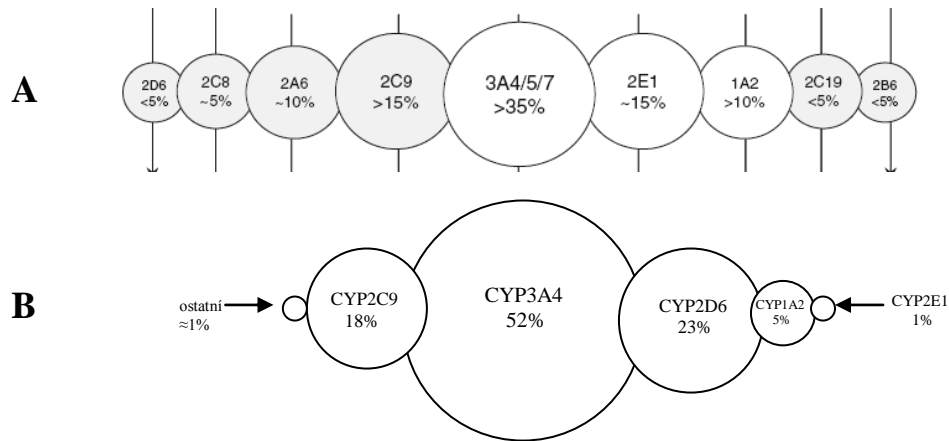
Tab. 3: Lidské cytochromy P450 metabolisující xenobiotika (Daly, 2009; Gungerich, 1995; Lanza et al, 1999; Pelkonen et al., 2008; Raunio et al., 1995; Wei et al., 2002; Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>. 20.7.2009)

CYP	Lokalizace	Typický substrát	Typický induktor
1A1	plíce, játra, mozek, GIT, lymfocyty, srdce	polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)	PAH, brukvovitá zelenina
1A2	játra, plíce	arom. aminy, PAH, kofein	PAH, β -naftoflavon
1B1	kůže, mozek, srdce, plíce, slezina, placenta, játra, ledviny, GIT	PAH	dioxin
2A6	játra	kumarin, nikotin	barbituráty, dexametazon
2B6	játra, srdce	cyclophosphamid	barbituráty
2C8	játra, srdce	paclitaxel, rosiglitazon	barbituráty
2C9/10	játra	NSPZL, PAD, warfarin	rifampicin
2C19	játra, srdce	(S)-mephenytoin, diazepam	barbituráty, rifampicin
2D6	játra, mozek, srdce	β -blokátory, antidepresiva	-
2E1	játra, plíce, mozek, srdce, endotel, kostní dřeň	ethanol, paracetamol, nitrosaminy,	ethanol, hladovění
2F1	plíce, nosní sliznice, játra	kumariny, skatol	?
3A4/5	játra, GIT, ledviny, plíce, mozek, endotel, placenta, lymfocyty	Ca-blokátory, steroidy, taxol, cyklosporin, makrolidy	steroidy, barbituráty
3A7	plod, placenta, (játra)	podobné 3A4	steroidy, barbituráty
4F2/3	játra, leukocyty, ledviny	deriv. kys. arachidonové, warfarin	?

NSPZL – nesteroidní protizánětlivá léčiva, PAD – perorální antidiabetika, PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky

Pro porovnání důležitosti jednotlivých jaterních forem CYP na metabolismus cizorodých látek může sloužit Obrázek 3.

Obr. 3: Průměrný podíl jednotlivých forem CYP na celkovém obsahu CYP v játrech člověka (A) a průměrný podíl jednotlivých forem CYP na metabolismu léčiv (B). Upraveno podle Guengerich (2003).



Kvantitativní zastoupení jednotlivých CYP může, ale také nemusí korelovat s jejich podílem na množství metabolisovaných léčiv. Například CYP3A4 je enzymem nejvíce zastoupeným a také metabolisuje největší podíl léčiv. Naproti tomu CYP2D6 se na celkovém obsahu jaterních CYP podílí z necelých 5%, ale metabolisuje zhruba čtvrtinu všech léčiv, u kterých je průběh metabolismu dosud popsán.

1.2.2.1 CYP1A1/2

Podrodina 1A se u člověka (stejně tak u většiny savců) sestává ze dvou forem, jmenovitě CYP1A1 a CYP1A2. První jmenovaná forma je extrahepatální a v jaterní tkáni se vyskytuje jen po indukci, např. kouřením. CYP1A2 se vyskytuje hlavně v játrech, ale jeho přítomnost byla zjištěna i v plicích (Wei et al., 2002). CYP1A2 byl poprvé izolován z jater potkana po indukci methylcholantrenem (Sladek a Mannering, 1966) a dlouhou dobu byl označován jak P-448 (absorbční maximum po vazbě CO). Zřejmě nejznámější funkcí této podrodiny je přeměna některých xenobiotik na karcinogeny. CYP1A1 katalyzuje např. hydroxylaci a epoxidaci benzo[a]pyrenu a CYP1A2 se účastní *N*-hydroxylace aromatických aminů a metabolismu aflatoxinu B₁, což ve svém důsledku vede k tvorbě reaktivních nukleofilních produktů a následné genotoxicitě. Tyto látky jsou přítomny např. v cigaretovém kouři a v grilovaném mase. Mezi typické substráty CYP1A2 patří látky strukturálně odvozené od planárních aromatických aminů a amidů (Lewis,

2004). Z léčiv sem patří kofein (marker aktivity *in vivo*), theofylin, clozapin, takrin, tizanidin, melatonin, duloxetin, imipramin, ondasetron, naproxen, terbinafin a R-warfarin (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Pelkonen et al., 2008). Mezi látky inhibující aktivitu CYP1A2 patří např. furafylin, fluvoxamin, ciprofloxacín, a také hormonální substituční terapie (estadiol valerát + levonorgestrel) (Laine et al., 1999). Hladiny CYP1A2 mohou být snadno zvýšeny polycyklickými aromatickými uhlovodíky, aromatickými aminy (přítomny v cigaretovém kouři a grilovaném mase), indoly (indol-3-karbinol přítomný v brukvovité zelenině), některými flavonoidy, rifampicinem, barbituráty a např. omeprazolem. Indukce CYP1A2 je řízena přes jaderný receptor, vázající polycyklické aromatické uhlovodíky, proto AhR – "arylhydrocarbon receptor" (Nguyen a Bradfield, 2008).

Podobně jako u jiných CYP, i u CYP1A2 je popsán výskyt polymorfismu. Podle současných poznatků se však zdá, že jeho vliv na enzymovou aktivitu je přinejmenším zanedbatelný. Daleko významnější je interindividuální variabilita aktivity tohoto enzymu, která se zjišťuje fenotypizací pomocí markerového substrátu (kofein). Ačkoli bylo v této oblasti vynaloženo velké úsilí, nelze tuto variabilitu vysvětlit polymorfismem v genu *CYP1A2* (Jiang et al. 2006, Ingelman-Sundberg et al., 2007). V literatuře jsou popsány interakce antipsychotika clozapinu s ciprofloxacínem. Mechanismus této interakce spočívá v inhibici CYP1A2 díky ciprofloxacínu a vede ke zvýšení hladin clozapinu s možným rozvojem toxicity (např. agranulocytóza) (Brouwers et al., 2009). V případě terapie duloxetinem, který je např. indikován pro léčbu diabetické periferní neuropatie byla provedena studie u 28 pacientů a ukázala, že kuřáci (8 pacientů), mají díky indukci CYP1A2 prokazatelně nižší plasmatické hladiny duloxetinu. Je nutné tento fakt proto zohlednit při léčbě a zvýšit dávku v průměru o 15% (Fric et al., 2008).

1.2.2.2 CYP2B6

CYP2B6 byl dlouhou dobu přehlíženou formou, neboť nebyly důkazy o jeho vlivu na metabolismus xenobiotik. Obrat nastal v posledních letech, kdy bylo zjištěno, že se podílí na metabolismu důležitých léčiv, mezi jinými je to např. bupropion, cyclophosphamid, ifosfamid, pethidin, ketamin a propofol, efavirenz a nevirapin. Důležitý je i jeho podíl na bioaktivaci prokarcinogenů (Smith et al., 2003). Jako markerový substrát *in vivo* pro tuto formu se zdá být vhodný bupropion, jelikož je intenzivně metabolisován právě CYP2B6 za tvorby hydroxybupropionu

(Turpeinen et al., 2006). Mezi inhibitory této formy patří thioTEPA, ticlodipin a clopidogrel. Induktory jsou např. barbituráty a rifampicin a indukce je řízena přes CAR (konstitutivní androstanový receptor) a PXR (pregnanový X receptor). Gen pro lidský *CYP2B6* je vysoce polymorfní, defektní alely *CYP2B6*6*, *CYP2B6*16* a *CYP2B6*18* vedou ke snížení metabolické aktivity enzymu. Poslední dvě jmenované se vyskytují v černošské populaci s frekvencí 7-9%. Velmi vzácně se vyskytuje alela *CYP2B6*28*, která vede k tvorbě zkráceného a tudíž nefukčního enzymu v pozici 378 (arginin) (Rotger et al., 2007; Wang et al., 2006). *CYP2B6* je celkově velmi málo prozkoumaným enzymem a do budoucna se dá očekávat velký zájem o studium tohoto enzymu (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

1.2.2.3 CYP2C

Do této podrodiny patří několik forem, jsou jimi *CYP2C8*, *CYP2C9/10*, *CYP2C19*

1.2.2.3.1 CYP2C8

CYP2C8 je exprimován hlavně v játrech, kde se podílí na metabolismu léčiv rozličných struktur. Mezi jeho substráty patří perorální antidiabetika repaglinid, troglitazon, rosiglitazon, antiarytmikum amiodaron, kancerostatikum paclitaxel, dále např. *all-trans* retinová kyselina a cerivastatin. Jako marker aktivity je udávána 6 α -hydroxylace paclitaxelu, nicméně jeho použití *in vivo* je nevhodné kvůli jeho toxicitě. Inhibitory jeho aktivity jsou quercetin, který se používá při *in vitro* experimentech a také hypolipidemikum gemfibrozil. V jeho souvislosti je zajímavé zmínit případ cerivastatinu, který byl v roce 2001 stažen z trhu kvůli výskytu případů fatální rhabdomyolýzy. U některých pacientů byla zřejmě hlavní příčinou inhibice *CYP2C8* současně podaným gemfibrozilem. U této formy byly také objeven polymorfismus, ale jeho klinické důsledky nejsou ještě zcela objasněny. Celkově vzato *CYP2C8* je poměrně málo prozkoumanou formou CYP (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Lundblad et al., 2005).

1.2.2.3.2 CYP2C9 (CYP2C9/10)

CYP2C9 je exprimován hlavně v játrech a jeho hladina je nejvyšší mezi enzymy podrodiny *CYP2C*. Podílí se na metabolismu zhruba 15 % všech léčiv, jsou jimi např. nesteroidní antirevmatika, perorální antidiabetika, antiepileptika,

antikoagulancia, blokátory receptoru pro angiotensin aj (viz Tabulka 4). Jeho markerovou aktivitou je 4'-hydroxylace diclofenaku a 4'-hydroxylace tolbutamidu (Walsky a Obach, 2004). CYP2C10 se jen velmi nepatrně liší od CYP2C9 v jeho struktuře a substrátové specificitě (Guengerich, 1995), a proto jsou tyto dva enzymy považovány za jednu formu. Substráty této formy jsou slabě anionické a značně lipofilní (Smith et al., 1997). Je známo více než 30 různých alel genu *CYP2C9*, z nichž největší význam mají *CYP2C9*1* (nemutovaný, tzv. wild-type), *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* (mutované). U *CYP2C9*2* je mutace způsobená záměnou C→T v kodónu 144, což vede k záměně argininu za cystein a u *CYP2C9*3* vede změna A→C v kodónu 359 k záměně izoleucinu za leucin (Kirchheiner a Brockmoller, 2005). Obě tyto mutace vedou k proteinům se sníženou metabolickou aktivitou, a to hlavně v případě *CYP2C9*3*, kdy způsobuje pokles aktivity až o 90% ve srovnání s nemutovaným CYP2C9 (Takahashi et al., 1998; Thijssen a Ritzen 2003). *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* se vyskytuje hlavně u kavkazské populace s frekvencí 11, respektive 7%. Výskyt těchto alel je nižší u černochoů a u asiátů nebyl *CYP2C9*2* dosud nalezen (Scordo et al., 2001; Schwarz, 2003)

Tab. 4: Léčiva, uváděná jako substráty, inhibitory a induktory CYP2C9. Upraveno podle Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>. 20.8.2009 a Pelkonen et al., 2008.

substráty	inhibitory	induktory
amitriptylin celecoxib	amiodaron fenofibrat	aprepitant
diklofenak fluoxetin	fluconazol fluvastatin	barbituráty
flurbiprofen fluvastatin	fluvoxamin isoniazid	bosentan
glibenclamid glipizid	lovastatin phenylbutazon	extrakt třezalky tečkované
glimepirid glyburid	p.o. kontraceptiva probenicid	karbamazepin
ibuprofen indomethacin	sertralin sulfamethoxazol	rifampin
irbesartan lornoxicam	sulfaphenazol teniposid	ritonavir
losartan meloxicam	voriconazol zafirlukast	
naproxen nateglinid		
phenytoin piroxicam		
rosiglitazon tamoxifen		
tolbutamid torsemid		
S-warfarin		

Kromě polymorfismu má vliv na metabolismus zprostředkovaný CYP2C9 také podání inhibitorů a induktorů CYP. Ve studii Sandberga et al., (2004), provedené u 126 zdravých dobrovolníků, byla u ženské části dobrovolnic užívající perorální kontraceptiva pozorována nižší oxidace losartanu, kterou nebylo možno vysvětlit výskytem variantních alel. Rifampicin může indukovat metabolismus zprostředkovaný CYP2C9 a následně tím snižovat plazmatické koncentrace (S)-warfarinu, který je substrátem CYP2C9 (Niemi et al., 2003).

Vliv polymorfismu je asi nejvíce prozkoumán u S-warfarinu, vzhledem k jeho úzkému terapeutickému profilu. Ve studii Higashiho et al., (2002), která zahrnovala 185 pacientů léčených warfarinem (31,4% byli nosiči alespoň jedné mutované alely), bylo ukázáno, že tito pacienti jsou vystaveni 2,3x vyššímu riziku krvácivých stavů a potřebují průměrně o 95 dní delší dobu k nastavení správného dávkování. Meta-analýza zahrnující 9 studií a 2775 pacientů prokázala, že pacienti s alespoň jednou mutantní alelou jsou vystaveni 2,26x vyššímu riziku krvácivých stavů a je u nich třeba redukovat dávky. Konkrétně u nosičů CYP2C9*2 o 17% tj. o 0,85 mg (0,6 až 1,11 mg) a u nosičů CYP2C9*3 o 37% tj. o 1,92 mg (1,24 až 2,47 mg). Neposkytla však dostatek důkazů pro to, zda je ekonomicky výhodné, aby pacienti léčení warfarinem byli rutinně testováni na stanovení genotypu. U léčby warfarinem má navíc ještě vliv genotyp komplexu vitamin K epoxid reduktázy 1 (VKORC1) (Sandeson et al., 2005).

Další důležitou skupinou léků u nichž bylo testováno, zda je polymorfismus CYP2C9 rizikovým faktorem jsou nesteroidní antirevmatika. Vztah polymorfismu a vzniku typických nežádoucích účinků podání NSPZL (ulcerace a krvácení v GIT, nefropatie) byl podrobena několika studiím. S největší pravděpodobností je však vznik nežádoucích účinků spojen s dávkou a druhem léčiva a ne s polymorfismem CYP2C9. Nejvýznamnější interakcí je současné užívání kumarinových antikoagulancií (Martin et al., 2001; Vonkeman et al., 2006).

1.2.2.3.3 CYP2C19

CYP2C19 je dalším členem podrodiny CYP2C. Je exprimován hlavně v játrech a podílí se na metabolismu např. antidepresiv, inhibitorů protonové pumpy (jsou zároveň inhibitory) a některých antiepileptik. CYP2C19 je vysoce polymorfní, v kavkazské populaci se vyskytují 3 % pomalých metabolisátorů a zhruba 20 % v asijské populaci (Ingelman-Sundberg et al., 1999). Genetický polymorfismus

CYP2C19 je znám už poměrně dlouho dobu, a to podle individuálních rozdílů v metabolismu S-mephenytoinu (marker aktivity *in-vitro*) (Kupfer and Preisig, 1984). Ke vzniku fenotypu pomalého metabolisátora vede změna G→A v poloze 681, exonu 5 (alela *CYP2C19*2*). Druhá inaktivní alela vzniká změnou G→A v poloze 636, exonu 4 (alela *CYP2C19*3*) (De Morais et al., 1994). Kombinace obou alel zahrnuje 99% všech případů pomalých metabolisátorů v asijské populaci a 87% u bělochů (Xie et al., 2001). Fenotyp pomalého metabolisátora nemusí být spojen jen s výskytem nežádoucích účinků, jak je obvyklé. Pomalí metabolisátoři CYP2C19 mohou ze svého "defektu" profitovat při léčbě inhibitory protonové pumpy, díky vyšším plazmatickým hladinám a zvýšené efektivitě léčby (Kawamura et al., 2007). Vliv fenotypu při léčbě antidepresivy není tak názorný jako u léčby inhibitory protonové pumpy. Vztah dávka-účinek totiž není u antidepresiv tak jednoznačný. Byl naopak pozorován vyšší výskyt nežádoucích účinků (anticholinergní, sedativní, kardiotoxicita) u pacientů s fenotypem PM léčených amitriptylinem (Steimer et al., 2005). Nedávno byla popsána interakce mezi antiagregačně působícím clopidogrelem (Plavix[®]), který je často užíván s kys. acetylsalicylovou a inhibitory protonové pumpy, které jsou v tomto případě podávány kvůli snížení rizika krvácení do GIT. Clopidogrel je prodrug, který je na aktivní metabolit přeměňován pomocí CYP2C19. Současné užívání inhibitorů protonové pumpy (metabolisovaných za účasti CYP2C19), může snížit efekt clopidogrelu a způsobit zvýšený výskyt kardiocerebrálních příhod (Khaliq a Cheng-Lai, 2009).

1.2.2.4 CYP2D6

CYP2D6 je enzym, u kterého byl genový polymorfismus objeven jako první, a je v tomto směru nejvíce studovaným enzymem. Už v 70-tých letech byly publikovány studie, které poukázaly na rozdílnou terapeutickou odpověď pacientů léčených antiarytmikem sparteinem a antihypertenzivem debrisochinem (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Ačkoli je v játrech zastoupen jen ze 4% z celkového obsahu CYP, podílí se na metabolismu přibližně 25% všech léčiv z různých farmakoterapeutických skupin (viz Tabulka 5). Tato forma navíc není inducibilní žádnou známou látkou (Foster et al., 2007). K 25.8.2009 bylo známo 75 alel genu *CYP2D6* (www.cypalleles.ki.se). Zastoupení typů polymorfismu CYP2D6 se velmi liší napříč etnickými skupinami, nejvyšší výskyt pomalých metabolisátorů

(minimální nebo žádná aktivita enzymu) je zaznamenán v bělošské populaci (cca 7%) a zodpovědnou alelou je *CYP2D6*4*, zatímco nejmenší je u asijské populace (kolem 1%). U asijské populace je velice častá alela *CYP2D6*10* a je také zodpovědná za sníženou aktivitu enzymu CYP2D6 (fenotyp intermediárních metabolisátorů s mírně sníženou aktivitou CYP2D6). U černošské populace je za tento fenotyp zodpovědná alela *CYP2D6*17*. Co se týče ultrarychlých metabolisátorů, nejvyšší výskyt byl zaznamenán u obyvatel zemí Perského zálivu, Oceánie (21%) a u obyvatel Etiopie (29%). Vysoký výskyt tohoto fenotypu je dán evolučně a zřejmě souvisí s dietními faktory. V evropské populaci je nejvyšší výskyt ve Středozeří (10%) a naopak nejnižší ve Skandinávii (1%), což ukazuje na tzv. severo-j jižní gradient související s migrací obyvatelstva. V České republice je prevalence výskytu pomalých metabolisátorů 6,7% a ultrarychlých 3,1% (Buzková et al., 2008). U CYP2D6 byly pozorovány i rozdíly v rámci pohlaví z nichž vyplývá, že aktivita tohoto enzymu je nižší u žen (Franconi et al., 2007). Vysoký počet alel tohoto genu činí genotypizaci rizikových pacientů velice obtížnou, ačkoli už existují dostupné metody (např. AmpliChip[®] firmy Roche, <http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/pcr/amplichip.aspx> určený pro stanovení polymorfismu CYP2D6 a CYP2C19). V klinické praxi se spíše využívá stanovení fenotypu pomocí metabolismu modelové látky, např. dextromethorfanu, přičemž se sleduje poměr mateřské látky a metabolitu (čím nižší je tato hodnota, tím rychlejší metabolismus) (Frye, 2004). Genetický polymorfismus nebo inhibice CYP2D6 má samozřejmě závažné klinické důsledky. Jako příklad může sloužit kodein, který je nejčastěji užíván jako antitusikum a analgetikum. Jeho analgetický účinek spočívá v *O*-demethylaci na analgeticky aktivní morfin (který není významně metabolisován žádnou z forem CYP). Kodein sám o sobě má 300-krát nižší afinitu k μ receptorům než morfin (Armstrong a Cozza, 2003b). Tato konverze probíhá jednak v játrech, ale i v CNS, kde je CYP2D6 také přítomen (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). To může mít význam při *in-situ* metabolismu léčiv, kdy se může spolupodílet na celkovém analgetickém efektu (Chen et al., 1990). Jedinci, kteří mají fenotyp pomalých metabolisátorů *a/nebo* *ti*, kteří současně užívají inhibitory CYP2D6, (např. bupropion, cimetidin, fluoxetin, paroxetin, citalopram) tedy neprofitují z konverze kodeinu na morfin.

Podobná situace může nastat i při terapii tramadolem, který je velmi často předepisován k terapii středně silných bolestí. Jako analgetikum funguje dvojnásobně

mechanismem. Samotný tramadol, jenž je racemickou směsí (+) a (-) tramadolu, inhibuje reuptake serotoninu a noradrenalinu, zatímco jeho metabolit (+)-*O*-desmethyltramadol, který vzniká za účasti CYP2D6, působí na μ -opioidní receptory. Pacienti s fenotypem pomalých metabolisátorů vzhledem k CYP2D6 nebo ti, kteří užívají inhibitory CYP2D6, netvoří tento aktivní metabolit a neodpovídají dostatečně na léčbu (Stamer a Stüber, 2007).

Nejen pomalý metabolismus ale i fenotyp rychlého metabolisátory má svá rizika. Jako příklad může sloužit selhání terapie antidepressivy, kdy je třeba použít vyšší dávky k dosažení terapeutického efektu (Thuerauf a Lunkenheimer, 2006). V roce 2006 byl popsán případ, kdy u kojící matky s duplikovanou alelou *CYP2D6**2×2 vedoucí k fenotypu ultrarychlého metabolisátora, došlo po podání zvýšené dávky kodeinu ke smrti kojence díky otravě morfinem (Koren et al., 2006).

Výčet možných rizik při užívání léčiv metabolisovaných CYP2D6 by byl nekonečný. Do budoucna lze však v této oblasti očekávat určitý útlum, jelikož firmy uvádějící na trh nová léčiva se cíleně vyhýbají látkám jejichž metabolismus je ovlivněn CYP2D6 (Ingelman-Sundberg et al., 2005).

Tab. 5: Látky, uváděné jako substráty, inhibitory a induktory CYP2D6. Upraveno podle Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>. 20.8.2009 a Pelkonen et al., 2008.

substráty	inhibitory	induktory
alprenolol amitriptylin	amiodaron bupropion	nejsou známy
amphetamin aripiprazol	cimetidin celecoxib	
atomoxetin bufuralol	chlorpheniramin chlorpromazin	
carvedilol clomipramin	cinacalcet citalopram	
kodein debrisochin	clemastin clomipramin	
desipramin dexfenfluramin	diphenhydramin doxepin	
dextromethorphan duloxetin	doxorubicin duloxetin	
encainid flecainid	escitalopram fluoxetin	
fluoxetin fluvoxamin	H ₁ -antihistaminika halofantrin	
haloperidol chlorpheniramin	hydroxyzin chinidin	
chlorpromazin imipramin	kokain levomepromazin	
lidocain metoclopramid	methadon metoclopramid	
methoxyamphetamin	midodrin moclobemid	
metoprolol mexiletin	norfluoxetin paroxetin	
minaprin nebivolol	perphenazin ranitidin	
nortriptylin ondansetron	ritonavir sertralin	
oxykodon paroxetin	terbinafin ticlopidin	
perphenazin perhexilin		
phenacetin phenformin		
promethazin propafenon		
propranolol risperidon		
spartein thioridazin		
timolol tamoxifen		
tramadol venlafaxin		
zuclopenthixol		

1.2.2.5 CYP2E1

Ačkoli je obsah CYP2E1 v játrech poměrně vysoký, metabolisuje jen malé procento léčiv. Jeho typickými substráty jsou látky lipofilní s malou molekulou. Tento enzym je znám hlavně v souvislosti s biotransformací ethanolu a paracetamolu. Mezi jeho další substráty patří např. halogenované uhlovodíky a organická rozpuštědla (aceton, acetonitril, benzen, chloroform). Podílí se také na metabolismu inhalačních anestetik jako jsou halotan, enfluran, izofluran a sevofluran, mezi jeho další substráty dále patří např. isoniazid, disulfiram a

nitrosoaminy (Gonzalez, 2005; Guengerich a Shimada, 1991). Jako marker aktivity *in vivo* se používá chlorzoxazon (myorelaxans) (Yamazaki et al., 1995). Inhibitory této formy CYP jsou např. disulfiram, dříve používaný k odvykání alkoholismu a dialylsulfid obsažený v česneku (Yang et al., 2001). Induktory CYP2E1 jsou např. ethanol, aceton a patologické stavy jako je diabetes a hladovění (Kocarek et al., 2000; Lieber, 2004; Song, 1996). CYP2E1 se účastní i aktivace prokarcinogenů, např. nitrosaminů (Clapper, 2000) a tvorby volných kyslíkových radikálů vedoucí k poškození tkání (Gonzalez 2005). Narozdíl od jiných CYP, indukce této formy není zprostředkována vazbou ligandů na jaderné receptory, ale podílí se na ní faktory jako stabilizace mRNA a proteinu (Lieber, 1999). Velmi studovanou problematikou je metabolismus paracetamolu v souvislosti s CYP2E1. Paracetamol je velmi často užíván jako analgetikum, ať už samotný, nebo v kombinacích. Zhruba 96% podané dávky je přímo konjugováno s kyselinou glukuronovou nebo s aktivním sulfátem. Zbytek je metabolisován pomocí CYP2E1 a v menší míře i CYP1A2 a CYP3A4 na toxický metabolit N-acetyl-*p*-benzochinonimin. Ten je za normálních okolností konjugován s glutathionem. V případě deplece glutathionu dojde ke kovalentní vazbě na proteiny a ireversibilnímu poškození jater, pokud není podáno antidotum (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Hersh a Moore, 2004). Jelikož za tvorbu toxického metabolitu je zodpovědný hlavně CYP2E1 (indukovatelný ethanol) a u chronických konzumentů alkoholu navíc bývá snížená plasmatická koncentrace glutathionu, bylo provedeno několik studií, které zkoumaly vztah mezi indukcí CYP2E1 a hepatotoxicitou paracetamolu. Jejich výsledkem bylo zjištění, že paracetamol v terapeutických dávkách (4g/den) nezpůsobuje většinou hepatotoxicitu (Critchley et al., 1983; Dart et al, 2000; Slattery et al., 1996). Ipřesto FDA doporučuje snížení dávky paracetamolu u konzumentů alkoholu až na 2 g denně.

1.2.2.6 CYP3A4 (CYP3A4/5/7)

Členové podrodiny CYP3A jsou nejvíce zastoupenými formami CYP v lidských játrech, a také se podílí na metabolismu největšího počtu léčiv. Jejich podíl na metabolismu léčiv používaných v klinické praxi je zhruba 52% (Guengerich, 2003). Dalšími enzymy této podrodiny jsou CYP3A5, který je podobně jako CYP3A4 exprimován i extrahepatálně (např. v tenkém střevě), ale narozdíl od CYP3A4 je jeho celkový přínos k metabolismu zprostředovanému

CYP3A pouze minimální (Floyd et al., 2003). Forma CYP3A7 je formou fetální, její exprese začíná mezi 50 až 60-tým dnem od početí a její aktivitu postupně nahrazuje forma CYP3A4 (zhruba v 6. měsíci od porodu). U fetu se CYP3A7 účastní metabolismu endogenních substrátů jako jsou steroidy, retinoidy a deriváty žlučových kyselin. Samozřejmě se tato forma podílí na metabolismu xenobiotik, které se do fetu dostanou z vnějšího prostředí (Stevens et al., 2003).

Forma CYP3A4 je nejdůležitějším enzymem z podrodiny CYP3A. Spektrum jím metabolisovaných léčiv je extrémně široké (viz Tabulka 6), od malých molekul po velké, což ukazuje na velkou flexibilitu jeho vazebného místa (Skopalík et al., 2008). Bohužel, tato forma patří k méně stabilním formám CYP s komplikovaným mechanismem účinku, což má za následek náročnost *in vitro* studií (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001). Podobně jako jiné formy CYP, i CYP3A4 vykazuje interindividuální variabilitu, která se mezi jednotlivci může lišit až 10-krát (Floyd et al., 2003; Rodriguez-Antona et al., 2005). Tato variabilita může být způsobena jak genetickým polymorfismem, tak indukcí nebo inhibicí. U formy CYP3A4 bylo nalezeno několik mutantních alel genu pro CYP3A4, které se projevují sníženou aktivitou této formy (<http://www.cypalleles.ki.se>). Byla nalezena i alela (*CYP3A4*20*), která vede k tvorbě stopkodónu a tudíž k tvorbě nefunkčního proteinu, který neobsahuje hem. Výskyt této alely je velmi vzácný (<0.06% v kavkazské populaci) a u heterozygotů se projevuje fenotypem IM. Fenotyp bez CYP3A aktivity nebyl dosud nalezen, zřejmě díky fyziologickým funkcím CYP3A (Westlind-Johnsson et al., 2006).

Mnoho látek indukuje CYP3A4. Induktory jsou ligandy receptorů PXR, CAR a GR (glucocorticoid receptor) a následná vyšší exprese proteinu vede ke klinicky závažným důsledkům. Jedním z příkladů může být podání zdánlivě neškodných doplňků stravy, např. extraktu třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*, L.), užívané jako mírné sedativum. Tato rostlina obsahuje celé spektrum látek (z pohledu indukce CYP je nejdůležitější hyperforin) a kromě CYP3A4 indukuje i P-glykoprotein, což je přenašeč v buňkách způsobující lékovou rezistenci - MDR (multi-drug resistance) (Mannel, 2004). Klinickým důsledkem jejího užívání může být např. selhání perorálních kontraceptiv vedoucí k těhotenství (Barnes et al., 2001). Jsou taktéž popsány případy pacientů po transplantacích orgánů léčených cyclosporinem a užívajících extrakt z třezalky. Indukce CYP3A4 a P-glykoproteinu může v takovýchto případech vést k subterapeutickým koncentracím cyclosporinu a

následnému odmítnutí transplantátu (Turton-Weeks et al., 2001). Také indukce CYP3A4 rifampicinem způsobuje urychlení metabolismu methadonu a snížení jeho plazmatických koncentrací, což má za následek projev symptomů z vysazení (Lotsch et al., 2002).

Inhibice aktivity CYP3A4 má také závažné klinické důsledky. U hypertenzních pacientů léčených blokátory vápníkových kanálů je třeba se vyhnout současnému podání makrolidových antibiotik, např. clarithromycinu. Ten funguje jako silný inhibitor CYP3A4 a současné podání s nifedipinem může vést k masivní vazodilaci vedoucí k oběhovému selhání s fatálními následky. Azithromycin tuto interakci nezpůsobuje a je vhodnou terapeutickou alternativou (Gerónimo-Pardo et al., 2005). Pacienti užívající azolová antimykotika by neměli být současně léčeni inhibitory hydroxymethylglutaryl koenzym A reductázy, např. simvastatinem. Azolová antimykotika obecně jsou silnými inhibitory CYP3A4, což vede k vysokým hladinám statinů v plasmě. Tato interakce způsobuje rhabdomyolýzu, která může mít za následek poškození kosterního svalstva a akutní renální selhání (Shaukat et al., 2003). CYP3A4 se také vyskytuje v tenkém střevě, a i zde může docházet k jeho inhibici. Příkladem budiž inhibice furanokumariny obsaženými v grapefruitovém džusu. Podání 250 ml džusu jednu hodinu před užitím 50 mg sildenafilu zvyšuje jeho biologickou dostupnost až o 25%. Ačkoli se tato interakce může jevit jako velice žádoucí, nelze ji zodpovědně doporučit, jelikož farmakokinetika sildenafilu se může stát hůře předvídatelnou a může dojít k rozvoji nežádoucích účinků (Jetter et al., 2002).

Tab. 6: Nejčastěji uváděné substráty, inhibitory a induktory CYP2C9. Upraveno podle Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>. 20.8.2009 a Pelkonen et al., 2008.

substráty		inhibitory	induktory
alfentanil	methadon	amiodaron	barbituráty
alprazolam	midazolam	aprepitant	carbamazepin
amlodipin	nateglinid	carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	efavirenz
aprepitant	nelfinavir	cimetidin	glukokortikoidy
aripiprazol	nifedipin	ciprofloxacín	modafinil
astemizol	nisoldipin	clarithromycin	nevirapin
atorvastatin	nitrendipin	delaviridin	oxcarbazepin
bupiron	ondansetron	diethyl-dithiocarbamat	phenytoin
cerivastatin	pimozid	diltiazem	pioglitazon
cilostazol	propranolol	erythromycin	rifabutin
cisaprid	progesteron	fluconazol	rifampicin
clarithromycin	quetiapin	fluvoxamin	těžalka tečkovaná
cyclosporin	risperidon	grapefruitový džus	troglitazone
dapson	ritonavir	gestoden	
dexamethason	saquinavir	chloramphenicol	
dextromethorfan	salmeterol	imatinib	
diazepam	sildenafil	indinavir	
diltiazem	simvastatin	itraconazol	
domperidon	sirolimus	ketoconazol	
docetaxel	sorafenib	mibefradil	
eplerenon	sunitinib	mifepriston	
erythromycin	tamoxifen	nefazodon	
estradiol	tacrolimus	nelfinavir	
felodipin	taxol	norfloxacín	
fentanyl	telithromycin	norfluoxetin	
finasterid	terfenadin	ritonavir	
haloperidol	testosteron	saquinavir	
hydrocortison	torisel	telithromycin	
chinidin	trazodon	verapamil	
chinin	triazolam	voriconazol	
chlorpheniramin	verapamil		
imatinib	vincristin		
indinavir	zaleplon		
irinotecan	ziprasidon		
kodein	zolpidem		
kofein			
kokain			
lercanidipin			
lidocain			
lovastatin			

1.2.2.7 CYP2A6

CYP2A6 je formou, která je v játrech exprimována jen minimálně. Tato forma se podílí na metabolismu malých planárních molekul, z nichž nejznámější je nikotin a kumarin, přičemž oba se používají jako markerové substráty (Hukkanen et al., 2005). Tato forma se podílí na bioaktivaci karcinogenů, jmenovitě aflatoxinu B₁ a nitrosaminů. I tato forma je značně polymorfní, hlavně u obyvatel Orientu, kde až 20% této rasy vykazuje fenotyp pomalého metabolisátora. Alelami zodpovědnými za tento fenotyp u heterozygotů jsou hlavně *CYP2A6*2*, *CYP2A6*4* a *CYP2A6*5*. I asiáté mají vyšší výskyt fenotypu PM (kolem 12%). U kavkazské rasy tento fenotyp vykazuje méně než 1% populace (Raunio et al., 2001). Homozygyti postrádají aktivitu CYP2A6 úplně a obvykle netolerují nikotin a mají silnou averzi k cigaretovému kouři (Sellers et al., 2000). U Japonců byl také prokázán vztah PM fenotypu a nižšího výskytu rakoviny plic, kvůli nižší bioaktivaci karcinogenů (Kamataki et al., 2005; Miyamoto et al., 1999).

1.2.3 Nejdůležitější enzymy II.fáze metabolismu xenobiotik

II. fáze metabolismu zahrnuje glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, methylaci, konjugaci s glutathionem a konjugaci s aminokyselinami (glycin, taurin, glutamát). Reakce fáze II vedou ke zvýšení hydrofility a přispívají tak k snadnější eliminaci xenobiotik. Většina enzymů této fáze je cytosolická, s výjimkou UDP-glukuronosyltransferas (UGT), které se nacházejí v mikrosomální frakci. V minulosti byla věnována velká pozornost enzymům první fáze a enzymy fáze II byly poněkud opomíjeny. Tyto enzymy jsou ale neméně důležité, protože metabolisují některé endogenní substráty a podílejí se na vzniku lékových interakcí (Parkinson, 1996).

1.2.3.1 Glukuronidace

U savců je glukuronidace hlavní konjugační reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik. Reakce je katalyzována UDP-glukuronosyltransferasami a jako kofaktor vyžaduje uridin difosfátglukuronovou kyselinu (UDP-GA). Je zodpovědná za konjugaci zhruba 35% všech léčiv podléhajících konjugačním reakcím. Podílí se rovněž na metabolismu endogenních substrátů, jako jsou např. steroidní hormony,

bilirubin, hormony štítné žlázy, žlučové kyseliny a lipofilní vitamíny. Většina UGT je exprimována v játrech, ale vyskytují se i v jiných orgánech jako jsou plíce, ledviny, GIT, prostata, mozek, placenta a nosní sliznice (Tukey a Strassburg, 2000).

Názvosloví UGT je založeno na podobnosti primární struktury. UGT jsou rozděleny do dvou rodin (UGT1 a UGT2) a 3 podrodin (UGT1A, UGT2A a UGT2B), přičemž enzymy v jednotlivých rodinách sdílí 50% a v podrodinách 60% sekvence (Burchell, 2003). K 28. 8. 2009 bylo známo 21 forem UGT (http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/). UGT se podílejí na konjugaci velkého počtu látek, ale jen málo z nich má své specifické substráty. Ve většině případů se na konjugaci látky podílí více forem těchto enzymů. Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů jednotlivých forem UGT je možno nalézt na <http://www.mhc.com//Cytochromes//UGT//UGTTable.HTML>

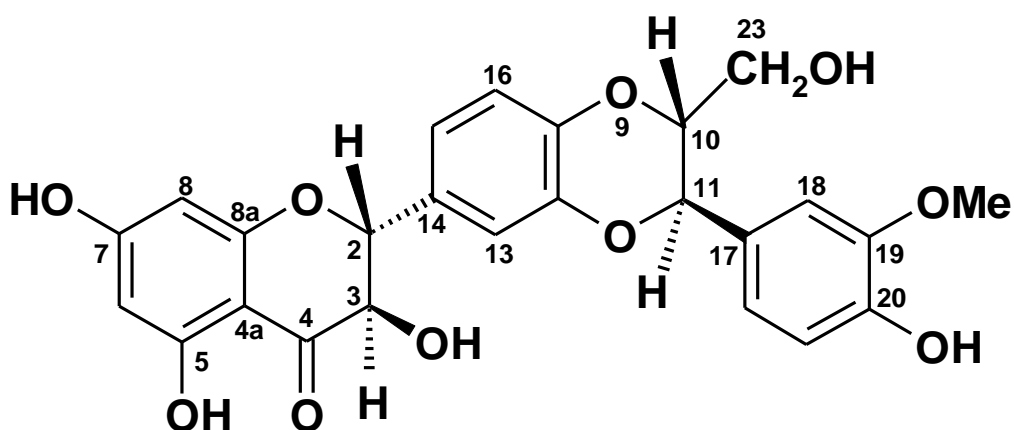
1.2.3.1.1 Nejdůležitější formy UGT

Fyziologicky velmi důležitá forma je UGT1A1, zodpovědná za konjugaci bilirubinu. Tato forma je indukovatelná phenobarbitalem, čehož se využívá u morbus Gilbert a Crigler-Najjar II syndromu, což jsou stavy spojené s hereditární hyperbilirubinemií. Podstatou těchto onemocnění je polymorfismus v exonech 2-5 genu pro *UGT1A1* vedoucí ke snížené expresi enzymu. Indukce UGT1A1 vede k vyšší expresi enzymu a snížení plazmatických koncentrací volného bilirubinu. U Crigler-Najjar I syndromu není detekovatelná žádná exprese UGT1A1 a ani žádná terapeutická odpověď na léčbu phenobarbitalem. Pacienti s touto formou syndromu často umírají během prvních měsíců života kvůli hromadění bilirubinu v CNS a následné nekróze neuronů (Kiang et al., 2005; Kraemer a Scheurlen, 2002).

Klinicky důležitou formou je UGT2B7, která je zodpovědná za konjugaci morfinu. Tato forma tvoří morfin-3-glukuronid, jenž postrádá jakoukoli analgetickou aktivitu a morfin-6-glukuronid, který je zhruba 50-krát analgeticky účinnější než morfin samotný. Tento příklad je jedním z mála, kdy konjugační reakce fáze II vede k vyšší aktivitě, než vykazuje mateřská látka. Její aktivita může být inhibována např. diclofenakem a ranitidinem, ale je v podstatě nemožné předpovědět klinické důsledky takovéto inhibice, vzhledem k množství alternativ které mohou nastat (Armstrong a Cozza, 2003a; Coller et al., 2009).

Forma UGT1A6 je jedna ze dvou nejvíce exprimovaných forem u savců a je koindukována spolu s CYP1A2 ligandy přes AhR (např. polycyklické aromatické uhlovodíky) (Emi et al., 1995), čehož se v praxi využívá při stanovení environmentální zátěže organismů (Münzel et al., 1999). V praxi je stanovení aktivity UGT1A6 (i vzhledem k jednoduchosti metody) nedílnou součástí toxikologického výzkumu. Jejimi markerovými substráty jsou planární molekuly jako např. p-nitrophenol a 4-methylumbelliferon (Hanioka et al., 2001), dále se podílí na konjugaci paracetamolu (Bock a Köhle, 2005) a účastní se i konjugace polyfenolů, např. silybinu (Obrázek 4) (D'Andrea et al., 2005).

Obr. 4: Struktura silybinu



1.2.4 Experimentální modely metabolismu xenobiotik

Jedním z cílů experimentální farmakologie je najít vhodný model pro predikci metabolismu xenobiotik u člověka. Detailní pochopení metabolických cest u experimentálních zvířat je zásadní pro včasné odhalení možných nežádoucích účinků zprostředkovaných enzymy metabolismu léčiv, hlavně cytochromy P450. I z tohoto důvodu je věnována velká pozornost jednotlivým enzymatickým formám u experimentálních zvířat s cílem najít vhodný modelový systém. Častým modelem jsou v současnosti lidské formy rekombinantních CYP heterologně exprimované v hostitelských buňkách, např. v bakteriích. Tyto modely jsou však vhodné spíše pro testování inhibičního vlivu látky na aktivitu určité formy CYP. Lepším modelem jsou mikrosomální frakce jaterního homogenátu experimentálních zvířat a člověka.

V současnosti jsou velmi často používané izolované kultury hepatocytů, jelikož tyto modely umožňují zkoumat vliv i enzymů druhé fáze a umožňují mnohem komplexnější pohled na metabolismus xenobiotik. Vzhledem k problematickému získávání lidských hepatocytů představují zvířecí buňky v prvních fázích vývoje léčiv vhodnou alternativu. I z tohoto důvodu je nutné poznat vlastnosti zvířecích CYP a i dalších enzymů účastnících se biotransformačních reakcí (Guillouzo, 1998; Soars et al., 2007). V další části bude popsáno stučné porovnání nejvíce používaných experimentálních zvířat s ohledem na metabolismus xenobiotik. Nejčastěji používanými modely jsou potkan, králík, pes, opice a prase. V souvislosti s prasetem (nebo miniprasetem) se uvažuje o možnosti, že by prase mohlo sloužit jako vhodný zdroj tkání a orgánů pro xenotransplantace (Cooper et al., 2002).

1.2.4.1 Potkan

Vzhledem k častému použití potkana coby laboratorního zvířete, byly potkaní CYP mezi prvními izolovanými a charakterizovanými CYP, jmenovitě byla izolována forma CYP1A2 (Guengerich et al., 1982; Ryan et al., 1980). Tato forma je evolučně velmi zachovalá u všech živočišných druhů a má také velmi podobnou substrátovou specificitu. Podílí se na biotransformaci aromatických aminů, polycyklických aromatických uhlovodíků a jiných planárních xenobiotik. Tato forma je inducibilní polycyklickými aromatickými uhlovodíky, např. 3-methylcholantrenem (Guengerich, 1995), nebo také β -naphthoflavonem (Bock et al., 1990). Narozdíl od člověka, furafylin je u potkana pouze slabým "mechanism-based" inhibitorem této formy. Jako markerový substrát *in vitro* se u člověka často používá 7-ethoxyresorufin, ale v případě potkana je *O*-dealkylace 7-methoxyresorufinu zprostředkovaná CYP1A2 vhodnější (Parkinson, 1996). Také potkaní CYP2E1 je vysoce podobný lidskému, ať už inducibilitou ethanolem a acetonem, nebo tím že biotransformuje organická rozpoštědla a nitrosaminy (Guengerich, 1997; Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001). Souhrně lze říci, že potkan může sloužit jako vhodný modelový organismus pro metabolismus xenobiotik zprostředkovaný těmito dvěma formami CYP.

Potkan není vhodným modelem pro metabolismus zprostředkovaný CYP3A podrodinou. Potkaní CYP3A1, hlavní forma podrodiny CYP3A u potkana není inducibilní rifampicinem, což je silný induktor CYP3A u člověka (Lu a Li, 2001). Je ale, podobně jako u člověka, indukovatelný dexamethasonem (Kishida et al., 2008).

Biotransformace midazolamu, zprostředkovaná potkaní CYP3A2 také vykazuje velkou variabilitu v závislosti na kmenu (Wistar a Sprague-Dawley) a na pohlaví (Bruyère, 2009). Dalším rozdílem je minimální exprese CYP3A1 a CYP3A2 v tenkém střevě potkana; u člověka je metabolismus zprostředkovaný intestinální CYP3A4 důležitý a např. inhibice deriváty furanokumarinů vede k obrovským rozdílům ve farmakokinetice některých léčiv (Aiba et al., 2003; Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Nejvíce zastoupenou podrodinou CYP v játrech potkana je CYP2C, zastoupená např. CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C13, 2C23. Zdá se, že tato podrodiny přebírá některé funkce lidské CYP3A4. Hydroxylace testosteronu je u potkana zprostředkována CYP2C11, ale 4'-hydroxylace S-mephenytoinu, typická pro lidský CYP2C19 je u potkana metabolisována CYP3A1 (Chovan et al., 2007). Formy CYP2A1 a CYP2A2 jsou u potkana zodpovědné za hydroxylaci testosteronu v polohách 7 a 15, zatímco lidská orthologní forma CYP2A6 tuto aktivitu nevykazuje. Rozdíl je i v metabolismu kumarinu, u člověka je hydroxylován v poloze 7 a následně konjugován s kyselinou glukuronovou a vyloučen. U potkana je biotransformován na kumarin 3,4-epoxid, který je pro tento druh hepatotoxický (Vassallo et al., 2004). U člověka je CYP2D6 zodpovědný za metabolismus zhruba 25% léčiv a je o něm známo, že není inducibilní a navíc vykazuje značnou interindividuální variabilitu. U potkana vykazuje podrodina CYP2D (CYP2D1, CYP2D2, CYP2D3 a CYP2D4) také značnou interindividuální variabilitu, její aktivita zjišťovaná pomocí metabolismu diazepamem vykazuje rozdíly i rámci jednotlivých kmenů (Sakai et al., 2005). Navíc je potkaní CYP2D je inducibilní 3-methylcholantrenem. Dalším rozdílem je zřejmě inhibice, zatímco u člověka je inhibítorem chinidin, u potkana je to u formy CYP2D1 jeho levotočivý diastereoizomer chinin (Parkinson 1996; Zuber et al., 2002). Celkově vzato, potkan není vhodným modelem pro látky metabolisované CYP2D6.

1.2.4.2 Králík

Králík je jako experimentální model používán velmi dlouho. Už Aničkov v roce 1913 dokázal, že králík je vhodným modelem pro studium atherosklerózy u člověka (Aničkov, 1913). Králík se také využívá pro testování potenciálních léčiv z oblasti dermatologie a oftalmologie. Prvními savčími cytochromy P450, které byly izolovány a charakterizovány byly právě enzymy králičí. Tyto enzymy byly označeny P450LM2 (odpovídá CYP2B4) a P450LM4 (odpovídá CYP1A2) (Haugen

a Coon, 1976; van der Hoeven et al., 1974). Podobně jako u potkana, i CYP1A2 vykazuje podobné vlastnosti, včetně indukovatelnosti (Hashimoto a Imai, 1976), substrátové specificity a aktivace prokarcinogenů (Stoilov et al., 2001). Forma CYP2E1 je podobně jako u člověka zodpovědná za metabolismus inhalačních anestetik a alloxanem vyvolaný diabetes indukuje tuto formu (Arinç et al., 2005). U králíka je stejně jako u potkana nejdůležitější podrodina CYP2C, jenž i zde přebírá funkce lidské CYP3A včetně oxidace steroidních hormonů (Tukey et al., 1985). Králičí forma CYP3A je podobně jako u člověka je exprimovaná i ve střevě a je inhibovatelná flavonoidem quercetinem (Choi a Li, 2005). Lidský CYP2D6 zatím nemá u králíka svůj orthologní enzym. Zatím jsou známy jen geny 2 forem, CYP2D23 a CYP2D24, ale proteiny dosud nebyly charakterizovány (Yamamoto et al., 1998). Celkově vzato, díky velkým rozdílům ve vlastnostech CYP2C, 3A a neznalosti CYP2D je králík jako model biotransformace léčiv u člověka málo vhodným organismem.

1.2.4.3 Pes

Využití psa (beagle), coby experimentálního modelu není příliš časté, hlavně kvůli etickým důvodům. Psí CYP1A2 vykazuje velkou interindividuální variabilitu. Byly nalezeny i mutace v genu pro psí *CYP1A2*, které vedou zhruba u 10-15% beaglů k nulové aktivitě CYP1A2 (Kamimura, 2006; Tenmizu et al., 2004; Tenmizu et al., 2006). Ciprofloxacin a i jiné fluorochinolony inhibují, podobně jako u člověka, ethoxyresorufin *O*-deethylaci typickou pro CYP1A2 (Regmi et al., 2005). Indukce CYP1A2 je u psa zprostředkována jak omeprazolem, tak β -naftoflavonem, tedy stejnými induktory jako u člověka (Jayyosi et al., 1996; Lu a Li, 2001). V případě indukce CYP2E1 nebyly pozorovány žádné významné změny v biotransformaci *p*-nitrophenolu a chlorzoxazonu, což jsou typické substráty CYP2E1. Je tedy velmi pravděpodobné, že mechanismus indukce této formy je jiný než u člověka (Graham et al., 2002). Vzhledem k častému polymorfismu CYP1A2 a rozdílnému mechanismu indukce CYP2E1 není pes vhodným modelem pro metabolismus látek zprostředkovaný těmito dvěma formami CYP. Zajímavou formou CYP u psa je CYP2D15, který tvoří zhruba 15% všech psích jaterních CYP (Roussel et al., 1998). Při použití propranololu jako substrátu se ukázalo, že pes a člověk tvoří přednostně 4-hydroxylovaný metabolit a liší se tím od potkana, který tvoří téměř výhradně 7-hydroxylovaný metabolit (Fujita et al., 1993; Ishizuka et al.,

2006). CYP2D15 také vykazuje aktivitu vůči bufuralolu a dextromethopphanu, což jsou oba typické substráty lidské CYP2D6. Inhibitory této formy jsou jak chinin (typický pro potkana), tak chinidin (typický pro člověka) (Roussel et al., 1998). Ze všech experimentálních zvířat je pes zřejmě nejvhodnějším kandidátem na testování látek u nichž se očekává vliv CYP2D6. Podrodina CYP2C je u psa zastoupena CYP2C21 a CYP2C41. Zatímco druhá jmenovaná je exprimovaná jen u některých jedinců (cca 45%), CYP2C21 je exprimován u všech (Graham et al., 2003). Substrátová specifita této podrodiny je odlišná od lidské, CYP2C21 je zodpovědný za 16 α -hydroxylaci testosteronu a žádná z psích CYP2C nevykazuje S-mephenytoin 4'-hydroxylaci typickou pro CYP2C19 (Shou et al., 2003). Podrodina CYP3A, u psa zastoupená formou CYP3A12 vykazuje určité společné vlastnosti s lidskou CYP3A4. Jsou jimi jednak hydroxylace testosteronu (u psa v poloze 6- β) a také inhibice ketokonazolem (Lu et al., 2005). Také rifampicin, ale na rozdíl od člověka ne dexamethason, je schopen indukovat CYP3A12 (Lu a Li, 2001). Zajímavým enzymem u psa je CYP2B11, který je jako jediný savčí CYP schopen metabolizovat polychlorované bifenyly (Guengerich, 1997). Tato forma také katalyzuje N₁-demetylaci midazolamu a diazepamem a její aktivita je selektivně inhibována N-(alpha-methylbenzyl)-1-aminobenzotriazolem (Lu et al., 2005).

1.2.4.4 Opice

Už Charles Darwin předpověděl, že člověk a lidoopi jsou si vývojově nejbližší (Darwin, 1871) a moderní metody jeho domněnku potvrdily (The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005). Lidoopi však nejsou z důvodů etických, finančních nebo z důvodu náročnosti chovu příliš často využíváni. Mnohem více se využívá opic úzkonosých (v anglické literatuře označování jako cynomolgus monkeys), hlavně makaků (*Maccaca rhesus*, Z.; *Macaca fascicularis*, R.) a opic ploskonosých (v anglické literatuře označování jako marmoset monkeys), hlavně kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*, L.). U úzkonosých opic byla popsána malá exprese CYP1A2, ale podobně jako u člověka je tento enzym indukovatelný β -naftoflavonem (Berthou et al., 1992; Bullock et al., 1995). Lepším modelem je v tomto případě kosman, jehož CYP1A2 vykazuje vlastnosti podobné lidské formě (Sakuma et al., 1997). V případě CYP2A, úzkonosé opice vykazují stejnou substrátovou specifitu a indukovatelnost jako člověk a zdají se být dobrým modelem (Pearce et al., 1992). CYP3A8 a CYP3A5 mají sice u makaka

substrátovou specificitu podobnou člověku (Uno et al., 2007), ale mají jiný mechanismus indukce, jelikož na rozdíl od člověka jsou indukovatelné 3-methylcholantrenem (Komori et al., 1992). V případě podrodiny CYP2C, která u makaků zahrnuje CYP2C20, CYP2C43, CYP2C75 a CYP2C76 se zdá, že by makak mohl být vhodným modelem. Členové této podrodiny totiž metabolisují podobné substráty jako lidské CYP2C, jmenovitě paclitaxel, tolbutamid a S-mephenytoin (Uno et al., 2006; Mitsuda et al., 2006). I v případě glukuronidace se makak zdá být dobrým modelem (Barbier a Bélanger, 2003).

1.2.4.5 Prase (miniprase)

Prase se už dlouho využívá jako experimentální organismus např. v dermatologii (Kerrigan et al., 1986). Zdá se však, že by mohlo sloužit i jako výborný model v oblasti experimentální farmakologie jako modelový organismus metabolismu léčiv. V prasečích mikrosomech totiž byly nalezeny všechny hlavní enzymové aktivity CYP typické pro lidské formy (Anzenbacher et al., 1998; Monshouwer et al., 1998). I když ne všechny prasečí CYP byly osekvenovány a prozkoumány detailně, jejich spektrum se stále rozrůstá. V případě CYP1A2 byla stejně jako u člověka zjištěna indukce polychlorovanými bifenyly a β -naftoflavonem (Lu a Li, 2001). Prasečí CYP1A2 také metabolisuje markerové substráty lidského CYP1A2, methoxyresorufin a ethoxyresorufin podobně jako člověk, a zdá se tedy, že by prase mohlo být vhodným modelem (Matal et al., 2009a; Messina et al., 2008). Rozdíly oproti člověku jsou zřejmě v substrátové specificitě CYP2D. U prasete byly zjištěny pozitivní korelace mezi metabolismem dextromethorfanu a bufuralolu a hladinami CYP2B stanovenými imunochemicky. Také orfenadrin, inhibitor lidské CYP2B, inhiboval u prasete metabolismus dextromethorfanu a bufuralolu (Skaanild a Friis, 2002). CYP2E1 byl u izolován u miniprasete a detailně prozkoumán (Baranová et al., 2005). Bylo zjištěno, že vykazuje vlastnosti podobné lidskému CYP2E1. V rekonstituovaném systému tento enzym vykazoval aktivitu vůči typickým substrátům lidské formy, tj. p-nitrofenolu a chlorzoxazonu. Potvrdila se i inhibice enzymových aktivit CYP2E1 pomocí diethyldithiokarbamátu, typického inhibitoru lidských CYP. Taktéž analýza pomocí Western blottingu ukázala jeho imunoreaktivitu s protilátkami proti lidskému P450 2E1 (Baranová et al., 2005). Podobně jako u člověka hydroxyluje bupropion, a zdá se že by mohl být u prasete vhodným specifickým substrátem (Skaanild a Friis, 2007). Z podrodiny

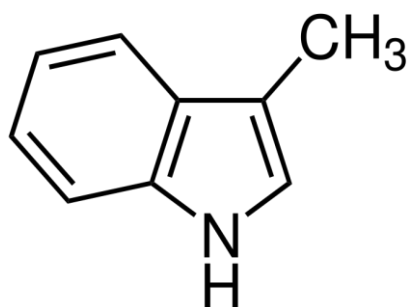
CYP2D byl u prasete izolován CYP2D25, který katalyzuje 25-hydroxylaci vitamínu D₃ (Axén et al., 1992). cDNA klon kódující miniprasečí CYP2D21 vykazuje podobnost primární struktury aminokyselin 78,3% (vůči CYP2D6) a rekombinantní enzym vykazuje také 1'-hydroxylaci bufuralolu (Sakuma et al., 2004), což je typická aktivita CYP2D6. Celkově je podrodina CYP2D u prasete málo prozkoumaná, zdá se ale, že vykazuje vlastnosti odlišné od lidské CYP2D6 (Anzenbacher et al., 1998).

Nejvýznamnější formou CYP u člověka je forma CYP3A4. U prasete je podrodina CYP3A zastoupena třemi dosud známými enzymy: CYP3A22, CYP3A29 a CYP3A39. Hlavní formou u prasat a miniprasat je CYP3A29 a jejich CYP jsou z 99% identické. Proto je také v literatuře používáno souborné označení (mini)prase (Souček et al., 2001). Tato forma, jak se zdá, vykazuje vlastnosti velmi podobné lidské orthologní formě CYP3A4. Je indukovatelná rifampicinem a fenobarbitalem (Monshouwer et al., 1998; Myers et al., 2001; Shang et al., 2009) a metabolisuje i podobné substráty, např. byla zjištěna typická oxidázová aktivita nifedipinu (Anzenbacher et al., 1998; Souček et al., 2001). Prasečí mikrosomy také vykazují 6 β -hydroxylaci testosteronu, taktéž typickou aktivitu CYP3A4 (Anzenbacher et al., 1998; Szotáková et al., 2004). Podobná je i tkáňová distribuce, exprese CYP3A29 mRNA byla u miniprasete zjištěna hlavně v játrech a v menší míře pak v tenkém střevě, ledvinách a v kůži (Shang et al., 2009). Poněkud složitější je situace v případě podrodiny CYP2C. U prasete je eximováno více forem CYP2C, např. CYP2C32, CYP2C33, CYP2C34, CYP2C49, ale detailní informace o jejich indukovatelnosti a substrátech chybí (Nissen et al., 1998). Ve studii provedené na mikrosomech z 20 různých prasat bylo dokázáno, že prase metabolisuje substráty odpovídající lidským CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19. Těmito testovanými látkami byly paclitaxel, tolbutamid a omeprazol, nicméně podle výsledků experimentu se zdá, že u prasete je za metabolismus všech tří látek zodpovědný jen jeden enzym, a to forma odpovídající lidské CYP2C9 (Skaanild a Friis, 2008). CYP2A je u prasete zastoupen formou CYP2A19, která má zřejmě podobnou substrátovou specificitu jako orthologní CYP2A6. V mikrosomální frakci byla potvrzena korelace mezi množstvím CYP2A19 a biotransformací typických substrátů, jmenovitě nikotinu a kumarinu (Skaanild a Friis, 2005). V rekonstituovaném systému tento enzym také vykazoval 7-hydroxylaci kumarinu a jeho aktivita byla inhibována 8-methoxypsoralenem, inhibitorem této formy u člověka (Matal et al., 2009a).

1.2.4.5.1 Prase a metabolismus skatolu

Skatol (3-methylindol – 3MI) (Obrázek 5), je přirozeně se vyskytující mikrobiální metabolit tvořený z tryptofanu v gastrointestinálním traktu přežvýkavců (Yokoyama a Carlson, 1979), lidí (Fordtran et al., 1964) a prasat (Jensen et al., 1995), který se vyskytuje ve stolici. 3MI je po své aktivaci CYP na elektrofilní metabolity schopen poškozovat plicní tkáň (Bray a Kubow, 1985), ačkoli u člověka nebyly dosud provedeny detailní studie (Skordos et al., 1998). Člověk může být vystaven vlivu 3MI buď díky absorpci z GIT, pobytem v nevětraných prostorách v zemědělství (např. vepřiny) nebo i vdechováním cigaretového kouře (Diaz et al., 1999; Upadhyay a Holbrook 2004). Prasata, na rozdíl od jiných zvířat, nejsou k toxicitě 3MI vnímavá, což naznačuje, že mohou metabolisovat skatol odlišně (Thornton-Manning et al., 1998). U člověka se na metabolismu skatolu podílí několik forem CYP; v *in vitro* studiích s rekombinativními enzymy byl prokázán podíl CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP2F2 a CYP2F3 (Lanza a Yost, 2001). U prasete má 3MI velký vliv na produkci masa. Nekastrovaní samci totiž v 5-10% procentech případů hromadí skatol a androstenon v tuku. Jejich maso se v důsledku zápachu (v anglické literatuře boar-taint), jehož je skatol hlavní příčinou, stává nepoživatelné, což způsobuje značné hospodářské ztráty (Bæk et al., 1995). Není dosud známo, proč jen určité procento samců hromadí 3MI; důvodem může být i nízká exprese nebo aktivita enzymů metabolisujících tuto látku. Dle dosud známých výsledků metabolity skatolu k zápalu nepřispívají (Diaz a Squires, 2000a). U prasat se na metabolismu 3MI podílí CYP2E1 a CYP2A19, ale uvažuje se i o roli dalších enzymů. Až dosud však byly přístupy k objasnění CYP zapojených do biotransformace 3MI nepřímé, spočívající v použití protilátek a inhibitorů forem CYP. Tyto výsledky však nemusí být úplné, i vzhledem k tomu, že inhibitory nemusí vždy inhibovat jen jednu formu CYP ale mohou částečně ovlivňovat i jinou (Terner et al., 2006). Tyto poznatky jen vyzdvihují nutnost objasnit podíl dané formy CYP použitím jeho čisté formy, např. v rekonstituovaném systému. Izolace čistých prasečích CYP, tak jak je popsána dále v této práci, může pak pomoci k objasnění metabolismu této a mnoha dalších látek s nimiž se experimentální organismy mohou potkat. Výzkum prasečích biotransformačních enzymů je důležitý i z toho pohledu, že prase může být potenciálním donorem hepatocytů v bioarteficiálních náhradách jater, jakýchsi "obdob" umělých ledvin (Couzin 2000; Desille et al., 1999).

Obr. 5: Struktura skatolu



1.2.4.5.2 Prase a bioartifciální jaterní náhrady (BAL)

Transplantace jater je poslední možností léčby u pacientů s jaterním selháním. Navzdory tomu, že játra jsou orgánem s obrovskou samoobnovovací schopností, mnoho pacientů umírá ještě dříve, než se dočkají vhodného dárce. Bohužel, ani transplantace jater není bez rizik a tělo příjemce nemusí transplantát vždy přijmout. U akutního jaterního selhání, způsobeného např. léky nebo hepatitidami, by v některých případech stačilo poskytnout játrům čas na regeneraci nebo překlenout u chronických pacientů čas k nalezení vhodného dárce (van de Kerkhove et al., 2004b). K řešení těchto problémů bylo navrženo více přístupů. Nejjednodušším bylo napojení jater jiného biologického druhu, prasete, na jaterní oběh člověka (Levy et al., 2000). Je skutečností, že u xenotransplantace od jiných živočišných druhů, se stále nejvíce uvažuje o praseti. Ačkoli je prase člověku po fyziologické stránce podobné, existují v některých funkcích velké rozdíly. Játra nejsou jen orgánem biotransformačním, ale syntetizují obrovské množství enzymů a regulačních faktorů. Velmi problematickým se v současné době jeví např. odlišné vlastnosti proteinů komplementu. Při xenotransplantaci prasečích jater člověku by tak při aktivaci alternativní cesty mohl prasečí komplement likvidovat endotel kapilár v orgánech, s následným poškozením těchto orgánů (Robson et al., 1995). Dalším potenciálním problémem by mohly být odlišné vlastnosti prasečího albuminu (Hammer, 2004), jako hlavního proteinu lidské plasmy a také potenciální riziko přenosu prasečích endogenních retrovirů. Tato otázka je velmi intenzivně studovaná, neboť přenos nových retrovirů by mohl mít následky srovnatelné s pandemií HIV/AIDS. Ačkoli za tisíce let soužití lidí a prasat nebyl takovýto přenos *in vivo* potvrzen, v *in vitro* experimentu s kulturou primárních lidských hepatocytů a infikovaných prasečích buněk byla po 8-10 denním kontaktu prokázána přítomnost

prasečího retroviru v lidských buňkách (Frühauf et al., 2009). Další z možností je vyšlechtění transgenních prasat, i když je výzkum v této oblasti teprve v začátcích (Poncelet et al., 2009). Použití multipotentních kmenových buněk, které by se v játrech mohly diferencovat na zdravé hepatocyty, je taktéž do budoucna nadějně (Strain a Neuberger, 2002). Bohužel výzkum v této oblasti naráží také na otázky politické, náboženské a právní, a tak je použití lidských kmenových buněk spíše hubbou budoucnosti.

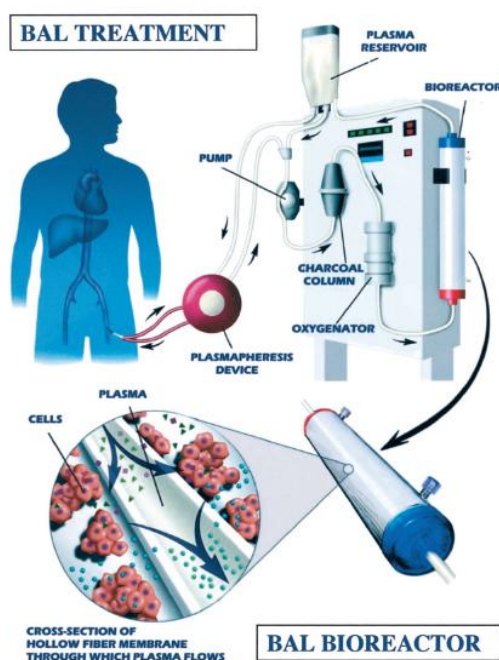
Jaterní náhrady jsou konstruovány s cílem pomoci pacientovi přečkat čas nezbytný pro nalezení vhodného dárce jater. Bylo navrženo mnoho přístupů řešení a zkonstruováno více typů přístrojů. Jsou to mimotělní systémy, které jsou připojeny k pacientovu krevnímu oběhu, přičemž krev nebo plasma pacienta prochází těmito systémy. V zásadě se dělí na arteficiální (umělé) a bioarteficiální (polo-umělé). Arteficiální systémy jsou založeny na průchodu plasmy či krve přes dialyzační jednotku. V klinické praxi se využívá např. systém MARS (Molecule Adsorbent Recirculating System) založený na dialýze plasmy proti roztoku albuminu a odstraňuje vodu, látky hydrofilní a látky vázané na albumin (Stange et al., 1993; Stange et al., 2002). V roce 2008 Kantola et al., (2008), publikoval studii zahrnující 113 pacientů s akutním jaterním selháním, kteří mezi lety 2001-2007 podstoupili terapii s MARS. Výsledkem bylo, že pacienti kteří podstoupili tuto terapii vykazovali vyšší míru samoobnovení činnosti jater (49% vs 17% ve skupině kontrol), a jen 29% nakonec potřebovalo transplantaci jater oproti 57% pacientů v kontrolní skupině.

BAL jsou v zásadě založeny na bioaktivní hmotě, reprezentované izolovanými hepatocyty lidského nebo zvířecího původu. Tyto systémy byly vyvinuty nejen napodobovat detoxifikační funkci jater, ale také napodobit jejich další funkce, např. metabolismus nutrientů, funkci cytochromů P450 a syntézu proteinů. I zde bylo vyvinuto několik systémů. Tyto systémy obsahují buď lidské (linie C3A) nebo prasečí hepatocyty (linie podle Demetriou). Systém obsahující lidské hepatocyty (ELAD – Extracorporeal Liver Assist Device) zatím podle dostupných dat nemá pozitivní výsledky jak u psů (Sussman et al., 1992), tak u lidí (Ellis et al., 1996).

Slibnějšími se zdají být výsledky dosažené se systémy obsahujícími prasečí hepatocyty. Systém AMC-BAL (Amsterdam Medical Center – Bioartificial Liver), vyvinutý v roce 1997 (a stále zdokonalovaný) skupinou kolem Chamuleaua (van de

Kerkhove et al., 2005) vykazoval v klinických studiích pozitivní výsledky. U pacientů bylo zaznamenáno snížení hladin bilirubinu, amoniaku a také zlepšení neurologických a hemodynamických stavů. 11 pacientům z 12 testovaných pomohl tento systém přežít do doby, než se dočkali transplantace a jeden pacient nakonec přežil i bez transplantace (van de Kerkhove et al., 2002; van de Kerkhove et al., 2004a). Dosud největší studie byla publikovaná v souvislost s použitím systému HepAssist™ (Obrázek 6), který FDA schválila pro I, II a III fázi klinických zkoušek. Tento systém obsahuje prasečí hepatocyty a je doplněn kolonou obsahující aktivní uhlí a kombinuje tak prvky arteficiálních a bioarteficiálních jaterních náhrad (Rozga et al., 1993). Tento systém, který obsahuje 7 mld prasečích hepatocytů, byl použit v randomizované, kontrolované, multi-centrické studii (11 pracovišť v USA a 9 v Evropě) u celkového počtu 171 pacientů (86 kontrol a 85 BAL) s akutním jaterním selháním. 30 dní přežilo 71% pacientů s BAL a 62% kontrol. Po vyloučení pacientů s primární nefunkčností jater bylo přežití 73% s BAL versus 59% u kontrol. Přežití pacientů s náhlým jaterním selháním bylo signifikantně vyšší u pacientů sBAL v porovnání s kontrolami. Navíc tento systém snižuje o 67% riziko smrti před transplantací u pacientů s otravami léky a nebo jedy. Tato studie demonstruje bezpečnost tohoto systému a zlepšení přežití u pacientů s náhlým jaterním selháním (Demetriou et al., 2004).

Obr. 6: BAL bioreaktor (Demetriou et al., 2004)



Ačkoli je použití lidských hepatocytů v BAL dosud málo prozkoumané a jejich použití je složitější z právního a etického hlediska, lze do budoucna očekávat v této oblasti intenzivní vývoj. BAL založené na prasečích hepatocytech zatím poskytují vhodnou, bezpečnou a dostupnou alternativu a v případě pokroku v oblasti genového inženýrství a vyšlechtění transgenních prasat by mohly tyto systémy nahradit lidské buňky úplně.

Výsledky této práce a práce dalších laboratoří ukazují na vysoký stupeň podobnosti lidských a prasečích CYP. Cílem předkládané práce bylo přispět, byť omezeně, k dalšímu poznání v oblasti studia vlastností prasečích CYP.

2 Cíle disertační práce

- získat čistý CYP1A2 a CYP2A19 z jaterní mikrosomální frakce buněčného homogenátu prasete v čisté formě
- ověřit vlastnosti získaných enzymů (tj. jejich imunoreaktivitu, aktivitu vůči typickým substrátům a inhibitorům lidských orthologních forem v rekonstituovaném systému)
- v rekonstituovaném systému ověřit vliv izolovaných forem CYP na metabolismus skatolu
- zjistit základní kinetické parametry UGT1A6 jako jednoho z nejdůležitějších enzymů druhé fáze u prasete, člověka, opice, psa a potkana s prototypovými substráty této formy

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Cytochrom b₅ a prasečí CYP2E1 byly darem Doc. Anzenbacherové a Dr. Baranové-Jandové, 2-merkaptoetanol, DL-isocitrát, glycin, persíran amonný, brilantová modř R 250, bromfenolová modř, isocitrátdehydrogenasa (IDH), akrylamid, kyselina cholová, L- α -dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), N,N'-methylen-bis-akrylamid, oktyl-agarosa CL-4B, dodecylsíran sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED), TRIS-HCl, Triton X-100 PC, Tween 20, NADP, kumarin, 7-hydroxykumarin, 7-methoxyresorufin (MERR), 7-ethoxyresorufin (ETRR), resorufin, uridindifosfát glukuronová kyselina (UDP-GA), p-nitrofenol (p-NP), 4-methylumbelliferon (4-MU), p-nitrophenyl glukuronid, 4-methylumbelliferyl glukuronid, furafyllin, diethyldithiokarbamát (DEDC), 8-methoxypsoralen, dialyzační membrána, skatol, indol-3-carbinol, 3-methyloxindol, 2-aminoacetophenon, triethanolamin a silybin byly dodány firmou Sigma-Aldrich, Praha, CZ. BCA protein kit (Pierce, Rockford, IL), butylhydroxytoluen (BHT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Buchs SG, Švýcarsko), dithioničitan sodný (Fluka, Buchs SG, Švýcarsko), glycerol, acetonitril, methanol (Merck, Praha, CZ), EDTA·2H₂O, dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný, chlorid vápenatý, chlorid hořečnatý, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, sacharóza, kyselina chloristá, kyselina mravenčí, dimethylsulfoxid, kyselina octová, ethanol (Lach-Ner, Neratovice, CZ), oxid uhelnatý, dusík (Linde-Gas, Wiesbaden, Německo), GBX Fixer and Replenisher, GBX Developer and Replenisher (Kodak, dodává Sigma-Aldrich, Praha, CZ), Western Blotting Luminol Reagent kit (Biotechnology, Santa Cruz, CA), nitrocelulózová membrána Hybond-P (Amersham, Little Chalfont, Velká Británie), rentgenový film Medix XBU (Foma, Hradec Králové, CZ), rabbit anti-human CYP1A2 protilátka (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Německo), goat anti-rat CYP1A2 protilátka (Daichi Pure Chemicals, Tokyo, Japonsko, dodává I.T.A.-Interact, Praha, CZ), mouse anti-human CYP2A6 protilátka (BD Biosciences, San Jose, USA, dodává I.T.A.-Interact, Praha, CZ), lidská NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktáza (P450 reduktáza), lidský CYP1A2, CYP2E1 (Panvera-Invitrogen, Carlsbad, USA), lidské jaterní mikrosomy (Biopredic, Rennes, Francie) byly vyrobeny resp. dodány uvedenými firmami. Játra z experimentálních zvířat (pes, potkan, opice) byla získána dle schválených etických postupů, prasečí játra byla získána z jatek (Masonava, Olomouc), membrány E. coli s exprimovaným

CYP2A6 byly darem Dr. Pavla Součka, Státní zdravotní ústav, Praha, ČR), izolovaný CYP2A6 připravený podle Souček, (1999) byly darem Doc. Anzenbacherové. 3-hydroxy-3-methyloxindol poskytl laskavě Dr. Garri Yost (Department of Pharmacology and Toxicology, University of Utah, Salt Lake City, UT). Hydroxyapatit byl vyroben srážením podle Levina (Levin, 1962).

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. vhodné pro práci s biologickým materiálem a pro HPLC stanovení.

3.2 Přístroje

Chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle, dodává Biotech, Praha, CZ), ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman, dodává Biotech, Praha, CZ), rotor 70 Ti (Beckman, dodává Biotech, Praha, CZ), magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph, Německo), ultrazvukový homogenizátor (IKA, Praha, CZ), Potter-Elvehjemův homogenizátor s teflonovým pístem, skleněné kolony 40x4 cm, 20x2 cm, automatický sběrač frakcí LKB 2111 MultiRac (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), UV-VIS spektrofotometr Cary 4000 (Varian, Palo Alto, CA), HPLC systém VP-class (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), HPLC systém Shimadzu LC-20A Prominence (Kyoto, Japonsko), hmotnostní spektrometr LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), kolona LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm I.D. s náplní 5 µm) (Merck, Praha, CZ), aparatura pro SDS PAGE MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA), aparatura pro Western Blotting MiniTransBlot (BioRad, Hercules, CA), elektrický zdroj PowerPac 200 (BioRad, Hercules, CA), cela pro ultrafiltraci (Millipore, Praha, CZ), ultracentrifugační zkumavky (Immunotech, Praha, CZ), vodní lázeň WB 14 (Memmert, Německo), ultrazvuk (Tesla, Praha, CZ), sonikátor (Dynatech, Brno, CZ)

3.3 Software

MS-Excel 2003 (Microsoft®), ISIS-Draw (MDL® Information systems, www.mdli.com), Sigma Plot 8.0.2 (SPSS, Chicago, IL)

3.4 Rekrystalizace kyseliny cholové

Komerčně dodávaná kyselina cholová obsahuje příměši žlučových barviv a proto musela být provedena její rekrystalizace. 100 g kys. cholové bylo rozpuštěno

v 750 ml 50% (v/v) ethanolu a na vodní lázni se za stálého míchání bylo přivedeno k varu. Po přidavku 12g aktivního uhlí, 0,5g EDTA, 5g křemeliny byla směs ještě několik minut udržována při varu. Horká směs byla co nejrychleji přefiltrována přes řádně vyhřátou Büchnerovu nálevku a filtrát se nechal přes noc krystalizovat při pokojové teplotě. Vyloučené krystalky pak byly odděleny od matečného louhu filtrací (výtěžek cca 50-90 %). Z 50g rekrystalizované kyseliny cholové byl připraven 20% zásobní roztok v 250 ml vody s 4,9 g NaOH (stálé míchání, postupně přidáván NaOH) (Philips a Shephard, 1998).

3.5 Jaterní tkáň

Játra byla získána z prasat z místních jatek (Masonava, Olomouc). Zvířata (kastrovaní samci, věk 9 měsíců, hmotnost zhruba 100 kg) byla poražena pod veterinárním dohledem. Zvířatům nebyla podána žádná látka indukující jaterní mikrosomální enzymy. Játra byla umístěna do homogenizačního pufru (viz dále) a poté byla uchovávána při teplotě -80°C v hlubokomrazícím boxu až do použití.

3.6 Příprava jaterní mikrosomální frakce prasete

Jaterní tkáň (100-120g) byla zvážena a nechána rozmraznout na ledu, pak byla nakrájena se na kostky cca 1 cm^3 , které byly promyty v roztoku o složení: 0,25 M sacharóza, 1mM EDTA, 0,2 mM PMSF (inhibitor serinových proteáz) a 20 μM BHT (antioxidant), pH 7,4 (homogenizační pufr). Homogenizace prasečích jater byla provedena v nožovém mixéru s přidavkem vychlazeného homogenizačního pufru o objemu rovnajícimu se trojnásobku hmotnosti jaterní tkáně. Mikrosomální frakce jaterního homogenátu byla získána frakční centrifugací (Lake, 1990). Homogenát byl centrifugován při 4000 x g, 10 minut při 4°C . Získaný supernatant byl slit a dále centrifugován při 11 000 x g, 25 minut při 4°C . Supernatant byl opět slit a centrifugován (ultracentrifuga) při 105 000 x g, 60 minut při 4°C . Získaný sediment byl rehomogenizován v promývacím pufru o složení: 0,5 mM TRIS, 0,15 M KCl, 20% (v/v) glycerol, pH 7,4 v poměru 0,2 ml pufru na 1g výchozí jaterní tkáně. Suspenze byla znovu podrobena centrifugací při 105 000 x g, 60 min a 4°C . Získaná mikrosomální frakce (sediment) byla bohatá na cytochromy P450 ale i jiné

enzymy. Byla použita k izolaci forem CYP1A, CYP2A19 a k dalším experimentům (Philips and Shephard, 1998).

3.6.1 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Obsah cytochromu P450 byl vypočítán z diferenčního spektra redukovaného cytochromu a redukovaného cytochromu v komplexu s oxidem uhelnatým (Omura and Sato, 1964). Postup lze použít jak pro cytochromy obsažené v mikrosomech, tak pro izolované formy. V případě vysoké koncentrace P450 lze vzorek zředit pufrům (50 mM KH_2PO_4 , 20% (v/v) glycerol, pH 7,4) tak, aby jeho absorbance byla kolem 0,1 (v případě jaterních mikrosomů to odpovídá přibližně dvacetinásobnému zředění). Při stanovení bylo do dvou kyvet přidáno malé množství dithioničitanu sodného (1-3 mg), které zredukuje CYP. Následně byl vzorek promíchán a rozdělen do dvou spektrofotometrických kyvet. Byla zaznamenána základní linie od 380 do 500 nm. Vzorková kyveta byla poté opatrně probublána pomalým proudem malých bublin oxidu uhelnatého po dobu asi 20 sekund a pak bylo zaznamenáno spektrum. Komplex redukovaného CYP s oxidem uhelnatým má charakteristické absorpční maximum při 450 nm. K výpočtu koncentrace byla použita hodnota molárního absorpčního koeficientu $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Omura and Sato, 1964).

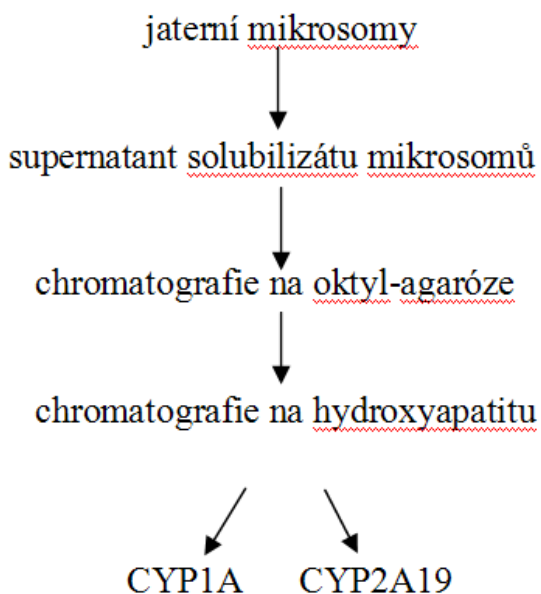
3.6.2 Stanovení obsahu proteinu

Obsah proteinu byl měřen metodou, která je založena na principu redukce Cu^{2+} proteinem v zásaditém prostředí (biuretová reakce). Vzniklý Cu^{1+} se detekuje kolorimetricky po vazbě s bicinchoninovou kyselinou (BCA) (Smith et al., 1985). V přítomnosti proteinů v bazickém prostředí vzniká fialově zbarvený komplex, který je tvořen chelatací dvou molekul BCA s měďným iontem. Tento komplex absorbuje při 562 nm. Je s výhodou, že při tomto způsobu měření obsahu proteinu nevadí detergenty používané k izolaci CYP. Jako standard byl použit hovězí albumin (BSA). K měření byl použit set od firmy Pierce (dodává firma TopBio, Praha, CZ).

3.7 Solubilizace mikrosomů

Izolované prasečí mikrosomy byly naředěny na koncentraci proteinu 2 mg/ml v pufru o konečném složení 0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,1 mM PMSF a 20 μM BHT pH 7,25 a následně solubilizované za postupného přidávání 20% (v/v) roztoku cholátu sodného za stálého míchání při 4°C. Po posledním přidavku cholátu byl roztok promícháván ještě 30 minut. Solubilizát se poté přelil do kyvet a byl podroben ultracentrifugaci za následujících podmínek: 105 000 x g, 90 minut a 4 °C. Supernatant vzniklého solubilizátu byl následně aplikován na předem ekvilibrovanou kolonu oktyl-agarózy (Philips and Shephard, 1998). Izolace forem CYP 2A19 a 1A byla provedena podle postupu, který je zjednodušeně vyobrazen na Obrázku 7.

Obr. 7: Schéma modifikovaného postupu purifikace forem CYP



3.8 Chromatografie supernatantu solubilizátu na oktyl-agaróze

Kolona o rozměrech 40x2,6 cm byla naplněna 200 ml suspenze oktyl-agarózy, která byla odvzdušněná pomocí vakuové vývěvy a byla suspendována v ekvilibračním pufru obsahujícím 0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerolu, 0,6% (v/v) cholátu sodného, pH 7,25. Kolona byla umístěna do chlazené místnosti (4°C) a nechala se vytemperovat. Vytemperovaná kolona byla

ekvilibrována ekvilibračním pufrém při průtoku 1 ml/min. Poté byl nanesen supernatant solubilizátu. Po nanesení byla kolona promyta promývacím pufrém (0,1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,42% (v/v) cholát sodný, pH 7,25) do poklesu absorbance při 417 nm na nulu s cílem odstranit cytochrom P420. Eluce byla provedena elučním pufrém, který měl složení jako ekvilibrační, s tím rozdílem, že byla snížena koncentrace cholátu na 0,33% (v/v) a byl přidán 0,06% (v/v) Tritonu X-100PC. Eluované frakce o objemu zhruba 20 ml byly sbírány pomocí automatického sběrače frakcí umístěného taktéž v chlazené místnosti.

3.9 Dialýza izolovaných frakcí

Frakce izolované z oktyl-agarózy byly zahuštěny ultrafiltrací a posléze dialyzovány pomocí membrány umístěné v dialyzačním pufru [5 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,4], jehož objem se rovnal 20-ti násobku objemu frakcí. Dialyzační pufr se měnil každých 8 hod, celkem třikrát. Celá procedura byla uskutečněna v chlazené místnosti při 4°C.

3.10 Chromatografie na hydroxylapatitu

Hydroxylapatit byl suspendován v dialyzačním pufru a nalit do kolony (1 cm^3 na 20 nmol P450). Stejným roztokem byl pak sloupec hydroxylapatitu ekvilibrován, a to 10-ti násobkem objemu sloupce. Po nanesení vzorku byla kolona promyta dialyzačním pufrém o trojnásobku objemu sloupce. Eluce byla provedena lineárním gradientem iontové síly postupným smícháním 10 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,3% Triton X-100 PC (v/v), pH 7,4 a stejným pufrém, v kterém ale byla zvýšena koncentrace fosfátu na 300 mM. Frakce o objemu zhruba 1 ml byly sbírány automatickým sběračem. Tento postup byl opakován až do získání čistých forem CYP2A19 a CY1A.

3.11 Odstranění detergentu

Triton X-100, který nelze oddialyzovat, byl odstraněn extenzivním promýváním vzorku cytochromu P450 adsorbovaného na koloně hydroxylapatitu roztokem 5 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM EDTA a 20% (v/v) glycerolem, pH 7,4 do poklesu absorbance při 280 nm. Po odstranění detergentu byl vzorek eluován stejným pufrém, v kterém však byla koncentrace fosfátu zvýšena na 500 mM. Poté

byly vzorky zahuštěny pomocí ultrafiltrace a uschovány v hlubokomrazicím boxu pro další experimenty při teplotě -80 °C.

3.12 Charakterizace cytochromů P450

3.12.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Vzorky izolovaných frakcí byly analyzovány pomocí SDS-PAGE v aparatuře Miniprotean II se zdrojem Power Pac 200 za stálého napětí 180 V po dobu 50 minut (Laemmli, 1970). Separační (spodní) gel obsahoval 8% (w/v) akrylamidu, 0,375 M TRIS-HCl pH 8,8, 0,1% SDS (w/v), 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,05% (v/v) TEMED. Startovací (horní) gel obsahoval 4% (w/v) akrylamidu, 0,125 M TRIS-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,1% (v/v) TEMED. Elektrodový pufr byl složen z 25 mM TRIS-HCl, 192 mM glycinu, pH 8,3 s 0,1% (w/v) SDS. Vzorkový pufr měl složení 62,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 10% (v/v) glycerol, 4% (v/v) merkaptoetanol, 2% (w/v) SDS. Proteiny byly barveny 0,1% (w/v) roztokem Coomassie Blue R-250 v 40% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové po dobu 20 minut za jemného míchání. Gel byl odbarvován v odbarvovací lázni o složení 25% (v/v) ethanol a 10% (v/v) kyselina octová po dobu 30 minut za jemného míchání. Odbarvené gely byly fixovány v roztoku skládajícího se z 25% etanolu a 3% (v/v) glycerolu po dobu 24 hodin.

3.12.2 Western blotting

Přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu byl uskutečněn v aparatuře MiniTransblot se zdrojem PowerPac 200 při konstantním proudu 350 mA, 1 hodinu za intenzivního chlazení ledem. Použitý přenosový pufr měl složení 0,025 M TRIS, 0,192 M glycin pH 8,1-8,4 s 20% (v/v) methanolem.

Po ukončení přenosu proteinů byla membrána blokována přes noc v TBS pufru pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20 a 0,2% (v/v) mlékem při 4 °C. Před inkubací s primární protilátkou byla membrána dvakrát promytá TBS puftrem pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20.

Poté byla membrána inkubovaná s primární protilátkou. V případě detekce CYP1A2 byly použity protilátky rabbit anti-human CYP1A2 a/nebo goat anti-rat CYP1A2, obě v ředění 1:1000. V případě detekce CYP2A19 byla použita protilátka mouse anti-human CYP2A6 ve stejném ředění jako v předchozím případě.

Protilátky byly naředěny v pufru o následujícím složení: TBS pufr pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20 a 0,2% (v/v) mléko a byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného míchání. Po proběhnutí inkubace následovalo dvojí promytí membrány s TBS pufrem pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20.

Inkubace se sekundárními protilátkami konjugovanými s peroxidázou (anti-rabbit a anti-goat IgG v případě CYP1A2 nebo anti-mouse IgG pro CYP2A19) byla provedena v pufru, který obsahoval TBS pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20 a 0,2% (v/v) mléko. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny za mírného míchání. Po promytí 3x TBS pufrem pH 7,4 s 0,05% (v/v) Tween 20 byla provedená vizualizace proběhlé imunochemické reakce.

Detekční roztok A a B (Western Blotting Luminol Reagent) byl smíchán těsně před použitím v poměru 1:1. Množství použitých roztoků bylo 2 ml od každého. Inkubace membrány v tomto roztoku trvala 1 minutu bez míchání. Po inkubaci byl odsán přebytečný detekční roztok a membrána byla zabalena do fólie načež proběhla expozice na světlocitlivý film v tmavé komoře.

3.13 Stanovení enzymových aktivit izolovaných CYP

3.13.1 Rekonstituovaný systém s CYP1A2 – dealkylace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu

Jak 7-ethoxyresorufin *O*-deethylace (EROD), tak 7-methoxyresorufin *O*-demethylace (MROD) byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol of CYP1A2 (lidský nebo prasečí), 75 pmol CYPOR a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol L- α -dilauroylphosphatidylcholinu (DLPC), připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě byl přidán substrát o konečné koncentraci 0-32 μ M v reakční směsi a NADPH generující systém o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Na doplnění objemu do 100 μ l byl použit 100 mM fosfátový pufr pH 7,4. Reakční směs byla poté inkubována při 37°C po dobu 15 minut a následně zastavena přidávkem 200 μ l methanolu. Po centrifugaci při 300 x g po dobu 10 min byla změřena fluorescence 200 μ l supernatantu v mikrotitračních destičkách (excitace 535 nm, emise 585 nm). Současně byly připraveny standardy resorufinu (0-100 μ M) a slepé vzorky, které

byly analyzovány stejným způsobem. Pro měření EROD a MROD aktivity v mikrosomech (lidských i prasečích) byla použita metoda Changa a Waxmana (Chang a Waxman, 1998).

3.13.2 Rekonstituovaný systém s CYP2A19 – hydroxylace kumarinu v poloze 7

Hydroxylace kumarinu byla studována v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol CYP2A19 izolovaného z prasečích jater, 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě byl přidán substrát o konečné koncentraci 0-64 μM v reakční směsi a systém generující NADPH o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM). Na doplnění objemu do 100 μl byl použit 100 mM fosfátový pufr pH 7,4. Reakční směs byla poté inkubována při 37°C po dobu 15 minut a následně zastavena přidávkem 200 μl methanolu. Reakční směs pak byla centrifugována při 18 400 x g po dobu 10 minut a následně byla změřena fluorescence 200 μl supernatantu v mikrotitračních destičkách (excitace 360 nm, emise 465 nm). Současně byly připraveny standardy 7-hydroxykumarinu (0-100 μM) a slepé vzorky, které byly analyzovány stejným způsobem. Určení aktivity CYP2A6 (CYP2A19) v mikrosomech bylo provedeno podle zavedených metod (Waxman a Chang, 1998).

3.13.3 Inhibice 7-ethoxyresorufin O-deethylace pomocí furafylinu v rekonstituovaném systému

Inhibice EROD byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol of CYP1A2 (lidský i prasečí), 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20-ti minutách při pokojové teplotě byl přidán NADPH generující systém o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM) a také specifický inhibitor

furafylin (Kunze a Trager, 1993) v konečných koncentracích 0; 0,5; 1; 2; 5; 25; 50; 100 μM . Objem byl doplněn 100 mM fosfátovým pufrem pH 7,4. Po preinkubaci, která trvala 15 minut a probíhala při 37°C, se přidal substrát v koncentraci odpovídající K_M . Celkový objem reakční směsi byl 100 μl . Doba inkubace byla 15 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 200 μl methanolu. Po centrifugaci při 300 x g po dobu 10 min byla změřena fluorescence 200 μl supernatantu v mikrotitračních destičkách (excitace 535 nm, emise 585 nm). Současně byly připraveny standardy resorufinu (0-100 μM) a slepé vzorky, které byly analyzovány stejným způsobem.

3.13.4 Inhibice 7-hydroxylace kumarinu v rekonstituovaném systému

Inhibice hydroxylace kumarinu byla studována v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol of CYP2A19, 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b_5 (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H_2O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20-ti minutách při pokojové teplotě byl současně přidán specifický inhibitor 8-methoxypsoralen (Koenigs *et al.*, 1997) v konečných koncentracích 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 μM a substrát kumarin o koncentraci odpovídající K_M . Objem byl doplněn 100 mM fosfátovým pufrem pH 7,4. Po preinkubaci, která trvala 30 minut a probíhala při 37 °C, byl přidán NADPH generující systém o konečném složení NADP^+ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO_4 8 mM). Celkový objem reakční směsi byl 100 μl . Doba inkubace byla 15 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 200 μl methanolu. Po centrifugaci při 18 400 x g po dobu 10 min byla změřena fluorescence 200 μl supernatantu v mikrotitračních destičkách (excitace 360 nm, emise 465 nm). Současně byly připraveny standardy 7-hydroxykumarinu (0-100 μM) a slepé vzorky, které byly analyzovány stejným způsobem.

3.14 Biotransformace skatolu prasečími CYP

3.14.1 Inkubace skatolu s prasečími jaterními mikrosomy

3 mg jaterního mikrosomálního proteinu bylo smícháno s 0,7 mM skatolem, 1 mM EDTA a směs byla nechána 3 minuty k preinkubovací při 37 °C. Poté byl přidán systém generující NADPH o konečném složení NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Celkový objem reakční směsi byl doplněn 50 mM fosfátovým pufrům pH 7,4 na 500 µl a směs byla inkubována 90 min při 37 °C v digestoři. Po proběhnutí inkubace byla reakce zastavena přidávkem vychlazeného acetonitrilu o objemu 500 µl a směs byla 30s vortexována. Při přípravě slepých vzorků byl jaterní protein smíchán s acetonitrem ihned. Po centrifugaci při 3000 x g po dobu 20 min bylo odebráno 200 µl k HPLC analýze na koloně LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm I.D. s náplní 5 µm), nástřík 50 µl. Složení mobilní fáze bylo následující: fáze A 100mM K/HPO₄ pufr pH 3,9 a fáze B acetonitril. Eluce probíhala podle gradientu: 0 min, 90% A; 6 min, 80% A; 12 min, 70% A; 18 min, 30 % A; 25 min, 10% A; 26 min 90% A; 35 min 90% A. Průtok byl 1,2 ml/min s UV detekcí při 250 nm (Diaz et al, 1999). Tato metoda byla použita i pro experimenty s izolovanými enzymy. Tvorba metabolitů byla ověřena srovnáním retenčních časů se standardy a také prostřednictvím vzorků se standardy. Koncentrace metabolitů byla vyhodnocena pomocí kalibračních křivek.

3.14.2 Rekonstituovaný systém se skatolem s izolovanými CYP1A, 2A19 a 2E1

Inkubace byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol CYP izolovaného z prasečích jater (1A, 2A19, 2E1), 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě byl přidán skatol 0,7 mM a 1 mM EDTA o konečné koncentraci v reakční směsi a směs se nechala 3 minuty preinkubovat při 37 °C. Pak se přidal systém generující NADPH o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Na doplnění objemu do 250 µl byl použit 50 mM fosfátový pufr pH 7,4. Směs byla inkubována 90 min při 37 °C v digestoři. Po proběhnutí inkubace

byla reakce zastavena přidavkem studeného acetonitrilu o objemu 250 µl a směs byla 30s vortexována. Při přípravě slepých vzorků byl enzym smíchán s acetonitrem ihned. Po centrifugaci při 3000 x g po dobu 20 min bylo odebráno 200 µl k HPLC analýze podle postupu uvedeného výše.

Stejné experimenty byly provedeny i s lidskými formami CYP, forma CYP2A6 byla získána izolací z membrán *E. coli* dle postupu popsáno v literatuře (Souček, 1999).

3.14.3 Inhibice tvorby metabolitů skatolu v rekonstituovaném systému s prasečími izolovanými CYP

3.14.3.1 Inhibice s CYP1A2

Inkubace byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol CYP izolovaného z prasečích jater, 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě byla přidána EDTA o konečné koncentraci v reakční směsi 1 mM. Zároveň byl přidán furafylin o konečné koncentraci 70 µM a systém generující NADPH o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Na doplnění objemu do 250 µl byl použit 50 mM fosfátový pufr pH 7,4. Po 30 min preinkubace byl přidán skatol o konečné koncentraci 0,7 mM. Směs byla inkubována 90 min při 37 °C v digestoři. Po proběhnutí inkubace byla reakce zastavena přidavkem studeného acetonitrilu o objemu 250 µl a směs byla 30s vortexována. Při přípravě slepých vzorků byl enzym smíchán s acetonitrem ihned. Po centrifugaci při 3000 x g po dobu 20 min bylo odebráno 200 µl k HPLC analýze podle postupu uvedeného výše.

Identický experiment byl proveden i s lidskou formou CYP1A2.

3.14.3.2 Inhibice s CYP2A19

Inkubace byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol CYP izolovaného z prasečích jater, 75 pmol CYPOR a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové

tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 1 mM EDTA, 50 μ M 8-methoxypsoralen a 0,7 mM skatol o konečné koncentraci v reakční směsi. Po 3 minutové preinkubaci byl přidán systém generující NADPH o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8 mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Na doplnění objemu do 250 μ l byl použit 50 mM fosfátový pufr pH 7,4. Směs byla inkubována 90 min při 37 °C v digestoři. Po proběhnutí inkubace byla reakce zastavena přidavkem studeného acetonitrilu o objemu 250 μ l a směs byla 30s vortexována. Při přípravě slepých vzorků byl enzym smíchán s acetonitrem ihned. Po centrifugaci při 3000 x g po dobu 20 min bylo odebráno 200 μ l k HPLC analýze podle postupu uvedeného výše.

Identický experiment byl proveden i s lidskou formou CYP2A6.

3.14.3.3 Inhibice s CYP2E1

Inkubace byla provedena v rekonstituovaném systému, který obsahoval 25 pmol CYP izolovaného z prasečích jater, 75 pmol CYPOR, a 100 pmol cytochromu b₅ (1:3:4). Po 10 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 10 pmol DPLC, připraveného sonikací 4,66 mg DLPC v 5 ml H₂O za současného chlazení v ledové tříšti. Po 20 minutách při pokojové teplotě bylo přidáno 1 mM EDTA o konečné koncentraci v reakční směsi. Zároveň byl přidán DEDC o konečné koncentraci 25 μ M a systém generující NADPH o konečném složení: NADP⁺ 0,8 mM, isocitrát 5,8mM, isocitrátdehydrogenáza 0,3 U/ml a MgSO₄ 8 mM. Na doplnění objemu do 250 μ l byl použit 50 mM fosfátový pufr pH 7,4. Po 30 min preinkubace byl přidán skatol o konečné koncentraci 0,7 mM. Směs byla inkubována 90 min při 37 °C v digestoři. Po proběhnutí inkubace byla reakce zastavena přidavkem studeného acetonitrilu o objemu 250 μ l a směs byla 30s vortexována. Při přípravě slepých vzorků byl enzym smíchán s acetonitrem ihned. Po centrifugaci při 3000 x g po dobu 20 min bylo odebráno 200 μ l k HPLC analýze podle postupu uvedeného výše.

Identický experiment byl proveden i s lidskou formou CYP2E1.

3.15 Stanovení enzymové kinetiky UGT1A6 v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice

Enzymová kinetika tvorby glukuronidů byla stanovena s použitím *p*-nitrofenolu (*p*-NP) a 4-methylumbelliferonu (4-MU) jako substrátů. Koncentrace obou substrátů v experimentech byla 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 a 3000 μ M.

Inkubace byla provedena v skleněných zkumavkách a obsahovala 10 μ g mikrosomálního proteinu výše zmíněných species (před použitím byly mikrosomy sonikovány 3x10s za současného chlazení ledem), substrát (p-NP nebo 4-MU), 10mM MgCl₂ v konečném objemu 400 μ l 50mM TRIS-HCl pufru pH 7,4. Po 1 min preinkubaci při 37°C byla reakce zahájena přidavkem 3mM uridin 5'-difosfoglukuronové kyseliny (UDPGA) a směs se nechala při této teplotě inkubovat po dobu 15 min. Poté byla reakce zastavena přidavkem 50 μ l 15% (w/v) studené kyseliny chloristé a centrifugována při 16 000 x g po dobu 10 min při 4 °C. Při přípravě slepých vzorků byla kyselina chloristá přidána ihned po mikrosomální frakci. 200 μ l supernatantu bylo poté analyzováno pomocí HPLC s UV detekcí za následujících podmínek: mobilní fáze 25 mM triethanolamin–acetonitril (80:20, v:v), kolona LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm I.D. s náplní 5 μ m), nástřik 50 μ l, isokratická eluce, průtok 1ml/min, čas analýzy 20 min. pH vodné fáze bylo upraveno na 2,1 pomocí 60% kyseliny chloristé. Detekce probíhala při vlnových délkách 318 nm (4-MU glukuronidy) a 305 nm (p-NP glukuronidy). Kalibrační křivky metabolitů byly připraveny ředěním ze zásobních roztoků (Hanioka et al, 2001).

3.16 Stanovení glukuronidů silybinu v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice

Složení reakční směsi bylo následující: 350 μ g jaterního mikrosomálního proteinu (před použitím byly mikrosomy sonikovány 3x10s za současného chlazení ledem), 3 mM UDPGA, 5 mM MgCl₂, 50 μ M silybin v celkovém objemu 100 μ l 100 mM K/PO₄ pufru pH 7,4 (reakce byla zahájena přidavkem UDPGA). Po 30 min inkubace při 37 °C byla reakce zastavena přidavkem 200 μ l vychlazeného methanolu. Poté se reakční směs centrifugovala při 3000 x g po dobu 5 min. 200 μ l supernatantu bylo odebráno a vysušeno pod proudem dusíku a poté rozpuštěno v 100 μ l mobilní fáze A. Při přípravě slepých vzorků byl methanol přidán ihned po mikrosomální frakci. Glukuronidy byly detekovány pomocí HPLC s UV detekcí, s mobilní fází o složení: fáze A 0,1% kys. mravenčí, acetonitril, methanol (84 : 13,5 : 2,5) a fáze B 0,1% kys. mravenčí, acetonitril, methanol (68 : 29 : 3). Byla použita kolona LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm I.D. s náplní 5 μ m), nástřik 50 μ l. Detaily metody použité k detekci metabolitů dosud nebyly

publikovány (Jančová a kol., publikace v přípravě). Glukuronidy silybinu byly charakterizovány pomocí standardů a pomocí LC-MS (Matal et al, 2008).

Jako zásobní roztok silybinu byl použit roztok o koncentraci 25 mM v 60% dimethylsulfoxidu.

4 Výsledky

4.1 Příprava mikrosomů a solubilizace

CYP1A2 a CYP2A19 byly izolovány z jaterní mikrosomální frakce neindukovaných prasat. V této fázi je problémem vysoký obsah glykogenu, proto se po ultracentrifugaci musí v kyvetách velice opatrně uvolnit mikrosomy usazené na vrstvě glykogenu, který by později způsoboval nízké výtěžky při solubilizaci mikrosomů.

Mikrosomy byly pro potřeby izolace připraveny třikrát, vždy ze 100 g jater skladovaných při -80°C . Cílem bylo získat dostatečné množství CYP v solubilizátu, neboť díky solubilizaci je výsledné množství CYP nižší. V tabulce 7 je uvedena charakteristika izolovaných mikrosomů (Ms) před a po solubilizaci. Solubilizace mikrosomů byla provedena pomocí cholátu sodného, což je iontový detergent. Jejím cílem je lepší uvolnění CYP z fosfolipidových membrán endoplasmatického retikula a následně lepší chromatografické dělení. Po ultracentrifugaci byl supernatant solubilizátu, obsahující celkem 807 nmol CYP (viz Tabulka 7), nanesen na sloupec oktylagarózy 4B (OcA). Výtěžek solubilizace se pohyboval kolem 77% celkového obsahu CYP.

Tab. 7: Charakteristika tří izolací mikrosomů (Ms₁, Ms₂, Ms₃), koncentrace proteinu, specifický obsah a další charakteristiky.

	Ms ₁	Ms ₂	Ms ₃	celkem
<i>c CYP (μM)</i>	22,2	9,36	12,5	
<i>c proteinu (mg/ml)</i>	37,8	15,7	23,8	
<i>specifický obsah (nmol CYP/mg)</i>	0,59	0,6	0,53	
<i>objem izolovaných Ms (ml)</i>	24	25	22	71
<i>nmol CYP v izolovaných Ms</i>	533	234	275	1042
<i>nmol CYP v supernatantu solubilizátu</i>	420	177	210	807
<i>výtěžek solubilizace (%)</i>	79	76	76	77

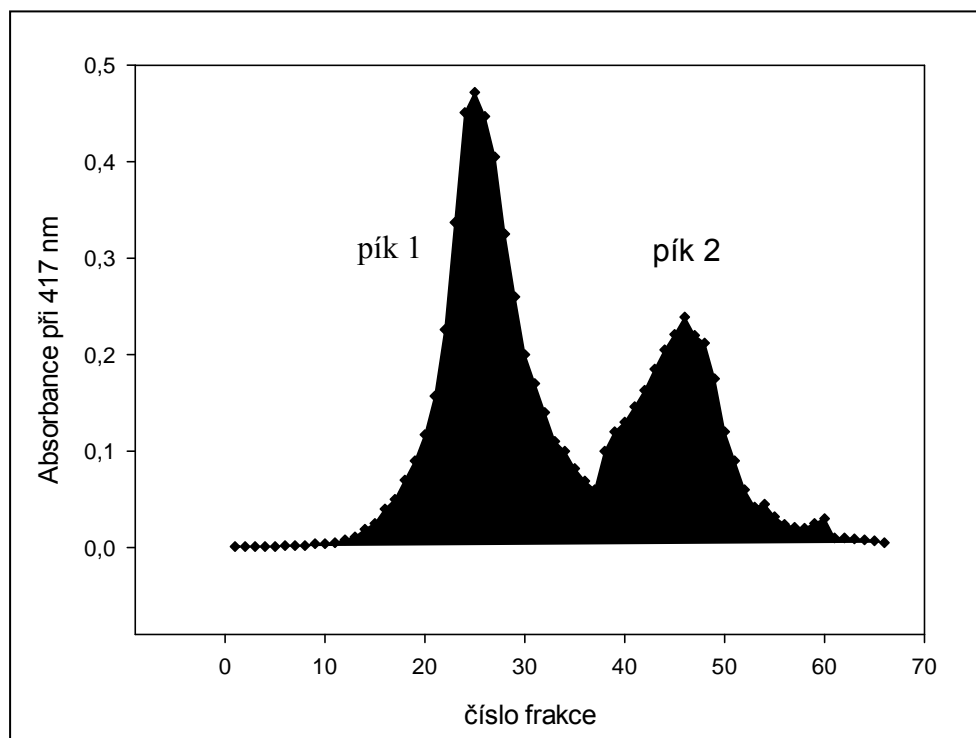
4.2 Chromatografie na oktyl-agaróze

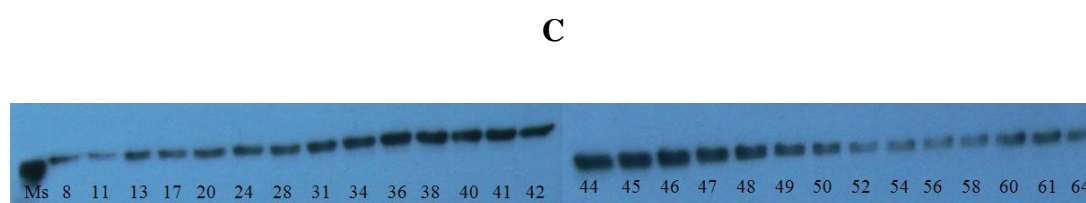
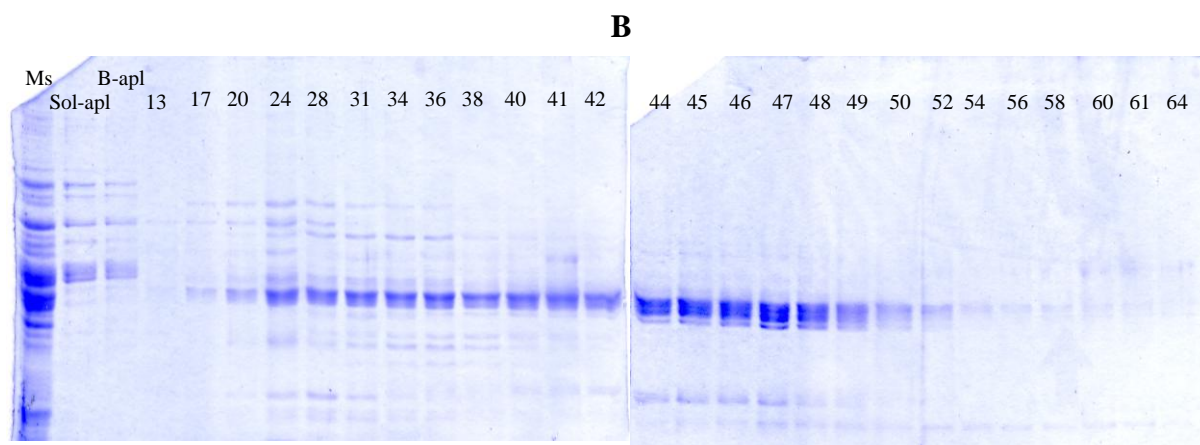
Oktyl- agarosa je nosič, který je svou povahou vhodný pro zachycení proteinů hydrofobní povahy a je tudíž využíván pro izolaci CYP. Jedná se hydrofobní interakční chromatografii, při které se využívají pufrы s vysokou iontovou silou, které podporují hydrofobní interakce mezi proteiny a C₈ řetězcem vázaným na agarose. Retence proteinů závisí na zastoupení hydrofobních aminokyselin v jejich struktuře (valin, leucin, izoleucin a methionin). K eluci byl použit přídatek neiontového detergentu (Triton X-100PC). Na kolonu byl aplikován supernatant

solubilizátu, celkem 807 nmol CYP a po nanesení celého objemu byl proteklý roztok zachycen pro zjištění množství nezachyceného CYP. Poté byl sloupec OcA (100 cm³) promyt 250 ml promývacího pufru a proteklý roztok byl opět zachycen. V proteklém solubilizátu bylo spektrofotometricky změřeno množství CYP s výsledkem 7 nmol. V proteklém promývacím pufru nebyl detekován žádný CYP. Na koloně tedy bylo zachyceno 800 nmol CYP. Poté následovala eluce za použití elučního pufru se sníženým obsahem cholátu sodného na 0,33% (v/v) a s obsahem 0,66% (v/v) Tritonu X-100PC. U jednotlivých frakcí byla změřena absorbance při 417 nm (absorbují hem). Výsledkem je typický chromatografický profil, kdy se enzymy dělí na základě své hydrofobicity do dvou píků (viz Obrázek 8). K identifikaci forem cytochromů P450 v jednotlivých frakcích byla použita SDS-PAGE a následný Western blotting.

Obr. 8: **A** - Chromatografický profil z oktyl-agarózy, **B** – elektroforéza frakcí z oktyl-agarózy (Ms = mikrosomy, Sol-apl = proteklý solubilizát, B-apl = proteklý promývací pufr), **C** – Western blot frakcí z oktyl-agarózy s použitím anti-rat CYP1A2 protilátky. Čísla na obrázcích odpovídají číslům frakcí

A





Přítomnost enzymu reagujícího s protilátkou proti potkanímu CYP1A2 je z Western blotu patrná hlavně v píku 2. Všechny frakce z píku 2, tj. 36-60 byly pospojovány, zahuštěny a následně dialyzovány, aby mohly být podrobeny chromatografii na hydroxylapatitu. Celkový obsah CYP v těchto frakcích byl 270 nmol.

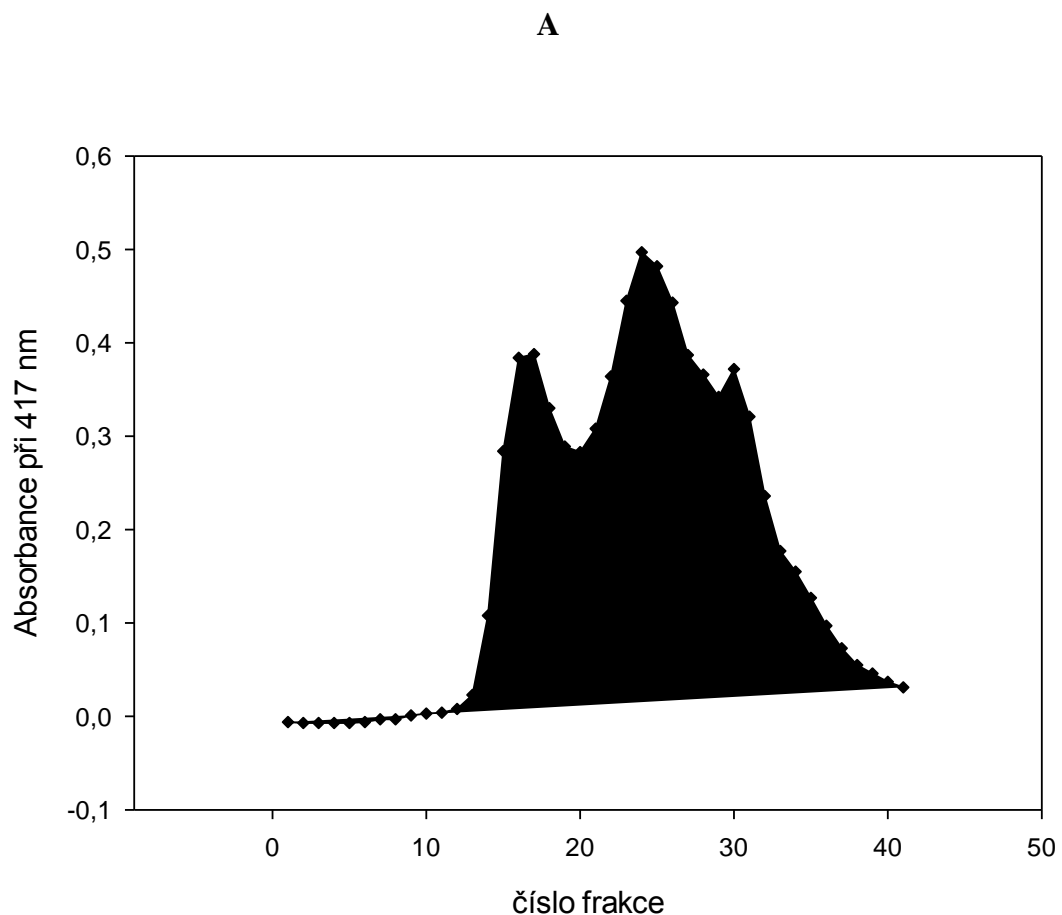
4.3 Chromatografie na hydroxylapatitu (HA)

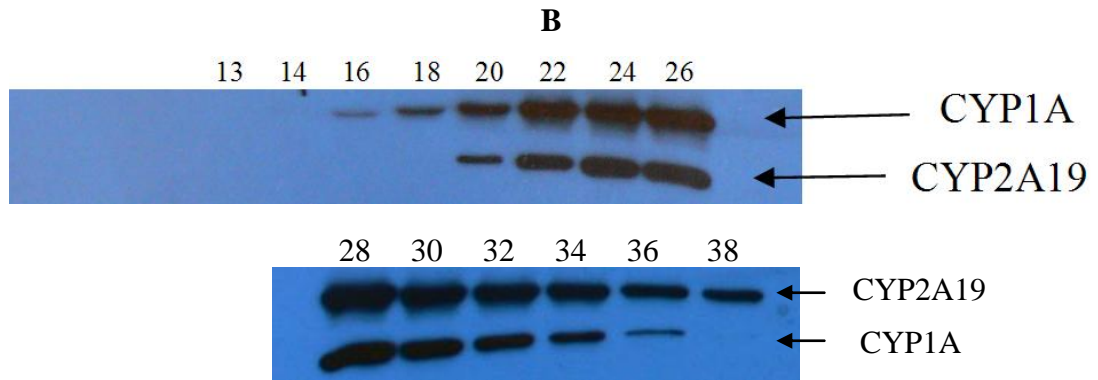
Hydroxylapatit je široce používaný sorbent pro separaci různých forem CYP (Anzenbacherová et al., 2005; Baranová et al., 2005). Kombinuje v sobě mechanismy adsorpční a ionexové chromatografie. Komerčně dodávaný hydroxylapatit se díky své velké křehkosti dodává vysrážený na částicích silikagelu nebo agarózy. Pro naše použití se však ukázal jako nevhodný a proto byl hydroxylapatit připraven v laboratoři (Levin, 1962). Jeho dalším použitím je finální odstranění detergentu z načištěných forem enzymů.

Zahuštěné a dialyzované frakce z druhého píku OcA byly podrobeny chromatografii na hydroxylapatitu. Množství sorbentu bylo 1 cm^3 na 20 nmol CYP, tzn. že v tomto případě bylo použito zhruba 14 cm^3 HA. Eluce CYP byla provedena lineárním gradientem iontové síly (10 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,3% Triton X-100 PC (v/v), pH 7,4 a stejným pufrem, v kterém ale byla zvýšena koncentrace fosfátu na 300 mM). Frakce o objemu zhruba 1 ml byly

sbírány automatickým sběračem. Eluční profil z HA chromatografie je znázorněn na Obrázku 9. Dle výsledků Western blottingu a SDS-PAGE bylo zjištěno, že CYP1A2 se eluuje při nižší iontové síle (10-100 mM fosfát), což odpovídá frakcím zhruba 13-18, takže frakce s relativně vyšším obsahem CYP1A lze získat v první třetině chromatografie. V této fázi jsme provedli Western blot s myší protilátkou proti lidské CYP2A6 (u prasete CYP2A19) a zjistili jsme, že tento protein je přítomen spíše ke konci elučního spektra, tj. ve vzorcích získaných elucí za vyšší iontové síly (odpovídající 150 až 300 mM fosfátu). Sdružováním frakcí bohatých na zmíněné CYP a opakovanou chromatografií těchto vzorků byly získány homogenní preparáty prasečích forem CYP1A2 a CYP2A19.

Obr. 9: **A** - Chromatografický profil z HA, **B** – Western blot z frakcí izolovaných z HA s použitím protilátek anti-rat CYP1A2 a anti human-CYP2A6





Po získání čistých forem izolovaných CYP (Obrázek 10), byly tyto enzymy naneseny na sloupec HA a promývány ekvilibračním pufrům s cílem odstranit neiontový detergent. Promývání se provádělo do poklesu absorbance při 280 nm na hodnotu nižší než 0,001. Vzorky nanesené na sloupci HA pak byly uvolněny 300 mM fosfátem a zahuštěny. Celkové množství izolovaných proteinů bylo 7 nmol CYP1A2 a 11,4 nmol CYP2A19, což představuje 0,7% z celkového množství CYP v případě CYP1A2 a 1,1% v případě CYP2A19. Ze získaných výsledků však nelze dělat závěry ohledně skutečného podílu těchto enzymů v jaterní mikrosomální frakci vzhledem ke ztrátám a také vzhledem k tomu, že ne všechny frakce obsahující tyto enzymy byly použity pro jejich získání.

Obr. 10: **A** - SDS-PAGE prasečích jaterních mikrosomů (vlevo) a získaného CYP1A2 (vpravo). **B** - SDS-PAGE prasečích jaterních mikrosomů (vlevo) a získaného CYP2A19 (vpravo)



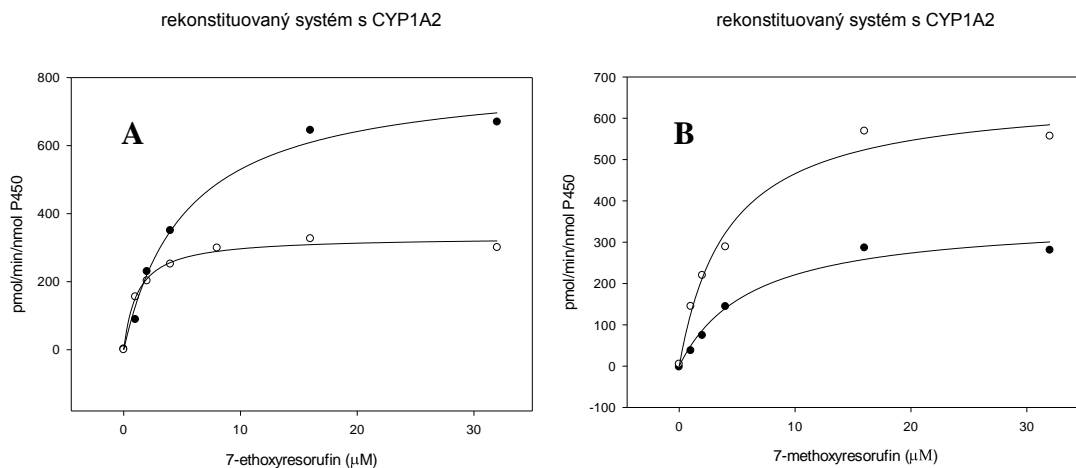
Získané čisté formy byly rozpoznány komerčně dostupnými protilátkami anti-rat CYP1A2 a anti-human CYP1A2 v případě prasečího CYP1A2 a anti-human CYP2A6 v případě prasečího CYP2A19. Naopak nevykazovaly žádnou pozitivitu v případě použití protilátek proti CYP2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 a 4A1.

4.4 Stanovení enzymových aktivit izolovaných CYP

4.4.1 Stanovení aktivity CYP1A2 – dealkylace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu

7- methoxyresorufin a 7- ethoxyresorufin jsou považovány za prototypové substráty používané *in vitro* u podrodiny CYP1A u různých živočišných druhů (Guengerich, 1997), včetně prasete (Chirulli et al., 2007). Dealkylace těchto substrátů byla změřena jak v rekonstituovaném systému s použitím lidského a prasečího enzymu, tak v jaterní mikrosomální frakci podle metody Changa a Waxmana (Chang a Waxman, 1998). Byly stanoveny kinetické parametry reakcí a hodnoty K_M a V_{max} byly vyčísleny pomocí softwaru SigmaPlot metodou nelineární regrese. Získané výsledky u prasete byly porovnány s těmi u člověka (Obrázek 11 a Tabulky 8 a 9).

Obr. 11: Kinetika 7-deethylace ethoxyresorufinu v rekonstituovaném systému (A) a kinetika 7-demethylace methoxyresorufinu v rekonstituovaném systému (B) u člověka (●) a u prasete (○)



Tab. 8: Hodnoty K_M and V_{max} pro *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu v lidských a prasečích mikrosomech a v rekonstituovaném systému s použitím CYP1A2.

	mikrosomy		rekonstituovaný systém	
	prase	člověk	prase	člověk
K_M (μM)	$0,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,9$
V_{max} (pmol/min/nmol P450)	$77,5 \pm 2,2$	$135,5 \pm 8,1$	$331,6 \pm 10,1$	$812 \pm 42,3$

Tab. 9: Hodnoty K_M and V_{max} pro *O*-demethylaci 7-methoxyresorufin v lidských a prasečích mikrosomech a v rekonstituovaném systému s použitím CYP1A2.

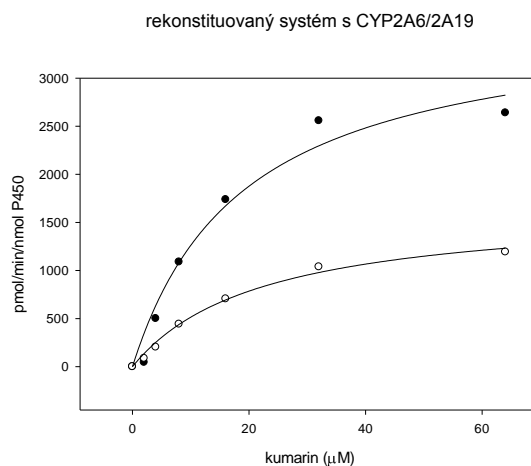
	mikrosomy		rekonstituovaný systém	
	prase	člověk	prase	člověk
K_M (μM)	$0,6 \pm 0,1$	$3,9 \pm 1$	$4,2 \pm 0,8$	$6,2 \pm 1,6$
V_{max} ($\text{pmol}/\text{min}/\text{nmol P450}$)	$81,2 \pm 2,5$	$86,4 \pm 7,3$	$660,5 \pm 40,8$	$359,2 \pm 30,6$

Prasečí a lidský CYP1A2 vykazují vysokou míru podobnosti v kinetických parametrech. Zajímavostí je, že prasečí enzym vykazuje v rekonstituovaném systému vyšší V_{max} pro MROD, což naznačuje, že by 7-methoxyresorufin mohl být lepším markerem aktivity CYP1A2 než běžně používaný 7-ethoxyresorufin (Matal et al., 2009a; Messina et al., 2008).

4.4.2 Stanovení aktivity CYP2A6/19 – hydroxylace kumarinu v poloze 7

Stanovení aktivity CYP2A6/19 bylo provedeno pomocí markerového substrátu kumarinu, přičemž CYP2A6/19 katalyzuje jeho hydroxylaci v poloze 7 (Skaanild a Friis, 2005). V případě lidské formy CYP2A6 byly Dr. Součkem dodané membrány *E. coli* s exprimovaným CYP2A6 a enzym izolovaný z těchto membrán byl použit k experimentům. Hydroxylace kumarinu byla měřena v rekonstituovaném systému s použitím prasečího enzymu a také v jaterní mikrosomální frakci podle metody Waxmana a Changa (Waxman a Chang, 1998). Byly stanoveny kinetické parametry reakcí a hodnoty K_M a V_{max} byly vyčísleny pomocí softwaru SigmaPlot metodou nelineární regrese. Získané výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 12 a v Tabulce 10.

Obr. 12: Kinetika hydroxylace kumarinu v poloze 7 v rekonstituovaném systému u člověka (●) a u prasete (○)



Tab. 10: Hodnoty K_M and V_{max} pro 7-hydroxylaci kumarinu v lidských a prasečích mikrosomech a v rekonstituovaném systému s prasečím CYP2A19.

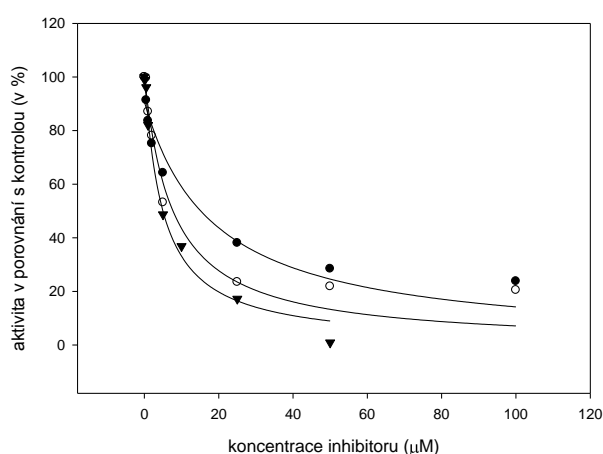
	mikrosomy		rekonstituovaný systém	
	prase	člověk	prase	člověk
K_M (μM)	12,3 ± 1,1	10,1 ± 1,2	22,2 ± 3,4	-
V_{max} (pmol/min/nmol P450)	371,6 ± 13,1	1054,7 ± 6,1	1659,3 ± 108,5	-

4.4.3 Inhibiční experimenty s izolovanými CYP v rekonstituovaném systému

Inhibiční experimenty byly provedeny v rekonstituovaném systému s cílem ověřit citlivost izolovaných CYP1A2 a CYP2A19 k jejich specifickým inhibitorům. Použité inhibitory furafylin a 8-methoxypsoralen se používají jako specifické inhibitory aktivity CYP1A2 resp. CYP2A6 u člověka (Kunze a Trager, 1993; Koenigs *et al.*, 1997). U orthologních forem jiných živočišných druhů nemusí inhibitory vždy vykazovat účinnost, nicméně v případě prasečí formy CYP2A19 byla také popsána inhibice jeho aktivity 8-methoxypsoralenem (Li *et al.*, 2006). Stejně tak je popsána inhibice 7-dealkylace resorufinu u prasečího CYP1A2 furafylinem (Zamaratskaia a Zlabek, 2009). Reakce byly provedeny při stálé

koncentraci substrátu rovné K_M a vzrůstající koncentraci inhibitoru. Hodnoty IC_{50} byly vypočteny pomocí softwaru SigmaPlot. Průběh inhibice je znázorněn na Obrázku 13.

Obr. 13: Průběh inhibice ethoxyresorufin *O*-deethylace v rekonstituovaném systému u člověka (prázdné kroužky) a u prasete (plné kroužky) furafylinem a inhibice 7-hydroxylace kumarinu v rekonstituovaném systému s CYP2A19 (plné trojúhelníky) 8-methoxyrsoralenem. Inhibice je vyjádřena jako zůstatek aktivity (kontrola = 100%).



Výsledky inhibičních experimentů naznačují v obou prasečích CYP podobnou míru citlivosti izolovaných enzymů vůči specifickým inhibitorům používaných u lidských forem. Hodnoty IC_{50} pro inhibici této aktivity furafylinem jsou u prasete 18.6 μM a u člověka 7.7 μM . V případě CYP2A19 je hodnota IC_{50} pro inhibici 7- hydroxylace kumarinu 8-methoxyrsoralenem rovna 4.9 μM .

4.5 Biotransformace skatolu

Experimenty se skatolem byly provedeny s cílem objasnit podíl jednotlivých forem na tvorbě metabolitů této látky. U člověka se na metabolismu skatolu podílí několik forem CYP, v *in vitro* studiích byl s rekombinativními enzymy prokázán podíl CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP2F2 a CYP2F3 (Lanza a Yost, 2001). U prasete však dosud podobné experimenty nebyly provedeny.

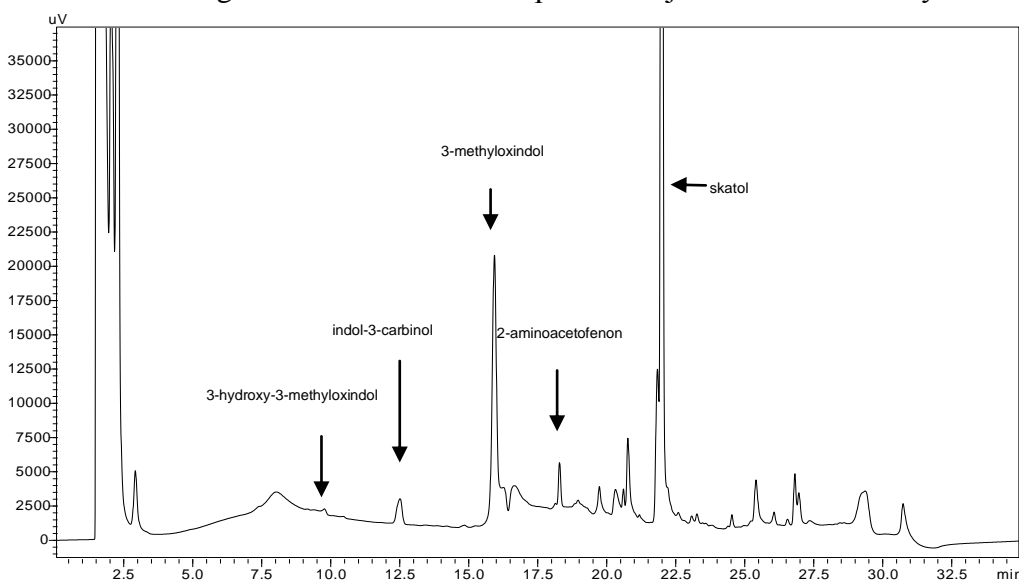
Dosud byly všechny experimenty u prasete prováděny v mikrosomální frakci jaterního homogenátu a podíl jednotlivých CYP na tvorbě metabolitů byl určován

pomocí inhibitorů forem různých CYP, více či méně specifických (Babol et al., 1998; Diaz a Squires, 2000a).

4.5.1 Biotransformace skatolu v jaterní mikrosomální frakci prasete

Při experimentu s prasečími mikrosomy byly detekovány čtyři metabolity, jmenovitě 3-hydroxy-3-methyloxindol, indol-3-carbinol (I3C), 3-methyloxindol (3MOI), a 2-aminoacetofenon. Na Obrázku 14 je zobrazen typický chromatogram analýzy reakční směsi.

Obr. 14: Chromatogram inkubace skatolu s prasečími jaterními mikrosomy



4.5.2 Biotransformace skatolu v rekonstituovaném systému s CYP1A2, CYP2E1 a CYP2A6/19 u člověka a prasete

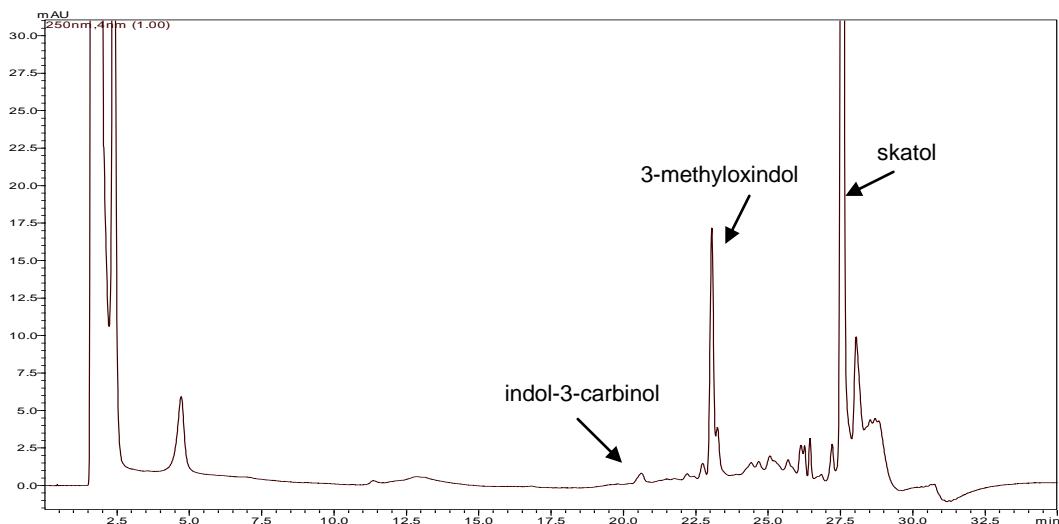
Experimenty v rekonstituovaném systému byly provedeny s cílem objasnit podíl jednotlivých forem CYP na biotransformaci skatolu. V rekonstituovaných systémech se zmíněnými enzymy byly detekovány dva metabolity, jak u lidských tak prasečích forem. Jednalo se o 3-methyloxindol a indol-3-carbinol. U člověka, a stejně tak u prasete, byl CYP1A2 schopen tvořit oba tyto metabolity. Rozdíly byly u enzymů CYP2E1 a CYP2A6/19. CYP2E1 u člověka tvořil oba metabolity, zatímco u prasete jen 3MOI, a to v menší míře než u člověka. CYP2A19 u prasete tvořil oba metabolity, zatímco CYP2A6 u člověka jen 3MOI a v daleko menší míře než v případě u prasete. Zdá se tedy, že CYP2A6/19 a CYP2E1 mají v případě

metabolismu skatolu navzájem opačnou funkcí. Aktivita použitých enzymů byla vyjádřena jako množství tvořeného metabolitu/min/nmol P450. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11. Na Obrázku 15 je pak zobrazen chromatogram inkubace skatolu s prasečím CYP1A2.

Tab. 11: Aktivita CYP1A2, 2E1 a 2A6/19 v rekonstituovaném systému u člověka a prasete vůči skatolu.

	<i>prase</i>		<i>člověk</i>	
	3MOI (nmol produktu/min/nmol P450)	I3C (nmol produktu/min/nmol P450)	3MOI (nmol produktu/min/nmol P450)	I3C (nmol produktu/min/nmol P450)
<i>CYP1A2</i>	1,65	0,32	3,65	2,72
<i>CYP2E1</i>	1,47	-	5,15	0,12
<i>CYP2A19/2A6</i>	2,99	0,44	0,1	-

Obr. 15: Chromatogram inkubace skatolu s prasečím CYP1A2.



Jako další důkaz, že výše zmíněné formy tvoří dané metabolity, byly provedeny inhibiční experimenty v rekonstituovaném systému. Výsledkem byl

minimálně 70-ti procentní pokles v množství tvořených metabolitů. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 12 a jsou znázorněny jako procenta množství tvořených metabolitů v porovnání s kontrolou.

Tab. 12: Inhibiční vliv 50 μM furafyllinu (CYP1A2), 25 μM 8-methoxypsoralenu (CYP2A6/2A19) a 30 μM diethyldithiocarbamátu (CYP2E1) na tvořené množství I3C a 3MOI v reakční směsi s příslušným inhibitorem. Hodnoty jsou zobrazeny jako procenta množství tvořených metabolitů v porovnání s kontrolou.

	<i>prase</i>		<i>člověk</i>	
	3MOI	I3C	3MOI	I3C
<i>CYP1A2</i>	18.1	11.2	5.3	0.7
<i>CYP2E1</i>	29.5	-	20.6	25.4
<i>CYP2A19/2A6</i>	0.2	0.9	29.1	-

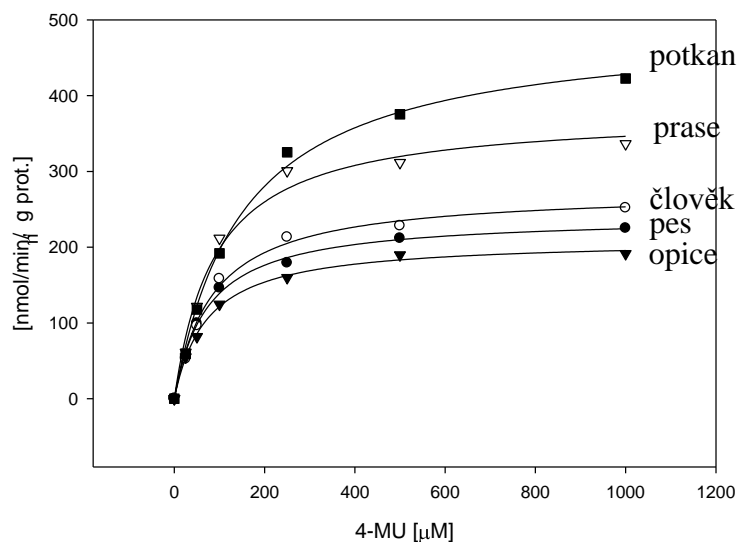
4.6 Stanovení enzymové kinetiky UGT1A6 v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice

Stanovení tvorby glukuronidů specifických substrátů UGT1A6 bylo provedeno v mikrosomální frakci jaterního homogenátu člověka, prasete, potkana, psa a opice. Byly provedeny experimenty s 4-MU a p-NP, které měly za cíl určit, zda je prase (nebo jiný modelový organismus) vhodný pro studium metabolismu látek zprostředkovaném tímto enzymem. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 16 a 17 a souhrnně v Tabulce 13.

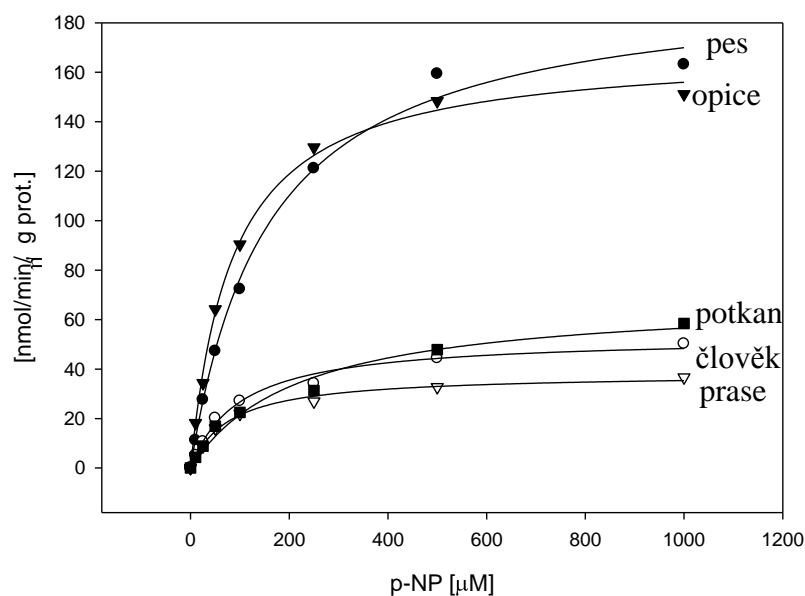
Tab. 13: Mezidruhové srovnání tvorby 4-MU a p-NP glukuronidů

	pNP-glukuronid		4-MU-glukuronid	
	K_M (μM)	V_{\max} (nmol/min/ μg prot)	K_M (μM)	V_{\max} (nmol/min/ μg prot)
člověk	$62,6 \pm 14,2$	$44,7 \pm 3,9$	$82,1 \pm 7,3$	$271,3 \pm 5,7$
prase	$60,7 \pm 16,3$	$28,6 \pm 1,7$	$80,7 \pm 13,5$	$360,3 \pm 14,3$
opice	66 ± 13	$153,3 \pm 7,3$	$57,1 \pm 12,4$	$191,9 \pm 9,2$
potkan	$365,9 \pm 69,9$	$85,5 \pm 5,4$	$119,7 \pm 20,6$	$446,5 \pm 19,8$
pes	$136,5 \pm 15,7$	$185,4 \pm 5,6$	$72,7 \pm 4,7$	$240,1 \pm 3,6$

Obr. 16: Enzymová kinetika tvorby glukuronidů 4-MU v mikrosomální frakci vybraných organismů. Člověk (prázdné kroužky), pes (plné kroužky), prase (prázdné trojúhelníky), opice (plné trojúhelníky) a potkan (plné čtverce).



Obr. 17: Enzymová kinetika tvorby glukuronidů p-NP v mikrosomální frakci vybraných organismů. Člověk (prázdné kroužky), pes (plné kroužky), prase (prázdné trojúhelníky), opice (plné trojúhelníky) a potkan (plné čtverce).

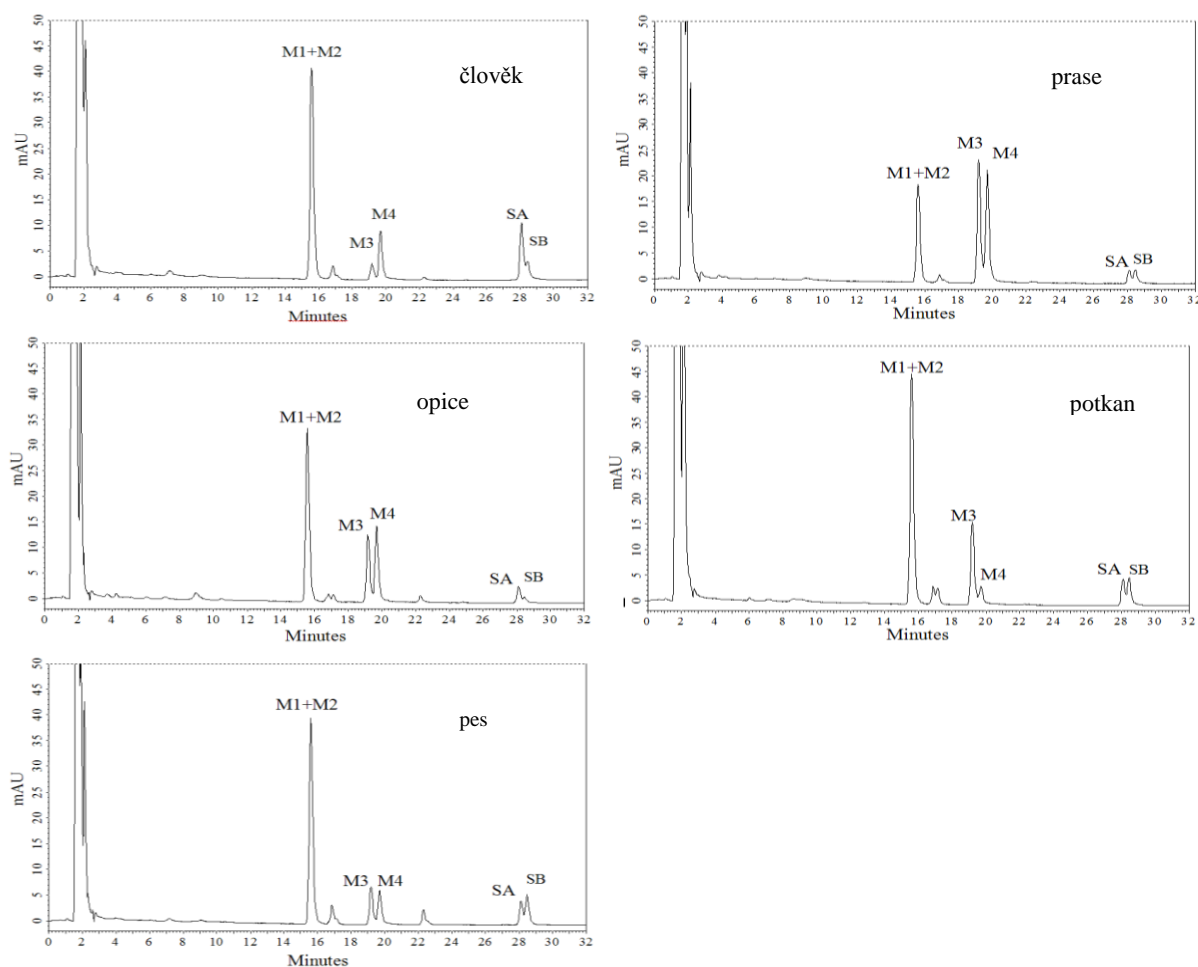


Výsledky ukazují, podobně jako je tomu u enzymů I. fáze metabolismu (Bogaards et al., 2000), že prase (alespoň dle hodnot K_M) je tomto případě vhodným modelovým organismem a vykazuje podobný průběh enzymové kinetiky jako člověk.

4.7 Stanovení glukuronidů silybinu v jaterní mikrosomální frakci člověka, prasete, potkana, psa a opice

V další části práce bylo přistoupeno ke studiu tvorby glukuronidů pomocí modelové látky silybinu. Tato látka je z hlediska enzymů II. fáze zajímavá tím, že je tvořena dvěma diastereoizomery (A a B) a umožňuje tvorbu glukuronidů v pozicích 7 a 20 (viz Obr. 4.). Cílem práce bylo zjistit, zda vůbec, anebo do jaké míry tvoří mikrosomální frakce vybraných modelových organismů glukuronidy této látky. Závěrem pak bylo cílem zhodnotit zda jednotlivé systémy mohou být použity jako model pro studium metabolismu II. fáze. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 18 a v Tabulce 14.

Obr. 18: Chromatogramy směsi glukuronidů silybinu u člověka, opice, psa, potkana a prasete. M1+M2 (silybin A-7- β -D-glukuronid + silybin B-7- β -D-glukuronid), M3 (silybin A-20- β -D-glukuronid), M4 (silybin B-20- β -D-glukuronid), SA (silybin A), SB (silybin B).



Tab. 14: Poměr jednotlivých glukuronidů vůči celkovému obsahu glukuronidů u jednotlivých species.

	poměr jednotlivých glukuronidů k celkovému množství (%)		
	A+B-7-β-D-glukuronid	A-20-β-D-glukuronid	B-20-β-D-glukuronid
člověk	77.1	5	17.9
prase	30	34.8	35.2
potkan	69.6	23.9	6.5
opice	55.8	19	25.2
pes	69.4	11.6	19

Z výsledků vyplývá, že co se týče spektra tvořených glukuronidů silybinu jsou člověku nejbližší opice a pes, u nichž je predominantní A+B-7-β-D-glukuronid. Prase naopak jako jediné tvoří relativně vyrovnané spektrum všech tří metabolitů, což naznačuje možnost účasti více forem UGT nebo jejich různou (stereo)specificitu. Co se ale týče celkového množství tvořených glukuronidů, není mezi jednotlivými druhy zásadní rozdíl ($\pm 20\%$).

5 Diskuse

Ačkoli jsou výsledky prezentované v této práci tématicky původem z různých oblastí farmakologie a biochemické farmakologie, mají za svůj společný cíl přispět k poznání metabolických podobností/rozdílů u experimentálních zvířat (hlavně u prasete) a u člověka. Podobně jako výsledky, i diskuse prezentovaných výsledků bude proto rozdělena na několik oblastí:

1. izolační postupy vedoucí k získání purifikovaných forem prasečích CYP
2. zjištění enzymových aktivit získaných prasečích CYP vůči prototypovým substrátům a porovnání těchto vlastností s lidskými formami CYP
3. porovnání biotransformace skatolu u člověka a prasete
4. mezidruhové srovnání aktivit UGT1A6 a glukuronidace silybinu

Ad 1) Prasečí CYP1A2 a CYP2A19 byly získány z jaterní mikrosomální frakce. Byl použit postup, který vycházel z metodiky navržené Guengerichem et al., (1982), která byla aplikována pro izolaci miniprasečího CYP2E1 (Baranová et al., 2005). Při tomto postupu se mikrosomální membrány solubilizují iontovým detergentem, v tomto případě cholátem sodným. Následně se vzorky aplikují na agarózové nosiče s cílem nejdříve oddělit frakce obsahující hlavně cytochromy P450, a poté izolovat danou formu. Prvním krokem frakcionace je použití hydrofóbní afinitní chromatografie, kde se jako sorbentu využívá agarosa s navázanými hydrofobními skupinami (hexyl-, oktyl-, lauryl-, aminooktyl-, fenyl-), tyto sorbenty pak mají různou míru afinity k CYP (Imai a Sato, 1974), jelikož cytochromy P450 jsou svou povahou hydrofobní proteiny. Podle práce Guengeriche et al., (1986) se jako nejvhodnější sorbent k izolaci cytochromů P450 používá oktyl-agarosa. Rozdílem oproti práci Baranové et al. (2005), je použití odlišného neiontového detergentu používaného k chromatografii na oktyl-agarose. Vzhledem k nedostupnosti dříve použitého Tritonu N-101 byl použit detergent jemu nejvíce podobný, a to Triton X-100 PC. Při frakcionaci vzorků na oktyl-agaróze tento detergent vykazoval velmi dobrou účinnost a chromatografie probíhala dle předpokladů. Tento detergent však po aplikaci vzorku na kolonu komerčního hydroxylapatitu, vázaného na částicích agarosy způsobil to, že se vzorek nezachytil a sloupcem protekl. Byl proto použit hydroxylapatit vyrobený srážením podle Levina (Levin, 1962). Tento nosič vykazoval pro naše použití mnohem lepší vlastnosti, a bylo tedy možno pokračovat v izolacích prasečích CYP. Identifikace forem CYP v průběhu purifikačního procesu byla prováděna pomocí elektroforézy

v polyakrylamidovém gelu s následným Western blottingem. Proteiny byly jasně rozpoznány komerčními protilátkami. V případě CYP2A19 byla použita myší protilátka proti lidskému CYP2A6. V případě identifikace CYP1A2 byla použita koží protilátka proti potkaní CYP1A2 a také králičí protilátka proti lidskému CYP1A2, i když tato vykazovala slabší odezvu. Protilátka proti potkaní CYP1A2 byla použita proto, jelikož prokazatelně reaguje s prasečí orthologní formou (Monshouwer et al., 1998; Skaanild a Friis, 1997; Messina et al., 2008). Výsledkem opakovaných chromatografií na hydroxylapatitu bylo získání čistých forem prasečích CYP1A2 a CYP1A19. V předkládané práci se osvědčil tento postup. Jeho výhodou je získání čisté formy enzymu; nevýhodami lze uvést poměrně vysoké ztráty enzymu (až 95%), způsobené nutností výběru čistých frakcí a časovou náročnost (v řádu měsíců).

Ad 2) Po izolaci CYP1A2 a CYP1A19 se přistoupilo k ověření jejich funkčnosti v rekonstituovaném systému. Enzymové aktivity byly měřeny v rekonstituovaném systému s micelami syntetického fosfolipidu dilauroylfosfatidylcholinu. Jako zdroj NADPH byl použit systém generující NADPH obsahující enzym isocitrátdehydrogenasu. Poměr komponent monooxygenázového systému (CYP, CYPOR a cytochrom b_5) 1:3:4 vycházel z obecně platných podmínek pro rekonstituci lidských forem CYP (Philips a Shephard, 1998). Gen či protein CYP1A2 byl už v minulosti charakterizován u vícero živočišných druhů (Distlerath et al., 1985; Guengerich et al., 1982; Sakuma et al., 1997; Sakuma et al., 1998) a poměrně nedávno také u prasete (Messina et al., 2008; Matal et al., 2009a). K posouzení aktivity prasečího CYP1A2 byly použity dva typické substráty této formy, 7-methoxyresorufin a 7-ethoxyresorufin (Zamaratskaia a Zlabek, 2009; Messina et al., 2008). Dle očekávání, prasečí protein vykazoval typické katalytické vlastnosti této formy a byl schopen oba tyto substráty biotransformovat. Kinetické parametry prasečího enzymu byly velmi podobné těm u člověka. Toto platí zvláště o hodnotách K_M a to jak v případě MERR, tak v případě ETRR. V případě hodnot V_{max} se ukázalo, že u MROD vykazuje prasečí enzym vyšší hodnoty než enzym lidský, což naznačuje, že u prasete je 7-methoxyresorufin lepším markerem aktivity CYP1A2 než 7-ethoxyresorufin, což je vlastnost i potkaní orthologní formy (Parkinson, 1996). Podobné výsledky byly zjištěny i v práci Messina et al., (2008). V případě měření markerových aktivit CYP1A2 v mikrosomální frakci jaterního homogenátu byly u prasete pozorovány nižší

hodnoty V_{\max} , jak u MEROD tak u EROD, což ukazuje na procentuálně nižší zastoupení této enzymové formy v játrech prasete v porovnání s člověkem (Messina et al., 2008). Byla provedena i inhibice EROD pomocí specifického, "mechanim-based" inhibitoru CYP1A2, furafyllinu (Kunze a Trager, 1993). Bylo prokázáno, že tato aktivita je inhibována, což je dalším důkazem o podobnosti prasečí a lidské formy. V práci Messina et al., (2008) byl gen prasečího CYP1A2 sekvenován a bylo zjištěno, že je z 85% identický s lidským. Byly též analyzovány sekvence míst určujících substrátovou specificitu (substrate recognition sites), SRS a bylo zjištěno, že podobnost je od 75 % pro SRS1 až po 100 % u SRS6. Signifikantní rozdíl byl nalezen v pozici 382 aminokyselinové sekvence, kde je u prasete valin, zatímco u člověka leucin. Tato mutace v SRS5 je u člověka odpovědná za změnu v substrátové specificitě (následné snížení EROD a zvýšení MEROD) (Liu et al. 2004). Toto zjištění je tak možným vysvětlením vyšší V_{\max} u MEROD u prasečího CYP1A2. Ačkoli nebyl námi izolovaný CYP1A2 sekvenován, na základě imunoreaktivity, aktivity vůči typickým substrátům této formy a citlivosti vůči specifickému inhibitoru se nepochybně jedná o CYP1A2. Celkově vzato, prasečí CYP1A2 vykazuje, jak bylo zjištěno v našich experimentech a také u dalších autorů, vlastnosti velmi podobné lidské formě a prase by tak mohlo sloužit jako vhodný modelový organismus při studiu potenciálních léčiv metabolisovaných touto formou (Chirulli et al., 2007; Messina et al., 2008).

Dalším izolovaným enzymem byl CYP2A19, jenž odpovídá lidské CYP2A6. Tato forma je u člověka odpovědná za metabolismus nikotinu a 7-hydroxylaci kumarinu. Stejně substráty metabolisuje i prasečí CYP1A19 (Skaanild a Friis, 2005). V minulosti byla sekvenována prasečí cDNA této formy (Kojima a Morozumi, 2004; Skaanild a Friis, 2005), nicméně až dosud nebyl protein izolován. U námi izolované formy byly zjištěny kinetické parametry v rekonstituovaném systému, výsledky byly porovnány s těmi u člověka a bylo zjištěno, že enzymy vykazují téměř shodné hodnoty K_M . V případě hodnot V_{\max} vykazuje lidský enzymy vyšší hodnoty (zhruba 2,5-krát), nicméně obě enzymové formy jsou schopny markerový substrát přeměňovat. Podle dosažených výsledků lze říci, že prase by mohlo být vhodným modelem pro studium metabolismu látek zprostředkovaným CYP2A6. Podobně jako v případě CYP1A2, byl proveden experiment se specifickým inhibitem této lidské formy (Koenigs et al., 1997) a bylo zjištěno, že aktivita CYP2A19, měřená jako 7-hydroxylace kumarinu, je inhibovaná

8-methoxyorsoralenem. Tato forma také vykazovala při Western blottingu imunoreaktivitu vůči protilátce vůči lidské orthologní formě. Imunoreaktivita, citlivost vůči specifickému inhibitoru a zjištěná schopnost přeměňovat typický substrát lidské formy jsou výsledky, které jasně hovoří o podobnosti lidské a prasečí formy CYP2A, a zdá se, že by i tato forma prasečího enzymu mohla sloužit jako model při studiu metabolismu a toxicity látek u člověka (Matal et al., 2009a; Skaanild a Friis, 2005).

Ad 3) Námi izolované enzymy byly spolu s prasečím CYP2E1 použity v rekonstituovaném systému k objasnění biotransformace skatolu. Tato látka je tvořena bakteriální mikroflórou v gastrointestinálním traktu přežvýkavců (Yokoyama a Carlson, 1979), lidí (Fordtran et al., 1964) a prasat (Jensen et al., 1995). Skatol je po své metabolické aktivaci CYP na elektrofilní metabolity schopen cíleně poškozovat plicní tkáň, ačkoli u člověka detailní studie dosud chybí (Skordos et al., 1998). Člověk může být vystaven vlivu skatolu buď díky absorpci z GIT, pobytem v uzavřených, špatně větraných zemědělských budovách (např. vepřiny) nebo i vdechováním cigaretového kouře, jehož je skatol jednou ze složek (Diaz et al., 1999; Upadhyay a Holbrook 2004). Dosud také nebyla popsána žádná fyziologická funkce skatolu. Hlavním a nežádoucím efektem je u skatolu fakt, že se hromadí v tukové tkáni nekastrovaných samců a způsobuje tak velmi nepříjemný zápach masa těchto zvířat. To způsobuje značné hospodářské ztráty v zemích, kde se prasata rutinně nekastrují (severské země, Velká Británie). V minulosti bylo provedeno několik studií mající za cíl určit jednotlivé formy CYP odpovědné za metabolismus skatolu, jelikož metabolity skatolu zápach masa nezpůsobují (Diaz a Squires, 2000a). Tyto studie byly provedeny pomocí specifických inhibitorů a jejich výsledkem byl předpoklad, že CYP2E1 a CYP2A19 jsou zapojeny do biotransformace skatolu (Babol et al., 1998; Diaz a Squires, 2000a; Turner et al., 2006). Nicméně, přímé důkazy s použitím čistých enzymových forem nebyly dosud publikovány. Ví se také, že hladiny skatolu v tuku negativně korelují s aktivitami prasečích CYP2E1 a CYP2A19 (Friis et al., 1995; Diaz a Squires, 2000a; Zamaratskaia et al., 2009). Výsledky však byly získány nepřímými metodami a nemusely být zcela spolehlivé, např. vzhledem k tomu, že inhibitory nemusí vždy v mikrosomální frakci či hepatocytech inhibovat jen jednu formu CYP, ale mohou částečně ovlivňovat i jinou (Turner et al., 2006). Tyto poznatky jen vyzdvihují nutnost objasnit podíl dané formy CYP použitím jeho čisté formy, např.

v rekonstituovaném systému. Použití čistých lidských a prasečích CYP v rekonstituovaném systému, tak jak je ukázáno v této práci, může pomoci k objasnění metabolismu skatolu.

Dle našich dosažených výsledků prasečí CYP1A2, 2E1 a 2A19 jsou schopny v rekonstituovaném systému tvořit dva metabolity, indol-3-karbinol a 3-methyloxindol. Z dříve publikovaných prací vyplývá, že 3MOI je jedním z hlavních metabolitů skatolu (Diaz et al., 1999). U prasete se zdá být CYP2A19 při tvorbě tohoto metabolitu nejdůležitějším, jelikož vykazuje nejvyšší aktivitu vůči skatolu (viz Tabulka 11). Důležitost CYP2A19 v biotransformaci skatolu byla také potvrzena v práci Diaze a Squirese (2000a), prováděné v mikromální frakci jaterního homogenátu. U člověka má tato forma zřejmě pouze minoritní význam ve srovnání s ostatními použitými enzymy. Není bez zajímavosti, že aktivita CYP2A19, měřená jako 7-hydroxylace kumarinu, vykazuje u prasete obrovskou interindividuální variabilitu (až 196-ti násobnou) a také množství CYP2A19 se liší až 600-krát (Diaz a Squires, 2000a). Tato extrémní variabilita může být důsledkem buď genetického polymorfismu ale spíše regulace na úrovni transkripce (Skaanild a Friis, 2005). Aktivity CYP2A19 a také CYP2E1 jsou také závislé na množství testikulárních hormonů (Doran et al., 2002; Gillberg et al., 2006; Zamaratskaia et al., 2009).

Prasečí CYP1A2, jak bylo poprvé zjištěno v našich experimentech (Matal et al., 2009b), také tvoří dva výše zmíněné metabolity, ačkoli dosud nebyl žádný důkaz potvrzující roli CYP1A2 v metabolismu skatolu. Na druhou stranu, tento výsledek není tak překvapivý, jelikož tyto 3MOI a I3C jsou tvořeny i lidskou formou tohoto enzymu, což už bylo dříve potvrzeno s enzymy exprimovanými v bakteriálních membránách (Lanza a Yost, 2001) a také vzhledem k podobnosti lidské a prasečí formy CYP1A2 popsané zde v této práci a také jinými autory (Messina et al., 2008). Náznak toho, že i další, dosud nepopsané prasečí formy CYP jsou zapojeny do metabolismu skatolu byl popsán v práci Ternera et al., (2006), prováděné na kultuře prasečích hepatocytů. V této práci bylo zjištěno, že tvorba 3MOI a také dalšího metabolitu, 3-hydroxy-3-methyloxindolu, není zcela ovlivněna inhibitory CYP2A19 a CYP2E1. Tvorba 3-hydroxy-3-methyloxindolu je katalyzována především aldehyd-oxidázou (cytosolický enzym přítomný v hepatocytech) a množství tvořené CYP obsaženými v mikrosomální frakci je zanedbatelné (Diaz a Squires, 2000b) a tudíž vliv inhibitorů nemusel být příliš patrný. V případě 3MOI, jak bylo ukázáno

v naší práci, se na jeho tvorbě podílí CYP1A2, což koreluje jak s faktem, že tvorba tohoto metabolitu není ovlivněna inhibitory CYP2E1 a CYP2A19, tak s faktem, že lidská forma tento metabolit tvoří také. V dřívějších pracech nebyl popsán vliv CYP jiných než CYP2E1 a CYP2A19 na tvorbu I3C, možná i díky tomu, že tento metabolit je pouze minoritní (Diaz et al., 1999). Celkově vzato, dříve naznačený podíl dalších CYP na metabolismu skatolu u prasete byl námi potvrzen s tím, že se na metabolismu skatolu (podobně jako u člověka), podílí CYP1A2.

V případě prasečího CYP2E1 bylo zjištěno, že se podílí pouze na tvorbě 3MOI, zatímco u člověka tvoří také I3C, jenž je však u prasete méně důležitým metabolitem. Podle námi zjištěných výsledků se zdá, že podíl CYP2A6/19 a CYP2E1 na metabolismu skatolu je u člověka a prasete obrácen. Lidský CYP2E1 totiž tvoří oba metabolity, zatímco prasečí forma jen jeden a analogicky obrácené výsledky platí pro lidský CYP2A6 a prasečí CYP2A19.

Ačkoli jsou tyto výsledky důležitým přínosem pro studium metabolismu skatolu u prasete jako experimentálního modelu ve farmakologii, stále nejsou všechny metabolické cesty objasněny. V experimentu s použitím jaterní mikrosomální frakce byly detekovány čtyři metabolity, a to 3-hydroxy-3-methyloxindol, indol-3-carbinol (I3C), 3-methyloxindol (3MOI) a 2-aminoacetofenon. V práci Diaze et al., (1999), bylo nalezeno dokonce sedm metabolitů. Naproti tomu v experimentech s kulturou hepatocytů byly detekovány metabolity tři (Turner et al., 2006). Možným vysvětlením je, že metabolit vzniklý působením jednoho enzymu se následně stává substrátem pro enzym další. Je tak nanejvýš pravděpodobné očekávat podíl dalších enzymů, a to nejen cytochromů P450, včetně enzymů druhé fáze metabolismu.

Ad 4) V poslední fázi našich experimentů bylo přikročeno k pokusům s enzymy druhé fáze metabolismu. Pro začátek experimentů byly vybrány glukuronosyltransferázy, neboť u savců je glukuronidace hlavní konjugační reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik. Je zodpovědná za konjugaci zhruba 35% všech léčiv. Forma UGT1A6 je jedna ze dvou nejvíce exprimovaných forem u savců a je koindukována, spolu s CYP1A, ligandy receptoru AhR (např. polycyklickými aromatickými uhlovodíky) (Emi et al., 1995). Toho lze v praxi využít při stanovení environmentální zátěže organismů (Münzel et al., 1999). Stanovení aktivity UGT1A6 je součástí toxikologického výzkumu. Jejimi markerovými substráty jsou planární molekuly jako např. p-nitrofenol a 4-methylumbelliferon (Hanioka et al.,

2001). UGT1A6 se dále podílí na konjugaci paracetamolu (Bock a Köhle, 2005) a účastní se i konjugace polyfenolů, např. silybinu (D'Andrea et al., 2005). Tato forma byla vybrána i proto, že má své markerové substráty, což není u všech UGT obvyklé vzhledem ke značně se překrývající substrátové specifitě (Kiang et al., 2005).

V námi provedených experimentech jsme zkoumali kinetické parametry UGT1A6 v jaterní mikrosomální frakci s cílem zjistit, který z použitých experimentálních modelů (pes, potkan, opice, prase) se svými vlastnostmi nejvíce podobá člověku (Matal et al., 2008). Pokusy byly provedeny i proto, že ačkoli je relativně dobře prozkoumán metabolismus první fáze, znalosti o enzymech druhé fáze u nejčastějších experimentálních zvířat značně pokulhávají. Z dosažených výsledků vyplývá, že nejvhodnějším modelem pro studium metabolismu zprostředkovaném formou 1A6 se zdá být prase. Vykazuje totiž kinetiku nejvíce podobnou člověku, a to minimálně v hodnotách K_M , přičemž hodnoty V_{max} jsou si taky velice podobné. Dobrým modelem se zdá být též opice (*Maccaca rhesus*). UGT1A6 je však jen jedna z mnoha glukuronosyltransferáz obsažených v jaterní mikrosomální frakci. Abychom si udělali lepší představu o celkové glukuronidaci probíhající v játrech, byl vybrán substrát, o němž je známo, že se na jeho glukuronidaci podílí více forem UGT, a to silybin jehož metabolismus u člověka je intenzivně studován (Jančová et al., 2007). Cílem spolupráce pak bylo získat informaci o mezidruhových rozdílech v metabolismu silybinu u člověka, prasete, potkana, opice a psa. U každého se sledovaných species byl nakonec zjištěn jiný metabolický profil v tvorbě příslušných glukuronidů. U všech druhů kromě prasete byla predominantní tvorba 7-substituovaných glukuronidů. Naopak u prasete, jako jediného modelu, byla tvorba všech čtyř metabolitů poměrně vyrovnaná. Vzhledem k dosaženým výsledkům v případě glukuronidace silybinu se ideálním modelem pro experimentální farmakologii zaměřenou na metabolismus xenobiotik ve 2. fázi zdá být opice a pes. Co se týče celkového množství tvořených glukuronidů, nebyl mezi jednotlivými druhy pozorován zásadní rozdíl a lze říct, že v tomto ohledu jsou si všechny použité experimentální modely rovnocenné.

Předložená dizertační práce je malým příspěvkem k hodnocení vlastností biotransformačních enzymů se zaměřením hlavně na cytochromy P450 u člověka a prasete. Z výsledků této práce vyplývá, že prase je vhodným modelem pro studium metabolismu xenobiotik zprostředkovaným zejména jaterními mikrosomálními

cytochromy P450 (CYP3A29, CYP2E1, CYP2A19, CYP1A2) u člověka. Z hlediska vhodnosti jednotlivých experimentálních modelů je ale třeba uvést, že záleží především na cestě metabolismu dané studované látky. Z tohoto pohledu zřejmě prase není vhodným modelem pro metabolické přeměny zprostředkované formami CYP2C či CYP2D, které se podle údajů z literatury liší vlastnostmi od lidských protějšků (Skaanild a Friis, 2002, 2008). Předložená práce přináší rovněž další poznatky využitelné pro hodnocení vlastností prasečích buněk či orgánů v bioarteficiálních náhradách jater nebo do budoucna k xenotransplantacím (Demetriou et al., 2004; Hammer, 2004; Strain a Neuberger, 2002)

6 Závěr

- Kombinací chromatografických metod zahrnující hydrofobní afinitní chromatografii a ionexovou adsorbční chromatografii byl získán CYP1A2 a CYP2A19 z jaterní mikrosomální frakce buněčného homogenátu prasete v čisté formě.
- Izolované enzymy vykazovaly charakteristické vlastnosti příslušné jejich formám. Pomocí Western blottingu byla ověřena jejich imunoreaktivita s protilátkami proti potkanímu CYP1A2, resp. lidskému CYP2A6. V rekonstituovaném systému vykazoval CYP1A2 aktivitu vůči typickým substrátům této formy. CYP2A19 vykazoval taktéž aktivitu vůči typickému substrátu lidské formy, kumarinu. Enzymové aktivity obou CYP byly významně sníženy za použití inhibitorů orthologních forem známých u člověka.
- V rekonstituovaném systému byl ověřen podíl izolovaných forem CYP na metabolismu skatolu. Použité enzymy (CYP1A2, 2A6/19, 2E1) byly jak u člověka, tak u prasete zodpovědny za tvorbu dvou metabolitů, a to 3-methyloxindolu a indol-3-karbinolu. U prasete se podle množství tvořených metabolitů zdá být pro metabolismus skatolu nejdůležitější CYP1A2 a CYP2A19, zatímco u člověka jsou to formy CYP1A2 a CYP2E1.
- Byly zjištěny kinetické parametry jedné z hlavních forem glukuronosyltransferas, formy UGT1A6, se substráty 4-MU s p-NP. Získané výsledky ukazují na podobnost vlastností této formy u člověka a u prasete jako experimentálního modelu. V případě glukuronidace silybinu se jako nejlepším modelem zdá být opice a pes.
- Získané výsledky ukazují na podobnost biotransformačních procesů u prasete a člověka a podporují možné využití prasečích hepatocytů při konstrukci bioateficiálních jaterních náhrad.

7 Literatura

- Aiba T, Takehara Y, Okuno M, Hashimoto Y (2003). Poor correlation between intestinal and hepatic metabolic rates of CYP3A4 substrates in rats. *Pharm Res.* **20(5)**:745-748.
- Aničkov N (1913). Über die veränderungen der kaninchenaorta bei experimenteller cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat.* **56**:379-404.
- Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* **58**:737-747.
- Anzenbacher P, Souček P, Anzenbacherová E, Gut I, Hrubý K, Svoboda Z, Květina J (1998). Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **26(1)**:56-59.
- Anzenbacherová E, Baranová J, Zuber R, Pěchová A, Anzenbacher P, Souček P, Martínková J (2005). Model systems based on experimental animals for studies on drug metabolism in man: (Mini) pig cytochromes P450 3A29 and 2E1. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **96**:244-245.
- Arinç E, Arslan S, Adali O (2005). Differential effects of diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 proteins and associated drug metabolising enzyme activities in rabbit liver. *Arch Toxicol.* **79(8)**:427-433.
- Armstrong SC, Cozza KL (2003a). Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, part I. *Psychosomatics.* **44(2)**:167-171.
- Armstrong SC, Cozza KL (2003b). Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, Part II. *Psychosomatics.* **44(6)**:515-520.
- Axén E, Bergman T, Wikvall K (1992). Purification and characterization of a vitamin D3 25-hydroxylase from pig liver microsomes. *Biochem J.* **287(3)**:725-731.
- Babol J, Squires EJ, Lundström K (1998). Hepatic metabolism of skatole in pigs by cytochrome P4502E1. *J Anim Sci.* **76(3)**:822-828.
- Baranová J, Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Souček P (2005). Minipig cytochrome P450 2E1: comparison with human enzyme. *Drug Metab Dispos.* **33(6)**:862-865.
- Barbier O, Bélanger A (2003). The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) is the best animal model for the study of steroid glucuronidation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **85(2-5)**:235-245.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.* **53(5)**:583-600.

- Bæk C, Hansen-Møller J, Friis C and Hansen SH (1995). Identification and quantification of selected metabolites of skatole—Possibilities for metabolic profiling of pigs. Proceedings of a meeting of the EAAP Working Group on Production and Utilisation of Meat from Entire Male Pigs; 27–29 září 1995; Milton Keynes (UK). Milton Keynes: INRA and MLC (184 p.).
- Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacqz-Aigrain E, Beaune PH (1992). Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P450A enzymes. *Xenobiotica*. **22(6)**:671-680.
- Bock KW, Köhle C (2005). UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol*. **400**:57-75.
- Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS (1990). Induction of drug-metabolising enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica*. **20(11)**:1101-1111.
- Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B (2000). Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*. **30(12)**:1131-1152.
- Bray TM, Kubow S (1985). Involvement of free radicals in the mechanism of 3-methylindole-induced pulmonary toxicity: an example of metabolic activation in chemically induced lung disease. *Environ Health Perspect*. **64**:61-67.
- Brouwers EE, Söhne M, Kuipers S, van Gorp EC, Schellens JH, Koks CH, Beijnen JH, Huitema AD (2009). Ciprofloxacin strongly inhibits clozapine metabolism: two case reports. *Clin Drug Investig*. **29(1)**:59-63.
- Bruyère A, Declevès X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, Parmentier Y (2009). Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica*. **39(1)**:22-32.
- Bullock P, Pearce R, Draper A, Podval J, Bracken W, Veltman J, Thomas P, Parkinson A (1995). Induction of liver microsomal cytochrome P450 in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*. **23(7)**:736-748.
- Burchell B (2003). Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics*. **3(1)**:37-52.
- Buzková H, Pechandová K, Slanar O, Perlík F (2008). Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct*. **26(1)**:76-81.
- Clapper ML (2000). Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep*. **2(3)**:251-256.

- Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA (2009). Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol.* **65(2)**:121-139.
- Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH (2002). Will the pig solve the transplantation backlog? *Annu Rev Med.* **53**:133-147.
- Couzin J (2002). Wanted: pig transplants that work. *Science* (Wash DC). **295**:1108.
- Critchley JA, Dyson EH, Scott AW, Jarvie DR, Prescott LF (1983). Is there a place for cimetidine or ethanol in the treatment of paracetamol poisoning? *Lancet.* **1(8338)**:1375-1376.
- D'Andrea V, Pérez LM, Sánchez Pozzi EJ (2005). Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci.* **77(6)**:683-692.
- Daly AK (2009). Pharmacogenomics of anticoagulants: steps toward personal dosage. *Genome Med.* **1(1)**:10.
- Dart RC, Kuffner EK, Rumack BH (2000). Treatment of pain or fever with paracetamol (acetaminophen) in the alcoholic patient: a systematic review. *Am J Ther.* **7(2)**:123-134.
- Darwin C: *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex* (D Appleton and Company, 1st. Edition), New York, 1871. (dostupné on-line na <http://darwin-online.org.uk/content/frameset?itemID=F937.1&viewtype=side&pageseq=1>)
- Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS 2nd, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA (2004). Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg.* **239(5)**:660-670.
- De Morais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J (1994). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem.* **269**:15419-15422.
- Desille M, Corcos L, L'Helgoualch A, Frémond B, Champion JP, Guillouzo A, Clément B (1999). Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy. *Transplantation.* **68**:1437-1443.
- Diaz GJ, Skordos KW, Yost GS, Squires EJ (1999). Identification of phase I metabolites of 3-methylindole produced by pig liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **27(10)**:1150-1156.
- Diaz GJ, Squires EJ (2000a). Metabolism of 3-methylindole by porcine liver microsomes: responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicol Sci.* **55**:284-292.

Diaz GJ, Squires EJ (2000b). Role of aldehyde oxidase in the hepatic in vitro metabolism of 3-methylindole in pigs. *J Agric Food Chem.* **48(3)**:833-837.

Distlerath LM, Reilly PEB, Martin MV, Davis GG, Wilkinson GR, Guengerich FP (1985). Purification and characterization of human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin *O*-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem.* **260**:9057-9067.

Doran O, Whittington FW, Wood JD, McGivan JD (2002). Cytochrome P450IIIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. *Chem Biol Interact.* **140**:81–92.

Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R (1996). Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology.* **24(6)**:1446-1451.

Emi Y, Ikushiro S, Iyanagi T (1995). Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex. *J Biochem.* **117(2)**:392-399.

Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL Jr, Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR (2003). Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics.* **13**:595–606.

Fordtran JS, Scroggie WB, Polter DE (1964). Colonic absorption of tryptophan metabolites in man. *J Lab Clin Med.* **64**:125-132.

Foster A, Mobley E, Wang Z (2007). Complicated pain management in a CYP450 2D6 poor metaboliser. *Pain Pract.* **7(4)**:352-456.

Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, Cuomo V (2007). Gender differences in drug responses. *Pharmacol Res.* **55(2)**:81-95.

Fric M, Pfuhlmann B, Laux G, Riederer P, Distler G, Artmann S, Wohlschläger M, Liebmann M, Deckert J (2008). The influence of smoking on the serum level of duloxetine. *Pharmacopsychiatry.* **41(4)**:151-155.

Frühauf JH, Mertsching H, Giri S, Frühauf NR, Bader A (2009). Porcine endogenous retrovirus released by a bioartificial liver infects primary human cells. *Liver Int.* **29(10)**:1553-1561.

Frye RF (2004). Probing the world of cytochrome P450 enzymes. *Mol Interv.* **4(3)**:157-162.

Fujita S, Umeda S, Funae Y, Imaoka S, Abe H, Ishida R, Adachi T, Masuda M, Kazusaka A, Suzuki T (1993). Regio- and stereoselective propranolol metabolism by 15 forms of purified cytochromes P-450 from rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* **264(1)**:226-233.

Gerónimo-Pardo M, Cuartero-del-Pozo AB, Jiménez-Vizuete JM, Cortiñas-Sáez M, Peyró-García R (2005). Clarithromycin-nifedipine interaction as possible cause of vasodilatory shock. *Ann Pharmacother.* **39(3)**:538-542.

Gillberg M, Skaanild MT, Friis C (2006). Regulation of gender-dependent CYP2A expression in pigs: involvement of androgens and CAR. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **98(5)**: 480-487.

Gonzalez FJ (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* **569(1-2)**:101-110.

Graham MJ, Bell AR, Crewe HK, Moorcraft CL, Walker L, Whittaker EF, Lennard MS (2003). mRNA and protein expression of dog liver cytochromes P450 in relation to the metabolism of human CYP2C substrates. *Xenobiotica.* **33**:225–237.

Graham RA, Downey A, Mudra D, Krueger L, Carroll K, Chengelis C, Madan A, Parkinson A (2002). In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 enzymes in beagle dogs. *Drug Metab. Dispos.* **30**:1206-1213.

Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, Ortiz de Montellano PR (Ed.) (1995), Plenum, New York, 473-535.

Guengerich FP (1997). Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* **106(3)**:161-182.

Guengerich FP (2003). Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol. Inter.* **3(4)**, 194-204.

Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS (1982). Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry.* **21(23)**:6019-6030.

Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolf T, Waxman DJ (1986). Characterisation of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem.* **261**:5051-5060.

Guengerich FP, Shimada T (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* **4**:391–407.

Guengerich FP, Wu Z, Bartleson CJ (2005). Function of human cytochrome P450s: characterisation of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**:465–469.

Guillouzo A (1998). Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect.* **106 (Suppl 2)**:511-532.

Hammer C (2004). Xenotransplantation--will it bring the solution to organ shortage? *Ann Transplant.* **9(1)**:7-10.

Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M (2001). Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* **25(1)**:65-75.

Hashimoto C, Imai Y (1976). Purification of a substrate complex of cytochrome P-450 from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-treated rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* **68(3)**:821-827.

Haugen DA, Coon MJ (1976). Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and beta-naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem.* **251(24)**:7929-7939.

Hersh EV, Moore PA (2004). Drug interactions in dentistry: the importance of knowing your CYPs. *J Am Dent Assoc.* **135(3)**:298-311.

Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE (2002). Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA.* **287(13)**:1690-1698.

van der Hoeven TA, Haugen DA, Coon MJ (1974). Cytochrome P-450 purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: catalytic activity and other properties. *Biochem Biophys Res Commun.* **60(2)**:569-575.

Honkakoski P, Negishi M (2000). Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* **347**:321-337.

Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF (2007). Human cytochrome p450 family 4 enzymes: function, genetic variation and regulation. *Drug Metab Rev.* **39(2-3)**:515-538.

Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz N (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* **57(1)**:79-115.

Chang TKH, Waxman DJ (1998). Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as a substrate. V Cytochrome P450 Protocols. Phillips IR and Shephard EA (Eds) pp. 103-122. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Chen ZR, Irvine RJ, Bochner F, Somogyi AA (1990). Morphine formation from codeine in rat brain: a possible mechanism of codeine analgesia. *Life Sci.* **46(15)**:1067-1074.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium (2005). Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature.* **437(7055)**:69-87.

- Chirulli V, Marvasi L, Zaghini A, Fiorio R, Longo V, Gervasi PG (2007). Inducibility of AhR-regulated CYP genes by b-naphthoflavone in the liver, lung, kidney and heart of the pig. *Toxicology*. **240**:25–37.
- Choi JS, Li X (2005). Enhanced diltiazem bioavailability after oral administration of diltiazem with quercetin to rabbits. *Int J Pharm*. **297(1-2)**:1-8.
- Chovan JP, Ring SC, Yu E, Baldino JP (2007). Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica*. **37(5)**:459-473.
- Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK, Miller WL (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83(23)**:8962-8966.
- Imai Y, Sato R (1974). An affinity column method for partial purification of cytochrome P-450 from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes. *J Biochem*. **75**:689-697.
- Ingelman-Sundberg M (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics*. **5(1)**:6-13.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzyme: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharm Sci*. **20**:342-349.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. **116(3)**:496-526.
- Ishizuka M, Lee JJ, Masuda M, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S (2006). CYP2D-related metabolism in animals of the CYP2D superfamily - species differences. *Vet Res Commun*. **30(5)**:505-512.
- Isin EM, Guengerich FP (2008). Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem*. **392(6)**:1019-1030.
- Jančová P, Anzenbacherová E, Papoušková B, Lemr K, Luzná P, Veinlichová A, Anzenbacher P, Šimánek V (2007). Silybin is metabolised by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metab Dispos*. **35(11)**:2035-2039.
- Jayyosi Z, Muc M, Erick J, Thomas PE, Kelley M (1996). Catalytic and immunochemical characterization of cytochrome P450 isozyme induction in dog liver. *Fundam Appl Toxicol*. **31**:95-102.
- Jensen MT, Cox RP, Jensen BB (1995). 3-Methylindole (skatole) and indole production by mixed populations of pig fecal bacteria. *Appl Environ Microbiol*. **61(8)**:3180-3184.

Jetter A, Kinzig-Schippers M, Walchner-Bonjean M, Hering U, Bulitta J, Schreiner P, Sörgel F, Fuhr U (2002). Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of sildenafil. *Clin Pharmacol Ther.* **71(1)**:21-29.

Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, von Richter O, Jin L, Nebert DW (2006). Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics.* **16(5)**:359-367.

Lanza DL, Yost GS (2001). Selective dehydrogenation/oxygenation of 3-methylindole by cytochrome p450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* **29(7)**:950-953.

Kamataki T, Fujieda M, Kiyotani K, Iwano S, Kunitoh H (2005). Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Commun.* **338(1)**:306-310.

Kamimura H (2006). Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. *Arch Toxicol.* **80(11)**:732-738.

Kantola T, Koivusalo AM, Höckerstedt K, Isoniemi H (2008). The effect of molecular adsorbent recirculating system treatment on survival, native liver recovery, and need for liver transplantation in acute liver failure patients. *Transpl Int.* **21(9)**:857-866.

Kapitulnik J, Strobel HW (1999). Extrahepatic drug metabolising enzymes. *J Biochem Mol Toxicol.* **13(5)**:227-230.

Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki H, Kayaba S, Noguchi K, Abe S, Noguchi M, Shimosegawa T (2007). Cytochrome P450 2C19 polymorphism influences the preventive effect of lansoprazole on the recurrence of erosive reflux esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol.* **22**:222–226.

van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Dauri M, Tisone G, Di Nicuolo G, Amoroso P, Spadari A, Lombardi G, Hoekstra R, Calise F, Chamuleau RA (2002). Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs.* **25(10)**:950-959.

van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM (2004a). Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg.* **240(2)**:216-230.

van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA (2004b). Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials.* **25(9)**:1613-1625.

van de Kerkhove MP, Poyck PP, van Wijk AC, Galavotti D, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA (2005). Assessment and improvement of liver specific function of the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs.* **28(6)**:617-630.

Kerrigan CL, Zelt RG, Thomson JG, Diano E (1986). The pig as an experimental animal in plastic surgery research for the study of skin flaps, myocutaneous flaps and fasciocutaneous flaps. *Lab Anim Sci.* **36(4)**:408-412.

Khalique SC, Cheng-Lai A (2009). Drug interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors. *Cardiol Rev.* **17(4)**:198-200.

Kiang TK, Ensom MH, Chang TK (2005). UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* **106(1)**:97-132.

Kirchheiner J, Brockmoller J (2005). Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* **77**:1-16.

Kirchheiner J, Brøsen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjöqvist F, Spina E, Brockmoller J (2001). CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand.* **104(3)**:173-192.

Kishida T, Muto S, Hayashi M, Tsutsui M, Tanaka S, Murakami M, Kuroda J (2008). Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci.* **33(4)**:447-457.

Klingenberg M (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* **75(2)**:376-386.

Kocarek TA, Zangar R, Novak RF (2000). Post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 expression: role of CYP2E1 mRNA untranslated regions in control of translational efficiency and message stability. *Arch Biochem Biophys.* **376**:180-190.

Koenigs LL, Peter RM, Thompson SJ, Rettie AE, Trager WF (1997). Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metabolism and Disposition.* **12**:1407-1415.

Kojima M., Morozumi T (2004). Cloning of six full-length cDNAs encoding pig cytochrome P450 enzymes and gene expression of these enzymes in the liver and kidney. *J Health Sci.* **50**:518-529.

Komori M, Kikuchi O, Sakuma T, Funaki J, Kitada M, Kamataki T (1992). Molecular cloning of monkey liver cytochrome P-450 cDNAs: similarity of the primary sequences to human cytochromes P-450. *Biochim Biophys Acta.* **1171(2)**:141-146.

Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder SJ (2006). Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet.* **368(9536)**:704.

Kousalová L, Anzenbacherová E, Baranová J, Anzenbacher P, Skoumalová I, Vondráková J (2004). Presence of cytochrome P450 enzymes in human CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Gen Physiol Biophys.* **23(2)**:251-257.

- Kraemer D, Scheurlen M (2002). Gilbert disease and type I and II Crigler-Najjar syndrome due to mutations in the same UGT1A1 gene locus. *Med Klin.* **97(9)**:528-532.
- Krishna DR, Klotz U (1994). Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* **26(2)**:144-160.
- Kunze KL, Trager WF (1993). Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chemical research in toxicology.* **6(5)**: 649-656.
- Kupfer A, Preisig R (1984). Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol.* **26**:753-759.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Laine K, Palovaara S, Tapanainen P, Manninen P (1999). Plasma tacrine concentrations are significantly increased by concomitant hormone replacement therapy. *Clin Pharmacol Ther.* **66(6)**:602-608.
- Lake BG (1990) v Biochemical Toxicology. A practical approach (Snell K, Mullock B, Eds.) kap. 8, IRL Press, Oxford, 183-215.
- Lanza DL, Code E, Crespi CL, Gonzalez FJ, Yost GS (1999). Specific dehydrogenation of 3-methylindole and epoxidation of naphthalene by recombinant human CYP2F1 expressed in lymphoblastoid cells. *Drug Metab Dispos.* **27(7)**:798-803.
- Lanza DL, Yost GS (2001). Selective dehydrogenation/oxygenation of 3-methylindole by cytochrome p450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* **29(7)**:950-953.
- Levin O (1962). Column chromatography of proteins: Calcium phosphate. *Meth Enzymol.* **5**:27-32.
- Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, Goldstein RM, Newman JT, Gonwa TA, Banchereau J, Diamond LE, Byrne G, Logan J, Klintmalm GB (2000). Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation.* **69(2)**:272-280.
- Lewis DF (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics.* **5(3)**:305-318.
- Li J, Liu Y, Zhang JW, Wei H, Yang L (2006). Characterization of hepatic drug-metabolising activities of Bama miniature pigs (*Sus scrofa domestica*): comparison with human enzyme analogs. *Comp Med.* **56(4)**:286-290.

- Lieber CS (1999). Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res.* **23(6)**:991-1007.
- Lieber CS (2004). The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev.* **36(3-4)**:511-529.
- Lin JH, Lu AY (2001). Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **41**:535-567.
- Liu J, Ericksen SS, Sivaneri M, Besspiata D, Fisher CW, Szklarz GD (2004). The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. *Arch Biochem Biophys.* **424(1)**:33-43.
- Lotsch J, Skarke C, Tegeder I, Geisslinger G (2002). Drug interactions with patient-controlled analgesia. *Clin Pharmacokinet.* **41(1)**:31-57.
- Lu C, Li AP (2001). Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact.* **134**:271-281.
- Lu P, Singh SB, Carr BA, Fang Y, Xiang CD, Rushmore TH, Rodrigues AD, Shou M (2005). Selective inhibition of dog hepatic CYP2B11 and CYP3A12. *J Pharmacol Exp Ther.* **313(2)**:518-528.
- Lundblad MS, Stark K, Eliasson E, Oliw E, Rane A (2005). Biosynthesis of epoxyeicosatrienoic acids varies between polymorphic CYP2C enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* **327(4)**:1052-1057.
- Mannel M (2004). Drug interactions with St John's wort : mechanisms and clinical implications. *Drug Saf.* **27(11)**:773-797.
- Martin JH, Begg EJ, Kennedy MA, Roberts R, Barclay ML (2001). Is cytochrome P450 2C9 genotype associated with NSAID gastric ulceration? *Br J Clin Pharmacol.* **51(6)**:627-630.
- Martínková J, Chládek J, Mičuda S, Cermanová J, Grim J: Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické, Hradec Králové (2000), str. 26
- Matal J, Jancova P, Siller M, Masek V, Anzenbacherova E, Anzenbacher P (2008). Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. *Neuro Endocrinol Lett.* **29(5)**:738-743.
- Matal J, Tunková A, Šiller M, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009a). Isolation of two cytochrome P450 forms, CYP2A19 and CYP1A, from pig liver microsomes. *J Vet Pharmacol Therap.* **32(5)**:470 - 476.
- Matal J, Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009b). Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole

biotransformation in the reconstituted system. *Neuro Endocrinol Lett.* publikace přijata do tisku.

Messina A, Chirulli V, Gervasi PG, Longo V (2008). Purification, molecular cloning, heterologous expression and characterization of pig CYP1A2. *Xenobiotica*. **38(12)**:1453-1470.

Mitsuda M, Iwasaki M, Asahi S (2006). Cynomolgus monkey cytochrome P450 2C43: cDNA cloning, heterologous expression, purification and characterization. *J Biochem*. **139(5)**:865-872.

Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Nemoto N, Sato K, Ariyoshi N, Kamataki T (1999). CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. **261**:658-660.

Monshouwer M, van't Klooster GAE, Nijmeijer SM, Witkamp RF, van Miert ASJPAM (1998). Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. **12(6)**:715-723.

Münzel PA, Schmohl S, Heel H, Kälberer K, Bock-Hennig BS, Bock KW (1999). Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*. **27(5)**:569-573.

Myers MJ, Farrell DE, Howard KD, Kawalek JC (2001). Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. *Drug Metab Dispos*. **29(6)**:908-915.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. **6(1)**:1-42.

Nguyen LP, Bradfield CA (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*. **21(1)**:102-116.

Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT (2003). Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. **42**:819-850.

Nissen PH, Winterø AK, Fredholm M (1998). Mapping of porcine genes belonging to two different cytochrome P450 subfamilies. *Anim Genet*. **29(1)**:7-11.

Parkinson A: Toxicology (Cassaret & Doull's Toxicology, the basic science of poisons, 5th Edition, Klaassen CD, Ed.). McGraw-Hill, New York (1996), kap.6, str. 133-216.

Omura T, Sato R (1964).the carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. **239**:2370-2378.

- Patterson LH, Murray GI (2002). Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des.* **8(15)**:1335-1347.
- Pávek P, Dvořák Z (2008). Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolising enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* **9(2)**:129-143.
- Pearce R, Greenway D, Parkinson A (1992). Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys.* **298(1)**:211-225.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol.* **82(10)**:667-715.
- Philips IR, Shephard EA (Eds.) (1998). Cytochrome P450 Protocols, Methods in Molecular Biology. 107
- Poncelet AJ, Denis D, Gianello P (2009). Cellular xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* **14(2)**:168-174.
- Raunio H, Pasanen M, Mäenpää J, Hakkola J, Pelkonen O: Advances in drug metabolism in man (Pacifci GM, Fracchia GN, Ed.). EC Publication, Luxembourg (1995), kap. 8, 234-287.
- Raunio H, Rautio A, Gullstén H, Pelkonen O (2001). Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.* **52(4)**:357-363.
- Regmi NL, Abd El-Aty AM, Kuroha M, Nakamura M, Shimoda M (2005). Inhibitory effect of several fluoroquinolones on hepatic microsomal cytochrome P-450 1A activities in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* **28(6)**:553-557.
- Rendic S, Di Carlo FJ (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* **29**:413-580.
- Robson SC, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH (1995). Role of endothelial cells in transplantation. *Int Arch Allergy Immunol.* **106(4)**:305-322.
- Rodriguez-Antona C, Sayi JG, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. (2005). Phenotype-genotype variability in the human CYP3A locus as assessed by the probe drug quinine and analyses of variant CYP3A4 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**:299–305.
- Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Günthard HF, Schwab M, Eichelbaum M, Telenti A, Zanger UM (2007). Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther.* **81(4)**:557-566.

- Roussel F, Duignan DB, Lawton MP, Obach RS, Strick CA, Tweedie DJ (1998). Expression and characterization of canine cytochrome P450 2D15. *Arch Biochem Biophys.* **357**:27–36.
- Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G, Moscioni AD, Hakim R, Demetriou AA (1993). Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology.* **17**(2):258-265.
- Ryan DE, Thomas PE, Levin W (1980). Hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with isosafrole. Purification and characterization of four enzymic forms. *J Biol Chem.* **255**(16):7941-7955.
- Sakai N, Saito K, Kim HS, Kazusaka A, Ishizuka M, Funae Y, Fujita S (2005). Importance of CYP2D3 in polymorphism of diazepam p-hydroxylation in rats. *Drug Metab Dispos.* **33**(11):1657-1660.
- Sakuma T, Igarashi T, Hieda M, Ohgiya S, Isogai M, Ninomiya S, Nagata R, Nemoto N, Kamataki T (1997). Marmoset CYP1A2: primary structure and constitutive expression in livers. *Carcinogenesis.* **18**(10):1985-1991.
- Sakuma T, Hieda M, Igarashi T, Ohgiya S, Nagata R, Nemoto N, Kamataki T (1998). Molecular cloning and functional analysis of cynomolgus monkey CYP1A2. *Biochem Pharmacol.* **56**:131-139.
- Sakuma T, Shimojima T, Miwa K, Kamataki T (2004). Cloning CYP2D21 and CYP3A22 cDNAs from liver of miniature pigs. *Drug Metab Dispos.* **32**(4):376-378.
- Sandberg M, Johansson I, Christensen M, Rane A, Eliasson E (2004). The impact of CYP2C9 genetics and oral contraceptives on cytochrome P450 2C9 phenotype. *Drug Metab Dispos.* **32**:484–489.
- Sanderson S, Emery J, Higgins J (2005). CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Genet Med.* **7**(2):97-104.
- Scordo MG, Aklillu E, Yasar U, Dahl ML, Spina E, Ingelman-Sundberg M (2001). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol.* **52**(4):447-450.
- Sellers EM, Kaplan HL, Romach MK, Tyndale RF (2000). Inhibition of CYP2A6 decreases smoking. *Clin Pharmacol Ther.* **63**:153.
- Shang H, Yang J, Liu Y, Wei H (2009). Tissue distribution of CYP3A29 mRNA expression in Bama miniature pig by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Xenobiotica.* **39**(6):423-429

- Shaukat A, Benekli M, Vladutiu GD, Slack JL, Wetzler M, Baer MR (2003). Simvastatin-fluconazole causing rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother.* **37(7-8)**:1032-1035.
- Shou M, Norcross R, Sandig G, Lu P, Li Y, Lin Y, Mei Q, Rodrigues AD, Rushmore TH (2003). Substrate specificity and kinetic properties of seven heterologously expressed dog cytochromes P450. *Drug Metab Dispos.* **31(9)**:1161-1169.
- Schwarz UI (2003). Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J Clin Investig.* **33(Suppl 2)**, 23–30.
- Skaanild MT, Friis C (1997). Characterization of the P450 system in Göttingen minipigs. *Pharmacol Toxicol.* **80 Suppl 2**:28-33.
- Skaanild MT, Friis C (2002). Is cytochrome P450 CYP2D activity present in pig liver? *Pharmacol Toxicol.* **91(4)**:198-203.
- Skaanild MT, Friis C (2005). Porcine CYP2A polymorphisms and activity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **97(2)**:115-121.
- Skaanild MT, Friis C (2007). Is bupropion a more specific substrate for porcine CYP2E than chlorzoxazone and p-nitrophenol? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **101(3)**:159-162.
- Skaanild MT, Friis C (2008). Analyses of CYP2C in porcine microsomes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **103(5)**:487-492.
- Skopalík J, Anzenbacher P, Otyepka M (2008). Flexibility of human cytochromes P450: molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences. *J Phys Chem B.* **112(27)**:8165-8173.
- Skordos KW, Laycock JD, Yost GS (1998). Thioether adducts of a new imine reactive intermediate of the pneumotoxin 3-methylindole. *Chem Res Toxicol.* **11(11)**:1326-1331.
- Sladek NE, Mannering GJ (1966). Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **22(5)**:668-674.
- Slattery JT, Nelson SD, Thummel KE (1996). The complex interaction between ethanol and acetaminophen. *Clin Pharmacol Ther.* **60(3)**:241-246.
- Smith DA, Ackland MJ, Jones BC (1997): Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates. 2. Properties of cytochrome P450 substrates. *Drug Discovery Today.* **2**:479-486.

- Smith GB, Bend JR, Bedard LL, Reid KR, Petsikas D, Massey TE (2003). Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in peripheral human lung microsomes. *Drug Metab Dispos.* **31(9)**:1134-1141.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**:76-85.
- Soars MG, McGinnity DF, Grime K, Riley RJ (2007). The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Chem Biol Interact.* **168(1)**:2-15.
- Song BJ: Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) (1996): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin Exp Res.* **20**: 138A-146A.
- Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M (1997). Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin Pharmacol Ther.* **61(3)**:331-339.
- Souček P (1999). Expression of cytochrome P450 2A6 in *Escherichia coli*: purification, spectral and catalytic characterization, and preparation of polyclonal antibodies. *Arch Biochem Biophys.* **370(2)**:190-200.
- Souček P, Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Guengerich FP (2001). Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacology.* **1**:11.
- Spiecker M, Liao J (2006). Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 and the risk of coronary artery disease. *Trends Cardiovasc Med.* **16(6)**:204-208.
- Stamer UM, Stüber F (2007). Genetic factors in pain and its treatment. *Curr Opin Anaesthesiol.* **20(5)**:478-484.
- Stange J, Hassanein TI, Mehta R, Mitzner SR, Bartlett RH (2002). The molecular adsorbents recycling system as a liver support system based on albumin dialysis: a summary of preclinical investigations, prospective, randomized, controlled clinical trial, and clinical experience from 19 centers. *Artif Organs.* **26(2)**:103-110.
- Stange J, Mitzner S, Ramlow W, Gliesche T, Hickstein H, Schmidt R (1993). A new procedure for the removal of protein bound drugs and toxins. *ASAIO J.* **39(3)**:M621-625.
- Steimer W, Zopf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J (2005). Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem.* **51**:376-385.
- Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ (2003). Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* **307**:573-582.

Stoilov I, Jansson I, Sarfarazi M, Schenkman JB (2001). Roles of cytochrome p450 in development. *Drug Metabol Drug Interact.* **18(1)**:33-55.

Strain AJ, Neuberger JM (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science.* **295(5557)**:1005-1009.

Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisennand HH, Kelly JH (1992). Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology.* **16(1)**:60-65.

Szotáková B, Baliharová V, Lamka J, Nozinová E, Wsól V, Velík J, Machala M, Neca J, Souček P, Susová S, Skálová L (2004). Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Res Vet Sci.* **76(1)**:43-51.

Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H (1998). Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics.* **8(5)**:365-373.

Tenmizu D, Endo Y, Noguchi K, Kamimura H (2004). Identification of the novel canine CYP1A2 1117 C > T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica.* **34**:835–846.

Tenmizu D, Noguchi K, Kamimura H, Ohtani H, Sawada Y (2006). The canine CYP1A2 deficiency polymorphism dramatically affects the pharmacokinetics of YM-64227, a phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Drug Metab Dispos.* **34**:800–806.

Terner MA, Gilmore WJ, Lou Y, Squires EJ (2006). The role of CYP2A and CYP2E1 in metabolism of 3-methylindole in primary cultured porcine hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **34(5)**:848-854.

Thijssen HH, Ritzen B. (2003). Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther.* **74**:61–68.

Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ and Yost GS (1996). Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *J Pharmacol Exp Ther.* **276**:21–29.

Thuerauf N, Lunkenheimer J (2006). The impact of the CYP2D6-polymorphism on dose recommendations for current antidepressants. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* **256(5)**:287-293.

Tukey RH, Okino S, Barnes H, Griffin KJ, Johnson EF (1985). Multiple gene-like sequences related to the rabbit hepatic progesterone 21-hydroxylase cytochrome P-450 1. *J Biol Chem.* **260(24)**:13347-13354.

- Tukey RH, Strassburg CP (2000). Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:581-616.
- Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O (2006). The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr Drug Metab.* **7**(7):705-714.
- Turton-Weeks SM, Barone GW, Gurley BJ, Ketel BL, Lightfoot ML, Abul-Ezz SR (2001). St John's wort: a hidden risk for transplant patients. *Prog Transplant.* **11**(2):116-120.
- Uno Y, Fujino H, Kito G, Kamataki T, Nagata R (2006). CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolising tolbutamide and testosterone. *Mol Pharmacol.* **70**(2):477-486.
- Uno Y, Hosaka S, Matsuno K, Nakamura C, Kito G, Kamataki T, Nagata R (2007). Characterization of cynomolgus monkey cytochrome P450 (CYP) cDNAs: is CYP2C76 the only monkey-specific CYP gene responsible for species differences in drug metabolism? *Arch Biochem Biophys.* **466**(1):98-105.
- Upadhyay UD, Holbrook EH (2004). Olfactory loss as a result of toxic exposure. *Otolaryngol Clin North Am.* **37**(6):1185-1207.
- Vassallo JD, Hicks SM, Daston GP, Lehman-McKeeman LD (2004). Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* **80**(2):249-257.
- Villeneuve JP, Pichette V (2004). Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab.* **5**(3):273-282.
- Vonkeman HE, van de Laar MA, van der Palen J, Brouwers JR, Vermes I (2006). Allele variants of the cytochrome P450 2C9 genotype in white subjects from The Netherlands with serious gastroduodenal ulcers attributable to the use of NSAIDs. *Clin Ther.* **28**(10):1670-1676.
- Walsky RL, Obach RS (2004). Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos.* **32**(6):647-660.
- Wang J, Sonnerborg A, Rane A, Josephson F, Lundgren S, Stahle L (2006). Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. *Pharmacogenet Genomics.* **16**:191-198.
- Waxman DJ, Chang TK (1998). Spectrofluorimetric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. V Cytochrome P450 Protocols. Phillips IR, Shephard EA (Eds) 111-116. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Wei C, Caccavale RJ, Weyand EH, Chen S, Iba MM (2002). Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer Lett.* **178**(1):25-36.

- Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, Zech K, Ingelman-Sundberg M, von Richter O (2006). Identification and characterization of CYP3A4*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther.* **79(4)**:339-349.
- White KA, Marletta MA (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry.* **31(29)**:6627-6631.
- Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM (2001). Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **4**:815–850.
- Yamamoto Y, Ishizuka M, Takada A, Fujita S (1998). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel rabbit cytochrome P450 isozymes, CYP2D23 and CYP2D24. *J Biochem.* **124(3)**:503-508.
- Yamazaki H, Guo Z, Guengerich FP (1995). Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Drug Metab Dispos.* **23**:438-440.
- Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ (2001). Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J Nutr.* **131(Supplement 3)**:1041-1045.
- Yokoyama MT, Carlson JR (1979). Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. *Am J Clin Nutr.* **32(1)**:173-178.
- Zamaratskaia G, Zlabek V (2009). EROD and MROD as markers of cytochrome P450 1A activities in hepatic microsomes from entire and castrated male pigs. *Sensors.* **9(3)**: 2134-2147.
- Zamaratskaia G, Zlabek V, Chen G, Madej A (2009). Modulation of porcine cytochrome P450 enzyme activities by surgical castration and immunocastration. *Animal.* **3(8)**:1124-1132.
- Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2002). Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* **6(2)**:189-198.

8 Seznam zkratek

3MI	skatol
3MOI	3-methyloxindol
4-MU	4- methylumbelliferon
AhR	receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (arylhydrocarbon receptor)
BAL	bioarteficiální jaterní náhrady
BHT	butylhydroxytoluen
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CYP	cytochrom P450
CYPOR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
DEDC	diethyldithiokarbamát
DLPC	L- α -dilauroylfosfatidylcholin
EM	extenzivní metabolisátor
ER	endoplazmatické retikulum
EROD	<i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu
ETRR	7-ethoxyresorufin
GR	glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor)
HA	hydroxylapatit
I3C	indol-3-karbinol
IDH	isocitrát dehydrogenasa
IM	intermediární metabolisátor
MDR	mnohočetná léková rezistence (multi-drug resistance)
MERR	7-methoxyresorufin
MROD	<i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufinu
Ms	mikrosomy
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
p-NP	p-nitrofenol
NSPZL	nesteroidní protizánětlivá léčiva
OcA	oktyl-agaróza 4B
PAD	perorální antidiabetika
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PM	pomalý metabolisátor

PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PXR	pregnanový X receptor
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SRS	místa určující substrátovou specificitu (substrate recognition sites)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
UDP-GA	uridin difosfátglukuronová kyselina
UGT	UDP- glukuronosyltransferasy
UM	ultrarychlý metabolisátor
VKORC1	komplex vitamin K epoxid reduktázy 1

9 Publikované práce

9.1 Publikace v odborných časopisech s IF

Matal J, Orság J, Nekvindová J, Anzenbacherová E, Veinlichová A, Anzenbacher P, Zídek Z, Holý A (2006). Experimental approaches to studies on drug metabolism and drug interactions in man: interaction of acyclic nucleoside phosphonates with human liver cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenase 3. *Neuro Endocrinol Lett.* **27 (Suppl 2)**:27-30. IF - 0,924

Matal J, Jančová P, Šiller M, Mašek V, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2008). Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. *Neuro Endocrinol Lett.* **29(5)**:738-743. IF – 1,359

Matal J, Tunková A, Šiller M, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009). Isolation of two cytochrome P450 forms, CYP2A19 and CYP1A, from pig liver microsomes. *J Vet Pharmacol Therap.* **32(5)**:470 - 476. IF – 1,581

Matal J, Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009). Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. *Neuro Endocrinol Lett.* publikace přijata do tisku. IF – 1,359

9.2 Publikace v časopisech bez IF

Matal J, Anzenbacherová E, Veinlichová A, Nobilis M, Anzenbacher P (2007). Interactions of nabumetone with cytochromes P450 *in vitro*: comparison of the man and pig. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007. **151(Supp 1)**:53-54.

9.3 Přehledné články

Matal J, Anzenbacher P, Opavský J (2009) Možné interakce analgetik na úrovni jaterních mikrosomálních cytochromů P450. *Bolest.* publikace přijata do tisku.

9.4 Příspěvky na konferencích

2006

Matal J, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2006). Experimental Models of Metabolism and Toxicity in Man - a Comparison. 11th Interdisciplinary Slovak – Czech Toxicology Conference. Book of Abstracts p 44.

Anzenbacherová E, Anzenbacher P, **Matal J**, Řehulka P, Chmelík J (2006). Quantitative Proteomics; Applications in Biology and Medicine. Proteomics Meetinf PigNet – Cost Action 861. poster

2007

Matal J, Řehulka P, Řehulková H, Chmelík P, Allmeier G, Anzenbacherová A, Anzenbacher P (2007) Proteomic study of pig liver microsomes. XXIV Xenobiochemické Sympóziium. Book of Abstracts p 45

2008

Matal J, Jančová P, Anzenbacherová P, Anzenbacher P (2008) Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. 13th Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2008. Interdisciplinary Toxicology. (1), p 96-97.

Jančová P, **Matal J**, Anzenbacherová E, Dvořák Z, Kosina P, Anzenbacher P, Šimánek V (2008). Contribution of phase II enzymes to metabolism of silybin. 13th Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2008. Interdisciplinary Toxicology. (1), p 75.

Matal J, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2008). Comparison of activity of UGT1A6 in the man, rat, pig, monkey and dog. Seminář výzkumného záměru MŠM 6198959216. Sborník abstraktů přednášek Karlov p, Pradědem 22-24.5.2008 p.19

Anzenbacherová E, Souček P, **Matal J**, Anzenbacher P (2008). Pigs or Minipigs as Experimental Models in Studies of Drug Liver Metabolism in Humans. Pig Genome II, Second European Conference on Pig Genomics. Abstract Book p 22.

Anzenbacher P, **Matal J**, Šiller M, Veinlichová A, Anzenbacherová E (2008). Cytochromes P450 and Drug Metabolism in the (Mini)pig – Comparison with Human. 9th International Symposium in Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology. Book of Abstracts p 59.

2009

Matal J, Matušková Z, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009). Porcine CYP2A19 and CYP2E1 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. TOXCON 2009. Interdisciplinary Toxicology. 2(2), p. 124.