

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2014

Bc. Lucie Jirásková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role optické isomerie zopiklonu v jeho interakcích s
lidskými jaterními cytochromy P450**

Diplomová práce

Bc. Lucie Jirásková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Michal Šiller, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně s pomocí vedoucího práce a za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Lucie Jirásková

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Michalu Šillerovi, Ph.D. za odborné vedení a předání cenných rad a zkušeností, jak při praktických experimentech, tak při zpracování teoretické části. Děkuji za trpělivost a čas, který mě ochotně věnoval a za vytvoření přátelské atmosféry při výkonu mé diplomové práce.

Děkuji pracovníkům Katedry buněčné biologie a genetiky pod vedením prof. RNDr. Zdeňka Dvořáka, DrSc. et Ph.D. za poskytnutí chemické látky zopiklonu, pro s prací spojené experimenty.

Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu molekulární a translační medicíny, že mi umožnili vypracovat diplomovou práci na svém pracovišti.

Souhrn

Velké množství léčiv se průmyslově vyrábí ve formě racemických směsí, tedy směsí dvou enantiomerů daného léčiva v poměru 1:1. Racemát obsahující oba dva optické isomery má však často odlišné vlastnosti od čistých enantiomerů daného léčiva, které se mohou lišit ve svém farmakologickém profilu, ať jde o interakci s cílovými strukturami v organismu či například o interakci s enzymy účastnicími se jejich metabolismu. V poslední době se však některá z těchto léčiv znovu uvádí na trh v podobě jediného enantiomeru, který zpravidla představuje tu farmakologicky účinnější složku racemické směsi léčiva.

Tato diplomová práce se nejprve zabývá teoretickými aspekty biotransformace neboli metabolismu xenobiotik, který významně ovlivňuje intenzitu účinku a dobu působení podaného léčiva.

Následující kapitola je věnovaná cytochromům P450, enzymům hrající nejdůležitější roli v oxidativním metabolismu klinicky používaných léčiv, ale i mnoha dalších látek exogenního původu.

V další části práce je zmíněna problematika mezilékových interakcí především na úrovni metabolismu léčiv. Mezilékové interakce způsobené především inhibicí biotransformačních enzymů mohou vést k vyvolání závažných nežádoucích účinků léčiv a jsou každý rok odpovědné za úmrtí mnoha pacientů. Proto je hlavním cílem vědeckých laboratoří predikovat klinický význam mezilékových interakcí pomocí *in vitro* screeningových testů a vyřadit tak nová léčiva s vysokým potenciálem k lékovým interakcím již v průběhu jejich vývoje.

Následuje část, která se věnuje stereochemii chemických látek a její roli ve formování farmakologických vlastností léčiva se zaměřením na hypnotikum zopiklon. U tohoto léčiva se v minulosti zjistilo, že farmakologickou aktivitou disponuje pouze S- enantiomer.

V poslední kapitole teoretické části je stručně popsán princip HPLC metody, což je běžná analytická metoda vhodná pro separaci nízkomolekulárních látek, tedy i léčiv, která byla využita v experimentální části této diplomové práce. Cílem experimentální části bylo, podrobněji testovat interakce zopiklonu a jeho čistých enantiomerů s lidskými jaterními cytochromy P450, které se podílejí na metabolismu převážné většiny všech předepisovaných léčiv. Důraz byl kladen především na zjištění inhibičního účinku zopiklonu na enzymovou aktivitu cytochromů P450.

Summary

Many of drugs have been industrially produced as racemic mixtures, containing two enantiomers in the ratio 1:1. The drug racemate possesses different properties in comparison to its pure enantiomers. Their pharmacological properties, such as interaction with target structure in the body or interaction with enzymes participating in their metabolism, can significantly differ. Recently, several of those drugs have been newly distributed in the form of their single enantiomer (S- or R- form), which play the most important role in pharmacological acting of the drug. In first part this thesis deals, in general, with metabolism of xenobiotics, which significantly influences the intensity and duration of pharmacological effect of the administered drugs.

Then following chapter sums up basic facts about cytochromes P450 - enzymes playing important role in the oxidative metabolism of majority of clinically used drugs and xenobiotics.

Another part of this work depicts the topic of drug-drug interactions based on drug metabolism. Drug-drug interactions caused primarily by the inhibition of biotransformation enzymes can cause serious unwanted effects and are responsible for fatal accidents per each year. Therefore, the main objective of research pharmacological laboratories and pharma industry is to predict the clinical significance of potential drug-drug interactions of experimental drugs using in vitro screening assays and exclude new drug candidate with a high potential for drug drug interactions before their implementation for the further testing.

The following section discusses a role of drug stereochemistry in pharmacological properties of drug with focus on a hypnotic drug - zopiclone. It has been shown, that S-enantiomer of zopiclone exerted more profound pharmacological effect in comparison to R-form.

In last chapter of the theoretical part, HPLC separation technique used in experimental part of this work is briefly described.

The aim of presented study was to thoroughly test interactions of zopiclone and its pure stereoisomers with human drug metabolising cytochromes P450, which play important role in metabolism of many clinically prescribed drugs. The main interest was put on the evaluation of inhibitory effect of zopiclone on the enzymatic activity of cytochromes P450.

Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo seznámení se s problematikou metabolismu léčiv na úrovni cytochromů P450 (CYP) a z něj plynoucích potenciálních lékových interakcí se zaměřením na hypnotikum - zopiklon.

Úkolem experimentální části bylo sledování inhibičního vlivu zopiklonu a jeho čistých optických isomerů na enzymovou aktivitu CYP v lidských jaterních mikrosomech účastnících se metabolismu léčiv.

V rámci vypracování experimentální části jsem měla možnost osvojit si princip separační metody HPLC, což mi umožnilo splnit předpokládaný cíl práce.

Obsah

ÚVOD.....	10
1. BIOTRANSFORMACE	11
2. CYTOCHROMY P450.....	12
3. MEZILÉKOVÉ INTERAKCE.....	18
3.1 Regulace enzymové aktivity	19
3.1.1 Indukce metabolismu	20
3.1.2 Inhibice metabolismu	21
4. STEREOCHEMIE.....	25
4.1 Zopiklon.....	26
4.1.1 S-zopiklon	28
5. CHROMATOGRAFIE.....	29
5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	29
5.1.1 Využití HPLC při stanovení aktivity cytochromů P450	32
6. LABORATORNÍ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	33
6.1 Biologický materiál.....	33
6.2 Chemikálie	33
6.3 Laboratorní pomůcky.....	34
7. LABORATORNÍ PŘÍSTROJE	35
8. POUŽITÉ METODY	36
8.1 Sledování inhibičního vlivu zopiklonu na aktivitu CYP <i>in vitro</i>	36
8.2 Určení mechanismu inhibičního účinku zopiklonu na aktivitu CYP <i>in vitro</i> (Time dependent inhibice).....	46
9. VÝSLEDKY.....	48
9.1 Interakce testované látky s lidskými jaterními mikrosomálními CYP	48
9.1.1 <i>In vitro</i> inhibice markerové aktivity CYP zopiklonem v mikrosomální frakci lidských jater	48

9.1.2 Mechanismus inhibice enzymové aktivity CYP stereoisomery zopiklonu pomocí Single Point Assaye	53
10. DISKUZE	56
11. ZÁVĚR.....	59
12. LITERATURA	60
13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66

ÚVOD

Zopiklon patří do skupiny léčiv, která se nazývá hypnotika III. generace. Díky centru chiralitity se zopiklon vyskytuje ve dvou enantiomerních formách - S a R. V minulosti bylo toto léčivo komerčně dostupné pouze ve formě racemické směsi, avšak hypnotické účinky byly prokázány pouze u S formy. Tento fakt přiměl v nedávné době farmaceutické firmy k produkci zopiklonu obsahující pouze jeho S isomer. Do klinické praxe byl S-zopiklon uveden jako léčivo proti nespavosti poprvé v USA a je příkladem tzv. chirálního přesmyku.

V předchozích letech byl zájem farmakologů zejména soustředěn na to, jaká forma CYP je za metabolismus zopiklonu zodpovědná. Bylo zjištěno, že zopiklon je metabolizován především CYP3A4 a CYP2C8, významnými CYP, které se podílí na metabolismu mnoha léčiv, což může vést k výskytu nežádoucích mezilékových interakcí. Ve srovnání se studiem metabolismu zopiklonu, nebylo doposud věnováno dosti pozornosti možnému inhibičnímu účinku tohoto hypnotika na enzymové aktivity významných CYP účastnících se metabolismu léčiv. Bylo proto zajímavé zabývat se studiem inhibičních účinků jak racemátu, tak i čistých optických isomerů na některé z významných CYP metabolizujících léčiva. Jako experimentální model byly zvoleny lidské jaterní mikrosomy obsahující dané formy CYP.

1. BIOTRANSFORMACE

Všechny živé soustavy se skládají z velkého množství látek, které dělíme na „látky tělu vlastní“ neboli eobiotika a na „látky cizího původu“ tzv. xenobiotika. Mezi xenobiotika patří léčiva, environmentální polutanty, průmyslové chemikálie, drogy a další látky. S těmito cizorodými látkami se organismus musí neustále potýkat a snaží se je prostřednictvím několika procesů vyloučit z těla ven. Součástí těchto procesů je i metabolismus, který probíhá nejčastěji v játrech, kde se nachází nejvíce biotransformačních enzymů zodpovědných za přeměnu cizorodých látek, dále pak v ledvinách, plicích, placentě či například ve střevě (Ferenčík *et al*, 2000). Většina cizorodých látek je nepolární povahy, proto je cílem těchto enzymů převést parentní látky na jejich polární metabolity, které jsou snadněji vylučovány z těla ven stolicí a močí (Fukasawa *et al*, 2007).

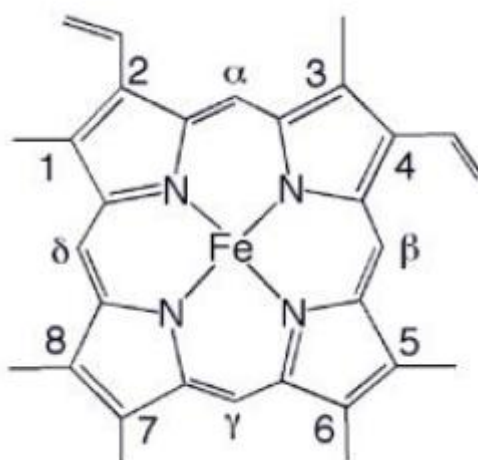
Metabolismus léčiv je třífázový proces, při kterém dochází k polarizaci xenobiotika. Tento proces je zahajován importem xenobiotika do buňky. Následuje fáze I., ve které dochází k oxidoredukčním a hydrolytickým reakcím, což má za výsledek odhalení nebo vnesení polární funkční skupiny do molekuly parentní látky (-OH, -COOH, -SH, či -NH₂ skupina). Jestliže je metabolit I. fáze dostatečně polární může být snadno vyloučen ledvinami. Pokud jsou však produkty I. fáze stále málo polární, vstupují do fáze II. Fáze II. je fází konjugační. V této fázi dochází ke zvýšení polarizace xenobiotik spojením s endogenní vysoce polární skupinou, jejímž donorem je tzv. konjugační činidlo, například kyselina glukuronová, octová nebo kyselina sírová. Biotransformaci xenobiotik ukončuje fáze III., která zajišťuje export metabolitů z buňky pomocí mnoha transportérů (Dvořák *et Cvek*, 2011).

Metabolismus léčiv je ovlivňován řadou faktorů: věkem, pohlavím, genetickou dispozicí, kouřením cigaret, patologickým stavem (onemocnění jater či srdce), farmakodynamickými faktory, opakovaným podáním léku a současným podáním dvou i více léků (existence induktorů a inhibitorů mikrosomálních enzymů).

Biologická aktivita dané látky může být metabolickou přeměnou snížena, nezměněna nebo zvýšena. Zvýšení biologické aktivity může být terapeuticky pozitivní, pak hovoříme o aktivaci látky (prolék, prodrug), i negativní, např. vznik toxického metabolitu.

2. CYTOCHROMY P450

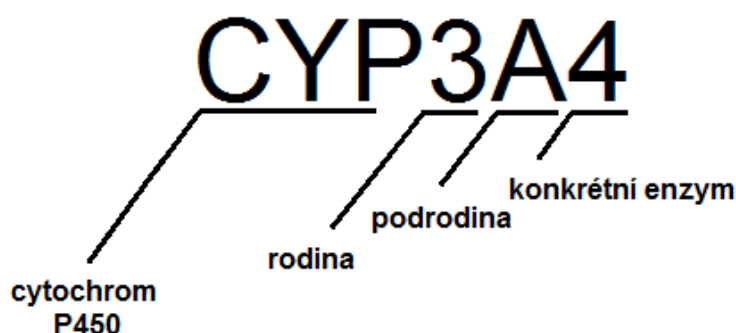
Cytochromy P450 (CYP) tvoří rozsáhlou skupinu hemových enzymů, které obsahují hemovou prosthetickou skupinu (pevná integrální součást enzymu, Obr. 1) (Lewis *et Ito*, 2008). CYP hrají důležitou roli v oxidativním metabolismu celé řady klinicky používaných léčiv nebo jiných cizorodých látek (xenobiotik) (Martignoni *et al.*, 2006). Název cytochrom P450 vychází z faktu, že redukovaná forma enzymu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje atypické silné absorpční maximum v UV-VIS spektru při 450 nm. Běžně hemoproteiny v této oblasti absorbují při 420 nm (Klingenberg, 1958).



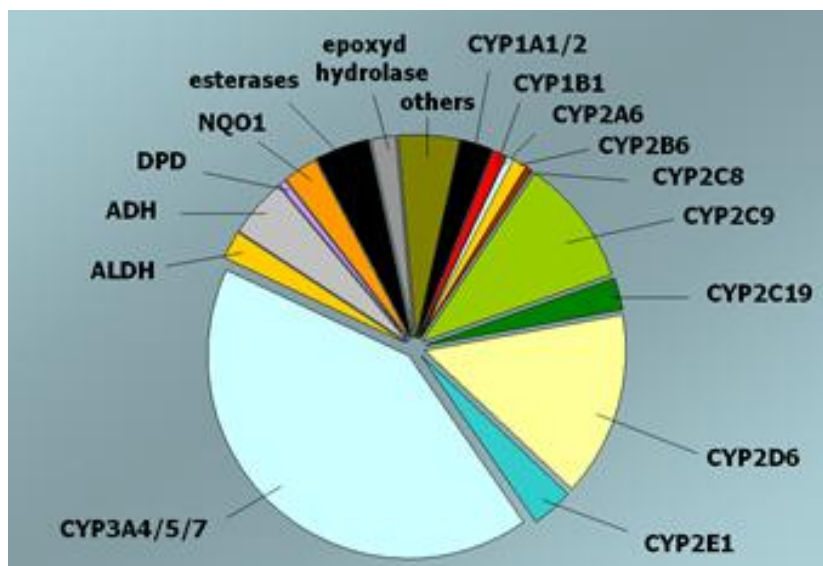
Obr. 1: Hemová prosthetická skupina (Bowman *et Bren*, 2008)

Cytochromy P450 byly objeveny M. Klingenbergem v roce 1958. Prapůvodní gen společný pro rostlinnou i živočišnou říši se zde vyskytoval již před 1,5 miliardami let. Z fylogenetického hlediska se jedná o velmi starý systém enzymů, který během evoluce zaznamenal mnoho změn. Přibližný počet známých CYP je kolem 1200. CYP byly nalezeny ve všech říších životních forem tj. u archeí, bakterií, hub, rostlin a živočichů včetně člověka. Počet CYP u člověka je kolem 60, rostliny mají zhruba 300 různých cytochromů P450. Rostliny potřebují své CYP pro syntézu pigmentu, růstových regulátorů a pro syntézu obranných toxinů. Lidské CYP jsou zapojeny také v biosyntéze řady biologicky aktivních látek (Anzenbacher *et Anzenbacherová*, 2001).

Velký počet objevených genů pro cytochromy P450 si vyžádal v roce 1996 jednotnou nomenklaturu, založenou na shodě sekvencí aminokyselin v proteinovém řetězci jednotlivých forem (Nelson *et al*, 2009). Nadrodina cytochromů P450 se dělí na rodiny, které mají 40% shodu sekvencí v primární struktuře, podrodiny (55% shoda) a na konkrétní enzymy, které jsou doplněny arabskými číslicemi, které charakterizují různé funkce enzymů (Fukasawa *et al*, 2007). V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé formy CYP, které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin.

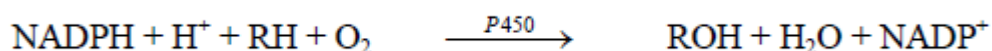


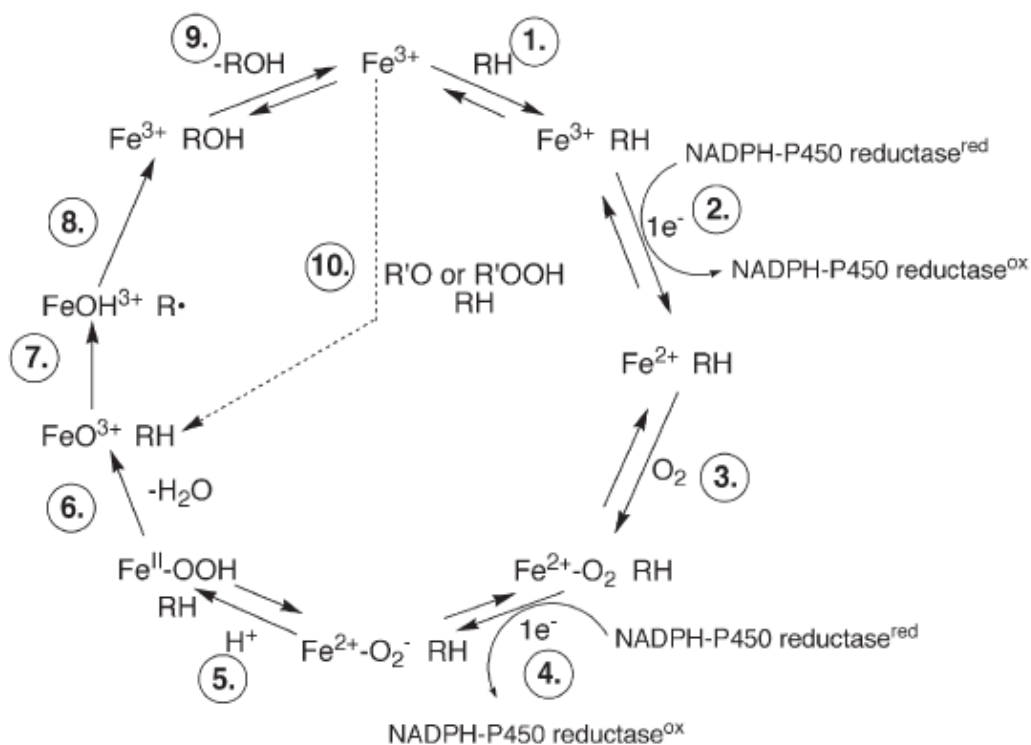
Jednotlivé CYP se liší kromě struktury také v substrátové, reakční a tkáňové specifitě, v buněčné lokalizaci a ve způsobu jejich regulace. CYP podílející se na metabolismu léčiv a jiných xenobiotik jsou lokalizovány v buňkách v membránách endoplazmatického retikula. Nejvíce se vyskytují v játrech (kvantitativní zastoupení jednotlivých forem CYP v játrech je znázorněno na Obr. 2), dále pak méně v dalších tkáních např. v plicích, srdci, mozku a placentě (Pávek *et Dvořák*, 2008).



Obr. 2: Kvantitativní zastoupení jednotlivých forem CYP v játrech
(Převzato <http://www.drug-interactions.eu>, 7.2. 2014)

Cytochromy P450 patří mezi nejdůležitější enzymy I. fáze biotransformace xenobiotik. CYP jsou tzv. oxidasy se smíšenou funkcí, jinými slovy monooxygenasy (Dostálek, 2006). Monooxygenasy jsou obecně mikrosomální enzymy schopné vázat a aktivovat molekulu kyslíku, z níž jeden atom je vnášen do molekuly substrátu a druhý atom je redukován na vodu. Proto jsou častým typem reakcí, které CYP katalyzují, hydroxylace. Substrát RH se váže na oxidovanou formu cytochromu Fe^{3+} . Vzniká komplex $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}$, na který je redukcí $\text{NADPH} + \text{H}^+$ přenesen elektron. Takto vzniká redukovaný komplex $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}$, který váže molekulu kyslíku. Dále v cyklu dochází k zabudování kyslíku do substrátu a k regeneraci cytochromu P450 (Guengerich, 2002). Produkty cyklu jsou tedy oxidovaný substrát ROH a voda. Katalytický cyklus CYP je zobrazen na Obr. 3.

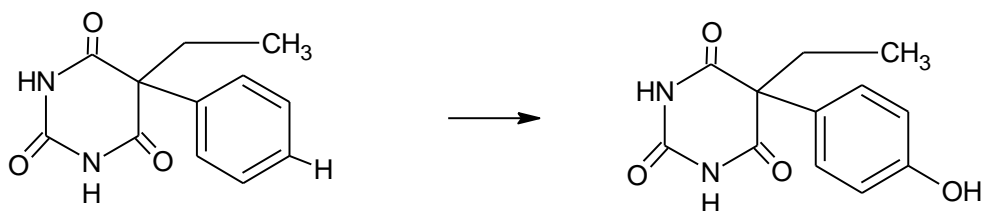




Obr. 3: Katalytický cyklus CYP (Isin *et* Guengerich, 2007)

Kromě hydroxylací jsou dalšími oxidačními reakcemi katalyzovanými cytochromy P450 *O*-dealkylace, *N*-dealkylace, sulfoxidace a deaminace (Guengerich *et* Macdonald, 1990). Příklady reakcí jsou zobrazeny na Obr. 4.

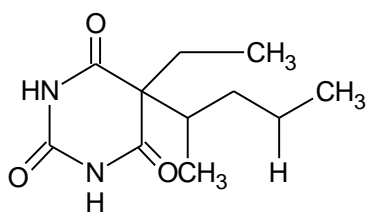
Aromatická hydroxylace



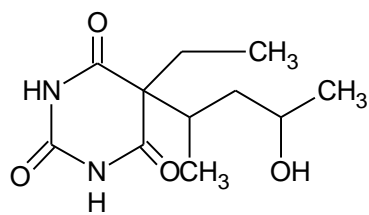
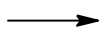
fenobarbital

p-hydroxyfenobarbital

Alifatická hydroxylace

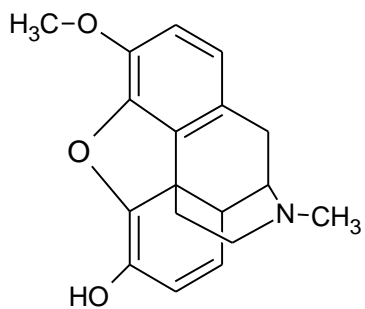


pentobarbital

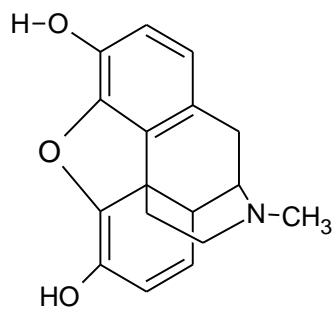
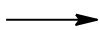


hydroxylovaný pentobarbital

O-dealkylace

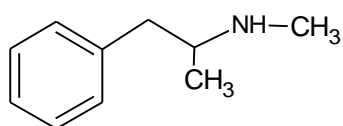


kodein

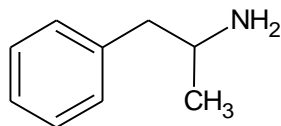
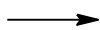


morfin

N-dealkylace

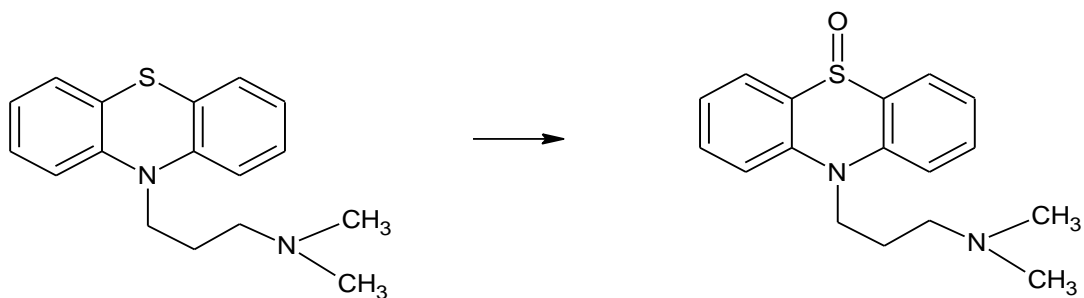


methamfetamin



amfetamin

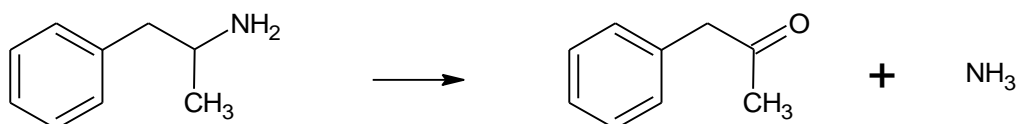
Sulfoxidace



chlorpromazin

chlorpromazin sulfoxid

Oxidační deaminace



amfetamin

fenylaceton

Obr. 4: Příklady oxidačních reakcí katalyzovaných cytochromy P450
(vytvořeno pomocí programu ChemSkech)

Nově vzniklé metabolity jsou často dále konjugovány s endogenními látkami, za vzniku vysoce polárních látek, které jsou zpravidla snadno eliminovány z těla ve stolici nebo v moči. CYP hrají významnou úlohu i v oxidativním metabolismu a biosyntéze endogenních molekul, jako jsou vitaminy, žlučové kyseliny a hormony.

3. MEZILÉKOVÉ INTERAKCE

O mezilékových interakcích mluvíme v případě, pokud účinnost či toxicita léčby je změněna podáním jiné sloučeniny. Účinnost léčiva však mohou změnit i jiná xenobiotika, například environmentální polutanty: cigaretový kouř, polycyklické uhlovodíky a některé potraviny jako je například brukvovitá zelenina, grepfruitový džus a přídatná barviva. Se zvyšujícím se množstvím současně užívaných léčiv se zvyšuje pravděpodobnost vzniku lékových interakcí. Z některých dříve publikovaných studií vyplývá, že mezilékové interakce jsou odpovědné za sto tisíc úmrtí každý rok (Lazarou *et al.*, 1998).

V posledních 20-30 letech se poznatky o metabolismu léčiv výrazně zvýšili a to díky využití *in vitro* a *in silico* modelů. Dostupnost lidských tkání a rekombinantních lidských CYP enzymů ve velké míře přispělo k vývoji *in vitro* screeningových metod pro odhad potenciálních *in vivo* lékových interakcí (Kremers, 2002). I přes to, že tyto modely mají stále drobné nedostatky a omezení, stávají se vysoce spolehlivými a jsou schopny určit typ, mechanismus a závažnost interakcí. Proto jsou tyto výhody využívány převážně v preklinické fázi testovaných nových léčiv. Farmaceutické laboratoře díky *in vitro* testům ušetří mnoho času, práce a v neposlední řadě i financí. Mezilékové interakce mohou způsobit závažné nežádoucí účinky, proto hlavním cílem *in vitro* screeningových testů je, s co největší přesností, předpovědět klinický význam mezilékových interakcí. Z hlediska ekonomického jde hlavně o to, eliminovat nová léčiva s vysokým potenciálem k lékovým interakcím již v průběhu jejich vývoje a zabránit tak, aby se tato léčiva dostala do všeobecného užívání (Kremers, 2002).

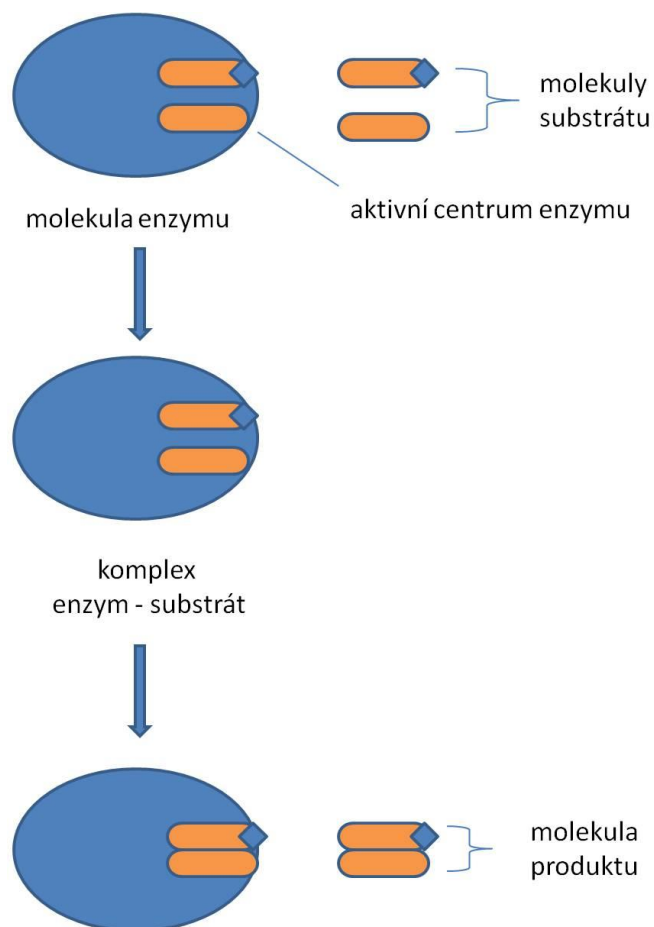
Porozumění a schopnost předvídat lékové interakce je nezbytnou součástí současné medicíny. Klinický význam některých lékových interakcí závisí na několika faktorech zahrnující stav pacienta, způsob podávání léčiv, životní prostředí, terapeutický index, či například načasování podávání dvou či více léků (Kremers, 2002).

Možné příčiny vzniku mezilékových interakcí

- Konkurence o gastrointestinální absorpci
- Farmakodynamické interakce na receptorové úrovni
- Interakce během membránového transportu
- Kompetice o vazbu na plazmatické proteiny
- Vázání na transportní proteiny a P glykoproteiny
- Indukce metabolismu
- Inhibice metabolismu
- Kompetice o aktivní ledvinovou exkreci

3.1 Regulace enzymové aktivity

Enzymy, někdy také nazývány jako biokatalyzátory, urychlují chemické přeměny v organismu. Enzymy zvyšují rychlost chemické reakce, ale neovlivňují její rovnováhu. Interakce enzymu se substrátem spočívá v jeho vazbě na postranní řetězce aminokyselin aktivního místa enzymu a tvoří tak komplex enzym-substrát (ES). Toto místo enzymu je komplementární tvaru substrátu a uplatňuje se zde pravidlo klíče a zámku (Obr. 5).

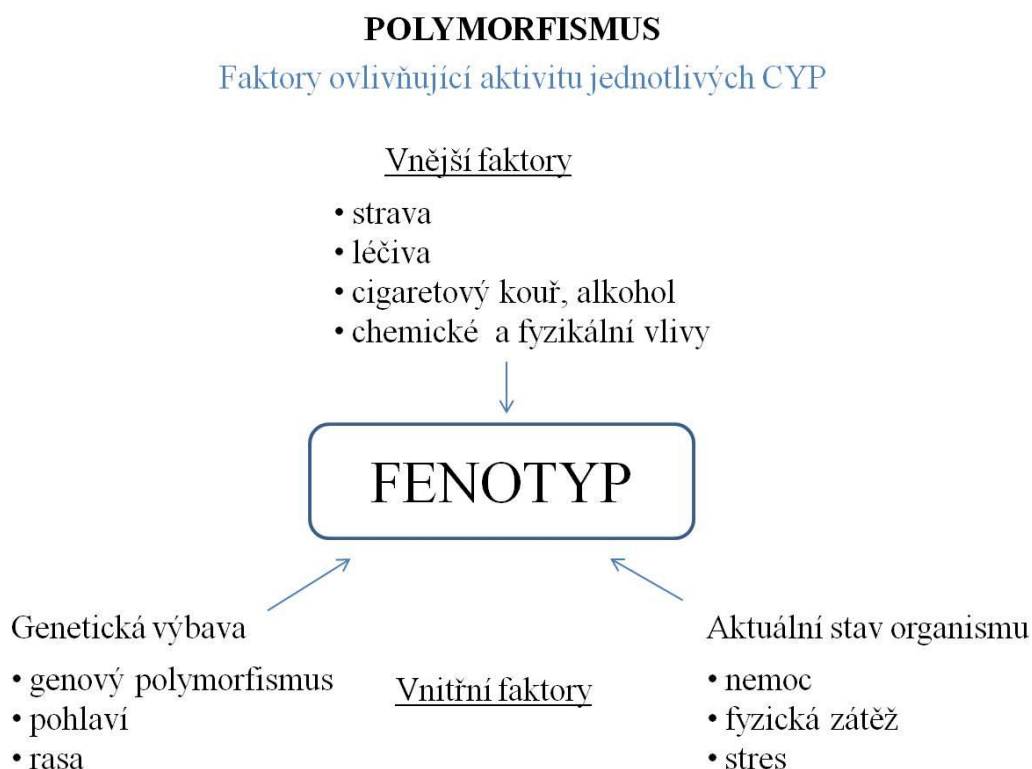


Obr. 5: Interakce enzymu se substrátem

Jak již bylo zmíněno dříve v textu, CYP patří mezi tzv. oxidoreduktasy katalyzující oxidační popřípadě redukční chemické reakce. Je-li role cytochromů P450 pro metabolismus a eliminaci daného léčiva esenciální, potom změna aktivity příslušného enzymu v důsledku účinku jiné látky může vést ke vzniku závažných mezilékových interakcí. Léčivo případně jiné xenobiotikum může být substrátem, induktorem či inhibítorem CYP.

3.1.1 Indukce metabolismu

V některých případech vede interakce léčiva či jiné látky s příslušným enzymem k jeho indukci, v důsledku čehož dochází ke zvýšení jeho aktivity. Indukce enzymu je především zapříčiněna zvýšenou expresí genu pro daný enzym. V řadě případů se indukující léčivo váže na receptor, který se nachází v neaktivní formě v cytoplasmě. Komplex receptoru s léčivem je transportován do jádra, kde se váže na tzv. responsivní element regulační sekvence genu, což vede ke zvýšené transkripci neboli indukci genu. Obvykle je schopnost metabolitu vyvolat účinek v cílové tkáni nižší ve srovnání s parentní látkou, proto enzymová indukce má převážně za následek snížení farmakologického účinku léčiva vlivem jeho zvýšeného metabolismu. Aktivita enzymů se u lidí může lišit. Důvodem je řada vnějších a vnitřních faktorů ovlivňujících aktivitu jednotlivých CYP do takové míry, že dochází ke klinicky významným odchylkám v metabolismu jejich substrátů (genový polymorfismus, věk, nemoci, medikace, strava). Faktory ovlivňující aktivitu enzymů jsou znázorněny na Obr. 6



Obr. 6: Faktory ovlivňující aktivitu enzymů

Jedním z nejznámějších induktorů lidských CYP je rifampicin. Typickým příkladem indukce rifampicinem je zrychlení metabolismu antikoncepční látky ethinylestradiolu, což může mít za následek jeho selhání. Dalším příkladem silné indukce CYP je působení polyaromatických uhlovodíků obsažených v cigaretovém kouři na enzymy z podrodiny CYP1A (Desai *et al.*, 2001).

3.1.2 Inhibice metabolismu

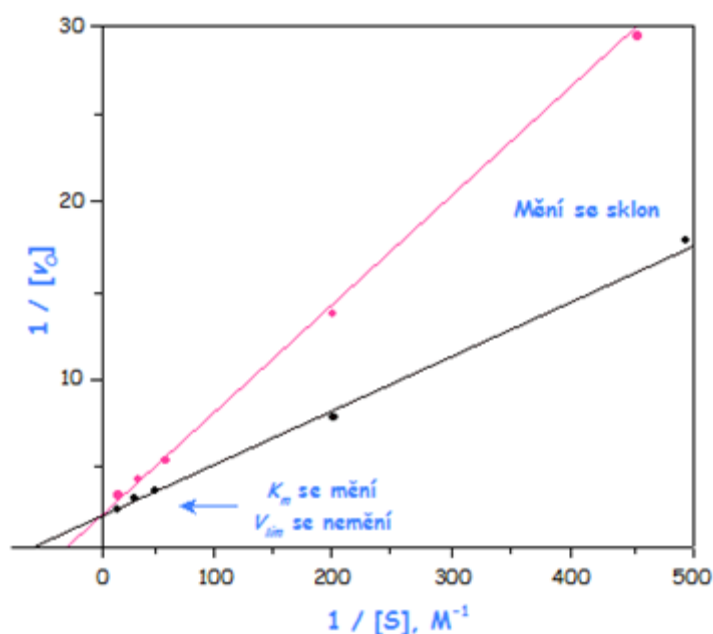
Inhibice enzymu vede obecně ke snížení jeho aktivity a tak k omezení biotransformace jeho substrátu (léčiva). Inhibice metabolické přeměny léčiva může vést ke kumulaci léčiva v organismu, což může vést k projevu jeho toxických účinků na organismus. V minulosti byly popsány kombinace léčiv, kdy jedno léčivo (A) bylo substrátem a druhé (B) inhibítorem daného CYP. Inhibice metabolismu léčiva A měla v některých případech fatální následky. Příkladem v minulosti předepisovaného léčiva, které způsobuje nežádoucí mezilékové interakce je mibefradil, antagonistu vápníkových kanálů, který byl předepisován při léčbě hypertenze. Mibefradil je však inhibítorem CYP3A4 a pro vysoké riziko lékových interakcí byl stažen z trhu (Welker *et al.*, 1998). Závažné onemocnění rhabdomyolýzu způsobuje kombinované užívání simvastatinu, lovastatinu nebo atorvastatinu s inhibitory CYP3A4, jako je například ritonavir, erytromycin, itraconazol a ketokonazol (Neuvonen, 2010). Inhibice CYP může být výsledkem různých mechanismů:

1. Reversibilní inhibice (vratná)
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní
 - Akompetitivní
2. Ireversibilní inhibice (nevratná)

Reversibilní neboli vratná inhibice může být potlačena. Inhibitor vyvolávající reversibilní inhibici může být z nekovalentní vazby na enzymu vytěsněn nadbytkem substrátu, což vede k obnovení původní aktivity enzymu. Na základě kinetiky Michaelise a Mentenové rozlišujeme inhibici kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní.

Kompetitivní inhibice nastává v důsledku kompetice (soutěže) inhibitoru a substrátu o vazbu na stejné aktivní místo enzymu. Jedná se tedy o kompetici dvou či více léčiv metabolizovaných stejným izozymem. Tato inhibice probíhá tehdy, pokud je koncentrace substrátu nízká. Pokud je inhibice kompetitivní, Michaelisova konstanta K_m se zvyšuje, ale hodnota V_{lim} (limitní rychlost) se nemění (viz Graf 1) (Kremers, 2002).

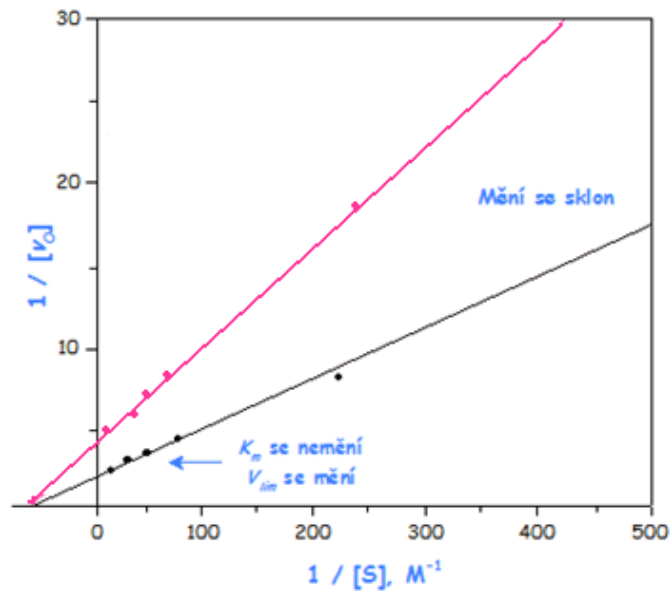
$$v = \frac{V_{lim} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$



Graf 1: Kompetitivní inhibice

V případě nekompetitivní inhibice se inhibitor neváže na aktivní místo enzymu. Vazba inhibitoru způsobí konformační změnu enzymu, čímž se znemožní vstup substrátu do aktivního místa enzymu. Dochází ke snížení vazby substrátu a tudíž i k omezení jeho přeměny. Pokud je inhibice nekompetitivní, V_{lim} klesá a konstanta K_m zůstává nezměněna (viz Graf 2) (Kremers, 2002).

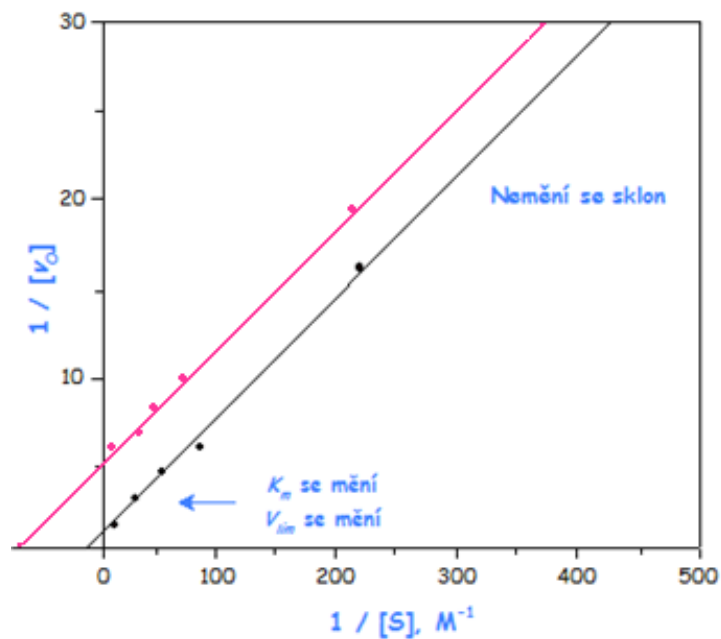
$$v = \frac{V_{lim} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) * [S]}$$



Graf 2: Nekompetitivní inhibice

Akompetitivní inhibice nastává tehdy, pokud je inhibitor schopný se vázat pouze na komplex enzym-substrát. V tomto případě inhibitor není schopný vázat se na volný enzym. S rostoucí koncentrací substrátu roste také inhibice. V případě akompetitivní inhibice klesá K_m i V_{lim} (viz Graf 3) (Kremers, 2002).

$$v = \frac{V_{lim} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) * [S]}$$



Graf 3: Akompetitivní inhibice

Ireversibilní inhibice nevratně poškozuje cílový enzym. Inhibitor se naváže na enzym kovalentní či nekovalentní vazbou nebo může způsobit chemickou modifikaci enzymu. Nejčastěji dochází ke kovalentní vazbě ireversibilního inhibitoru na aminokyselinovou postranní skupinu enzymu. Mezi ireversibilní inhibitory patří také některé významné léky. Penicilin působí kovalentní modifikací na enzym transpeptidasu, čímž se zabrání syntéze bakteriální buněčné stěny a tím dochází k usmrcení bakterií. Aspirin působí kovalentní modifikací na enzym cyklooxygenasu, a tím snižuje syntézu zánětlivých signálů (Berg *et al*, 2002). Některé ireversibilní inhibitory bývají nazývány time-dependentní (mechanism-based inhibitors, v češtině také jako - sebevražedné substráty). Tyto ireversibilní inhibitory jsou přeměňovány cílovým enzymem na metabolity, které se kovalentně naváží na enzym a způsobí tak jeho nevratnou inhibici, což vede k nemožnosti přeměny dalších substrátů enzymu na jejich metabolity. Výsledkem je ztráta funkce enzymu (Riley *et al*, 2007). Příkladem sebevražedného substrátu je inhibitor CYP3A4 imatinib, látka podávaná při onemocnění chronickou myeloidní leukémií (Filppula *et al*, 2012). Dalším příkladem time-dependentní inhibitorů CYP3A4 jsou některá antibiotika (erytromycin, clarithromycin), dále pak léčiva proti rakovině (tanoxifen, irinotecan), ale i bylinné složky (bergamotin, glatridin) (Zhou *et al*, 2005). Příklady induktorů a inhibitorů jednotlivých CYP jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Příklady induktorů a různých typů inhibitorů jednotlivých CYP.

CYP	Induktory	Inhibitory	Typ inhibice
1A2	omeprazol	fluvoxamin	kompetitivní
2A6	fenytoin	tranylcypromin	kompetitivní
2B6	fenobarbital	tyklopidin	ireversibilní
2C8	rifampicin	tiymetoprim	kompetitivní
2C9	rifampicin	sulfafenazol	kompetitivní
2C19	rifampicin	omeprazol	kompetitivní
2D6	rifampicin	quinidin	kompetitivní
2E1	ethanol	disulfiram	ireversibilní
3A4	rifampicin	ketokonazol	kompetitivní

4. STEREOCHEMIE

O poznání chemické struktury látek se ve velké míře zasloužil ruský chemik A. M. Butlerov. V polovině 19. století poprvé použil termín „chemická struktura“ a vyslovil názor o tom, že vzorec vyjadřuje chemické vlastnosti látky. Dalším významným poznatkem ve stereochemii (nauka o prostorovém uspořádání atomů v molekulách), bylo změření hodnot úhlů vazeb mezi atomy v molekule a tím se do pojmu „struktura látky“ dostala vedle polohy, pořadí a vazeb atomů v molekule též prostorová orientace (Vacík *et al*, 1995).

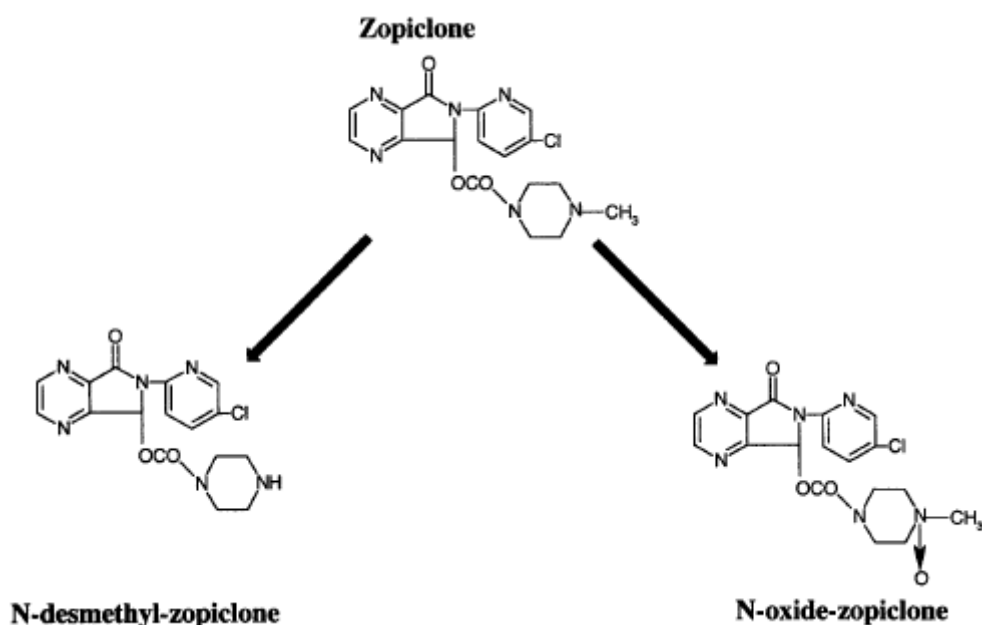
Velké množství organických sloučenin má stejné souhrnné vzorce, ale liší se prostorovým uspořádáním atomů v molekule či povahou vazeb a jejich pořadím. Takové sloučeniny nazýváme isomery. Optické isomery, též nazývané enantiomery, jsou svými zrcadlovými obrazy a většina jejich fyzikálních a chemických vlastností je shodných. Dalším charakteristickým znakem pro optické isomery je, že každý stáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném směru, doprava či vlevo. Schopnost otáčet rovinu polarizovaného světla, tedy světla, jehož paprsky kmitají v jedné rovině, je dána nedostatkem souměrnosti molekuly. Tato nesouměrnost je ve většině případů způsobena přítomností chirálního uhlíku v molekule. Chirálním, neboli jinými slovy asymetrickým uhlíkem, je nazýváme atom uhlíku, který váže čtyři odlišné ligandy. Jednotlivé enantiomery jsou označovány předponou S (sinister) a R (rectus). Směs enantiomerů ve stejné koncentraci 1:1, je opticky inaktivní a nazývá se racemát neboli racemická směs. Ten má však často odlišné fyzikální vlastnosti od čistých enantiomerů.

Jednotlivé enantiomerní formy léčiv se mnohdy liší ne jen v opačném směru otáčení lineárně polarizovaného světla, ale také v biologickém účinku – často vykazují odlišnou míru farmakologické účinnosti a také různým způsobem interagují s vybranými strukturami v organismu (enzymy, transportéry, atd.). Tato léčiva se vyráběla ve formě racemátů z důvodů vysokých nákladů a absence moderních technologií pro separaci jednotlivých enantiomerů daného léčiva. V poslední době se však léčiva znovu uvádí na trh v podobě jediného enantiomeru, který je farmakologicky účinnější či vykazuje jiné vhodnější vlastnosti ve srovnání s druhým optickým isomerem. Účinnější či z jiného důvodu výhodnější forma léčiva se nazývá eutomer, méně účinný enantiomer nazýváme distomer. Nahrazení racemátu jediným farmakologicky účinnějším enantiomerem je označováno jako tzv. „chirální switch“ neboli „chirální přesmyk“ (Patočka *et Dvořák*, 2004).

4.1 Zopiklon

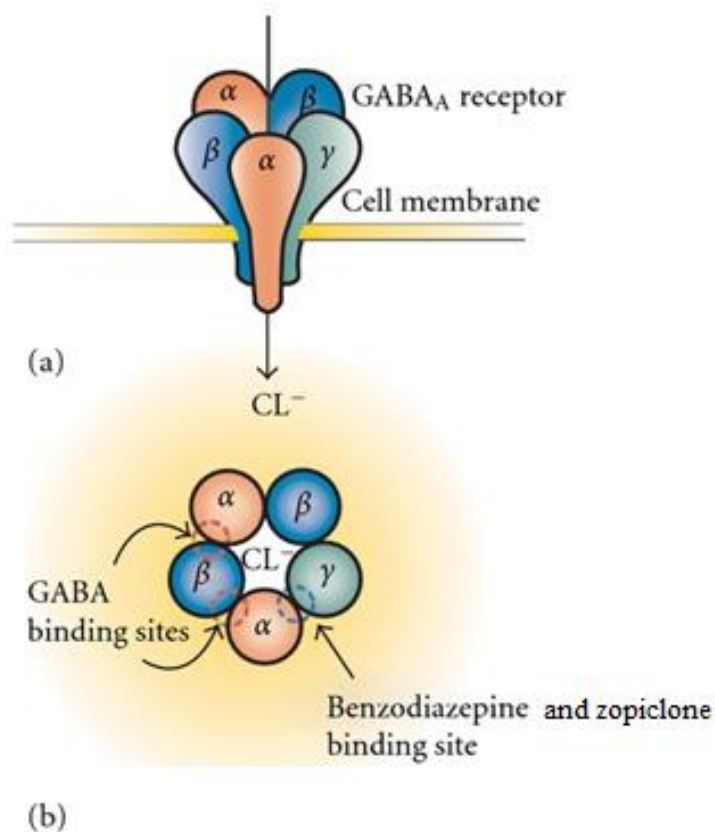
Zopiklon patří mezi deriváty cyklopyrrolonu obsahující centrum chirality, které umožňuje výskyt zopiklonu ve dvou stereoisomerních formách. Enantiomery zopiklonu mají označení R či S-zopiklon. Zopiklon je řazen do tzv. III. generace hypnotik (Patočka *et Dvořák*, 2006). U enantiomeru R nebyly prokázány hypnotické účinky, kdežto S-enantiomer ((eszopiklon či (+) zopiklon)) je aktivní krátkodobě účinné hypnotikum, které je metabolizováno především CYP3 enzymy (Fernandez *et al.*, 2002). U nás je však komerčně tato látka dostupná v podobě racemické směsi (Zopiclone Bril, Zopitin).

Téměř 95 % zopiklonu je v těle metabolizováno, pouze 5 % je v nezměněné podobě vylučováno močí, slinami a v mateřském mléce (Noble *et al.*, 1998). Zopiklon je částečně metabolizován v játrech na dva hlavní metabolity: *N*-desmethyl-zopiklon (ND-Z) vzniklý demethylací s nízkou farmakologickou aktivitou a *N*-oxide-zopiklon (NO-Z) vzniklý oxidací zopiklonu, který je farmakologicky inaktivní (viz Obr. 7) (Gaillot *et al.*, 1982, 1983; Le Liboux *et al.*, 1987). Hlavním enzymem podílejícím se na vzniku NO-Z je CYP3A4, dále pak CYP2C8. CYP2C8 je však zároveň hlavní formou CYP podílející se na metabolismu ND-Z (Becquemont *et al.*, 1998). Poločas eliminace tohoto léčiva se pohybuje mezi 3,5 - 6,5 hodiny (Patočka *et Dvořák*, 2006).



Obr. 7: Biotransformace zopiklonu
(Převzato: Becquemont *et al.*, 1998)

Zopiklon se v organismu váže na GABA_A receptory (Drover, 2004). GABA (gama-aminomáselná kyselina) receptory jsou tlumivé neuroreceptory, které mají v periferní nervové soustavě myorelaxační účinek a v centrální nervové soustavě hypnotické, antikonvulzivní a další účinky. GABA_A receptory jsou membránové ligandem řízené chloridové kanály. Chloridové ionty prochází chloridovým kanálem a způsobí tak hyperpolarizaci membrány, což má za následek inhibiční účinek. GABA_A receptor je složen z pěti podjednotek, které jsou různou kombinací devatenácti podjednotek (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π a ρ 1–3), které svým pořadím určují farmakologický a fyziologický účinek (Belelli *et* Lambert, 2005). Struktura GABA_A receptoru je znázorněna na Obr. 8. Jeho aktivitu ovlivňují ligandy (léčiva a endogenní látky), které se váží na různá vazebná místa na jednotlivých podjednotkách receptoru. Zopiklon spolu se Zolpidem a Zaleplonem patří do skupiny tzv. Z-drugs. Tato léčiva se specificky váží na α 1 podjednotku receptoru, a tím vyvolávají zvýšený influx chloridových iontů (Dvořák *et* Cvek, 2011).



Obr. 8: Struktura GABA_A receptoru (Vinkers *et* Olivier, 2012)

4.1.1 S-zopiklon

Jak už bylo zmíněno v předešlém textu, zopiklon se díky svému centru chiralitě vyskytuje ve dvou enantiomerních formách. Stereoisomery se od sebe liší odlišnou farmakologickou aktivitou způsobenou rozdílnou vazbou na krevní bílkoviny a rozdílnou distribucí v mozku (Fernandez *et al.*, 2002). Vyšší farmakologickou aktivitou disponuje S-zopiklon, který má téměř 50krát větší afinitu k vazbě na GABA_A receptor než R-zopiklon (Blaschke *et al.*, 1993). S enantiomer vykazuje sedativní účinky a působí jako antikonvulzivum a mírné myorelaxans. Zopiklon prohlubuje spánek a snižuje četnost probuzení bez narušení REM fáze spánku, která tvoří asi jednu čtvrtinu celkové doby spánku. U některých lidí zanechává nepříjemnou hořkou chuť v ústech, což je způsobeno tím, že se částečně vylučuje slinami (Noble *et al.*, 1998).

Do klinické praxe byl S-zopiklon uveden jako léčivo proti nespavosti poprvé v USA v dubnu roku 2006 a je příkladem tzv. chirálního přesmyku. Ve studiích na 2700 pacientech trpících insomnií byla prokázána pozitivní účinnost léčiva, tedy došlo k výraznému zlepšení spánku bez přesahu účinku léčiva do dalšího dne a s minimálním počtem vedlejších účinků (Glass *et al.*, 2005).

5. CHROMATOGRAFIE

Chromatografie patří mezi separační metody, které slouží k rozdělení směsí látek. Je zároveň i analytickou metodou, poskytuje jak kvantitativní, tak i kvalitativní informace o zkoumaném vzorku. Chromatografické metody jsou založeny na rozdílné rychlosti pohybu jednotlivých látek ve směsi v soustavě mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé) fáze. Chromatografie je využívána pro určení totožnosti látky, pro kontrolu čistoty a pro analýzy směsí. Výstupem této metody je chromatogram, ze kterého lze určit retenční čas jednotlivých látek procházejících separací a také míru odezvy detektoru, která je úměrná koncentraci daného analytu ve vzorku.

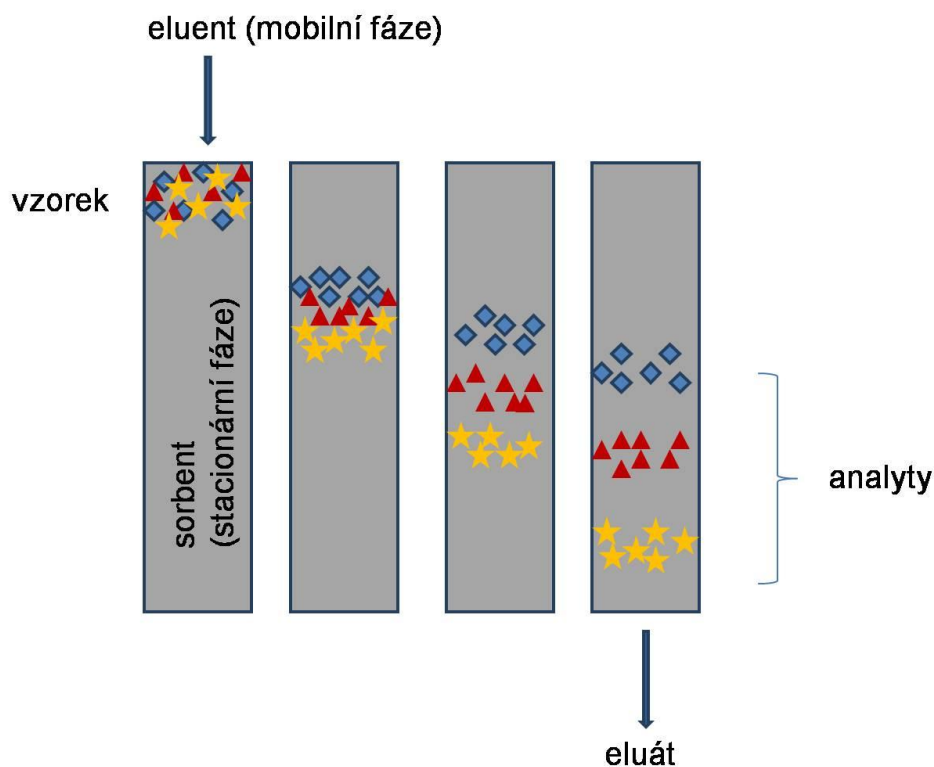
dělení chromatografie:

- a) plynová (GC) (*adsorpční a rozdělovací*)
- b) superkritická fluidní (SFC)
- c) kapalinová (LC)
 - kolonová (*adsorpční, rozdělovací, gelová a iontově výměnná*)
 - planární (plošná) (*papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC)*)

5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

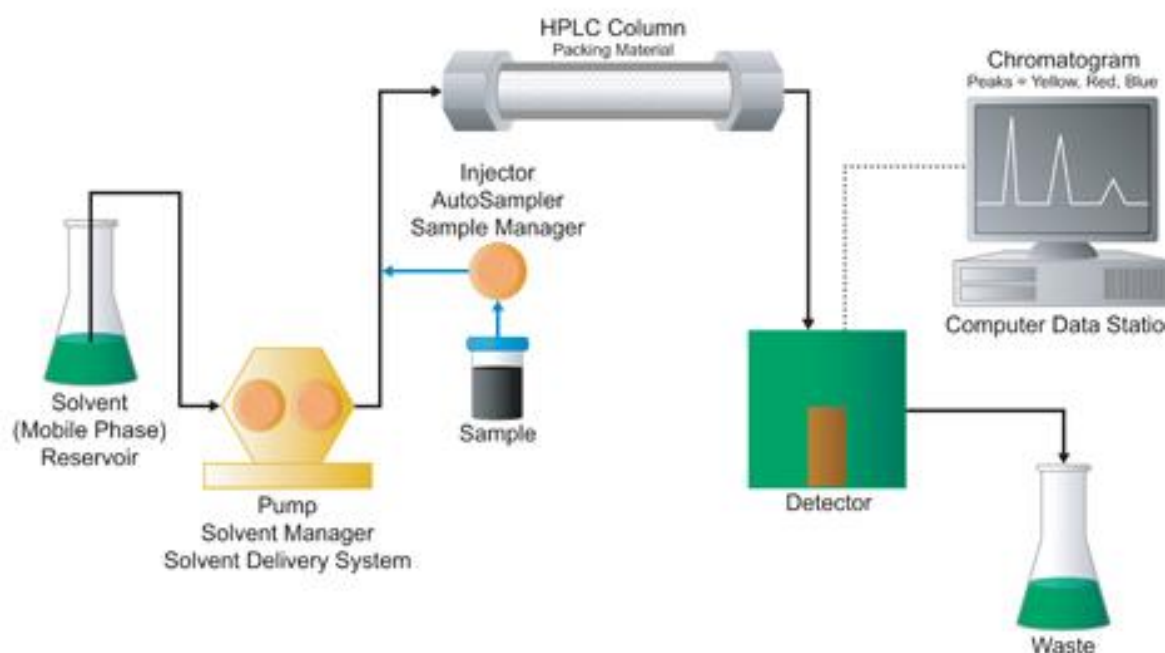
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody, díky vysoké účinnosti a dobré reprodukovatelnosti analýz. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách (www.labmet.zshk.cz, 3.2. 2014).

HPLC je metoda založena na separaci dělených látek neboli analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze se jako náplň nachází v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fází. Separace látek mezi stacionární fází a mobilní fází je znázorněna na Obr. 9.



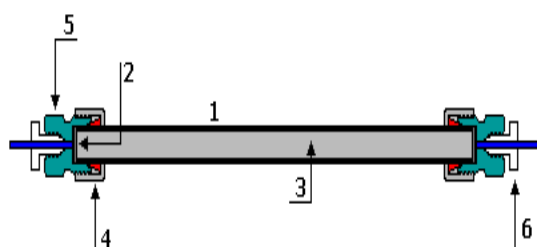
Obr. 9: Dělení analytů s rozdílnou afinitou k sorbentu v separační koloně

Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie spočívá v dávkování zkoumaného vzorku do mobilní fáze (eluent), která unáší jednotlivé složky vzorku na chromatografickou kolonu, kde dochází ke zpoždování různých analytů dle jejich rozdílné afinity ke stacionární fázi (sorbent). Po průchodu vzorku separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenými veličinami jsou fluorescence, absorbance, index lomu či elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tzv. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky (www.labmet.zshk.cz, 3.2. 2014). HPLC metoda se využívá ke stanovení koncentrace organických kyselin, bílkovin, vitaminů, léčiv a různých dalších látek. Systém HPLC je znázorněn na Obr. 10.



Obr. 10: Systém HPLC
(převzato z www.waters.com, 3.2. 2014)

Chromatografická separační kolona je kapilára naplněná stacionární fází. K nejčastěji používaným materiálem k výrobě chromatografických kolon patří sklo, nerezová ocel či plast. Jako náplň kolon (sorbent, stacionární fáze) se používají polární nemodifikované absorbenty (silikagel) nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se většinou užívají organická rozpouštědla a jejich směsi s vodnou fází, nejčastěji pufrém, v různých poměrech (www.hplc.cz, 4.2. 2014). Schéma konstrukce separační kolony je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11: Separací kolony 1- kovový plášť,
2 - porézní kovová frit, 3 - průtok mobilní fáze,
4 - ochranný kroužek, 5 - kovová hlavice,
6 - vstup pro kapiláru se šroubem
(převzato z www.hplc.cz, 3.2. 2014)

5.1.1 Využití HPLC při stanovení aktivity cytochromů P450

V experimentální části je využívána HPLC metoda pro detekci koncentrace metabolitu markerového, tj. prototypického substrátu daného CYP v reakční směsi, ve které proběhla inkubace s potenciálním inhibitorem. Jednotlivé vzorky obsahující prototypické substráty k danému CYP v koncentraci blízké se hodnotě Michaelisovy konstanty se inkubují spolu s jaterními mikrosomy a NADPH generujícím systémem. Po inkubaci se reakce zastaví pomocí organického rozpouštědla. Koncentrace vzniklého metabolitu markerového substrátu je detekována pomocí HPLC UV/VIS či HPLC s fluorescenční detekcí. Pro zjištění inhibičního účinku testované látky na CYP aktivitu, je do reakčních směsí přidávána testovaná látka v rostoucí koncentraci. Její inhibiční účinek na aktivitu konkrétního CYP se projeví poklesem koncentrace metabolitu daného prototypického substrátu s rostoucí koncentrací testované látky (Bjornsson *et al*, 2003). Přehled jednotlivých markerových substrátů pro CYP je uveden v Tab. II.

Tab. II: Přehled jednotlivých markerových substrátů CYP, reakce substrátů katalyzované CYP a hodnoty Michaelisovy konstanty

cytochromy P450	markerový substrát	reakce katalyzovaná CYP	Michaelisova konstanta (K_m)
CYP1A2	7-ethoxyresorufin	O-deethylace	2,5 μ M
CYP2A6	Kumarin	7-hydroxylace	6,2 μ M
CYP2B6	7-ethoxy-4- (trifluoromethyl)-kumarin	O-deethylace	15 μ M
CYP2C8	paclitaxel	6'-demethylace	12 μ M
CYP2C9	diklofenak	4'-hydroxylace	16 μ M
CYP2D6	bufuralol	1'-hydroxylace	25 μ M
CYP2E1	chlorzoxazon	6'-hydroxylace	56 μ M
CYP3A4	testosteron	6 β -hydroxylace	100 μ M

6. LABORATORNÍ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

6.1 Biologický materiál

Směsné lidské mikrosomální frakce obsahující CYP použity pro experimentální část této diplomové práce byly dodány firmou Advancell (Barcelona, Španělsko). Tyto enzymové preparáty byly připraveny v souladu s etickými pravidly země původu. Koncentrace funkčních CYP v enzymových frakcích je 10,3 $\mu\text{mol/l}$.

6.2 Chemikálie

- zopiklon pro experimenty: racemát, S-forma, R-forma (poskytnut Katedrou buněčné biologie a genetiky UP v Olomouci)
- markerové substráty CYP: 7-ethoxyresorufin, kumarin, 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin, paclitaxel, diklofenak, S-mefenytoin, bufuralol, chlorzoxazon, testosteron (Sigma Aldrich, USA)
- metabolity markerových substrátů CYP: resorufin, 7-hydroxykumarin, 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin, 6-hydroxypaclitaxel, 4-hydroxydiklofenak, S-hydroxymefenytoin, 1-hydroxybururalol, 6-hydroxychlorzoxazon, 6 β -hydroxytestosteron (Sigma Aldrich, USA)
- složky pro mobilní fáze: hydrogenfosforečnan sodný, metanol, kyselina octová, acetonitril, kyselina chloristá
- STOP roztoky: metanol, acetonitril, kyselina octová, uhličitan sodný, chlorid sodný, acetonitril, kyselina chloristá, kyselina fosforečná, dichlormethan, 2-propanol/chloroform (Sigma Aldrich, USA; Merck, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný, NADPH generující systém: nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, isocitrát, síran hořečnatý, isocitrát dehydrogenasa (Sigma Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid (VWR, USA)

6.3 Laboratorní pomůcky

- automatické pipety o objemu: 0,1 – 2,5 μ l; 0,5 – 10 μ l; 2 -20 μ l; 10 – 100 μ l; 20 – 200 μ l; 100 – 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- skleněné pipety
- pipetovací špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozkušavky(Eppendorf, Hamburg, Německo)
- skleněné zkumavky (Merci, ČR)
- pipetovací balonek
- parafilm (BEMIS, USA)

7. LABORATORNÍ PŘÍSTROJE

- analytické váhy (Kern, Německo)
- vertex (IKA, USA)
- centrifuga (Hanibal Science Industrial, Korea)
- pH metr (SCHOTT, Německo)
- koncentrátor vzorků (ECOM, Česká Republika)
- ultrazvuk (RoHs, Čína)
- vodní lázeň (Memmet, Německo)
- termoblok (MS major science, Taiwan)
- HPLC (Kvarterní LC systém UltiMate 3000, DIONEX, Německo)

8. POUŽITÉ METODY

8.1 Sledování inhibičního vlivu zopiklonu na aktivitu CYP *in vitro*

Pro stanovení inhibičního účinku zopiklonu na aktivitu jednotlivých lidských jaterních mikrosomálních CYP byly použity metody, které využívají markerových substrátů, na jejichž metabolismu se podílí některý z jaterních CYP.

Inhibiční vliv čistých forem zopiklonu (S-zopiklon, R-zopiklon) a racemické směsi na enzymovou aktivitu jednotlivých CYP byl sledován ve vzrůstající koncentraci (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M). Vzorky bez obsahu testované látky byly použity ke stanovení kontroly 100% enzymové aktivity jednotlivých CYP.

Racemická směs a jednotlivé formy zopiklonu, byly rozpuštěny ve 100% dimethylsulfoxidu a tím byl připraven 100mM zásobní roztok, který se pak dále ředil deionizovanou vodou na pracovní roztoky o potřebné koncentrace pipetované do reakčních směsí (1mM a 2mM). Organická rozpouštědla mohou i v relativně nízkých koncentracích inhibovat enzymovou aktivitu některých CYP, jejich koncentrace v reakční směsi by tak neměla překročit 1 % (v/v) (Chauret a spol., 1998; Busby a spol., 1999).

Jednotlivé vzorky se specifickým substrátem pro daný CYP, o koncentraci, která byla zvolena na základě experimentálně zjištěných hodnot K_m (Tab. II), byly inkubovány s lidskými jaterními mikrosomy obsahující CYP, NADPH generujícím systémem a S, R formou či racemátem zopiklonu. Po zastavení reakce, deproteinací reakční směsi a případné extrakci organickým rozpouštědlem byla stanovena koncentrace vzniklého metabolitu markerového substrátu pomocí HPLC s UV/VIS či fluorescenční detekcí. V předložené diplomové práci byl sledován inhibiční vliv zopiklonu na enzymovou aktivitu celkem osmi CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4).

Inhibiční vliv zopiklonu na aktivitu jednotlivých CYP byl po analýze vyhodnocen z chromatogramů z HPLC pomocí softwaru Chromeleon a graficky zpracován pomocí programu Excel (Microsoft Office). Kalibrace a následný výpočet koncentrací jednotlivých analytů byly provedeny metodou vnějšího standardu. Na osu y byly vyneseny hodnoty relativní aktivity CYP v procentech (přepočteno z běžně akceptovatelných hodnot nmol produktu/nmol P450/min) a na ose x byly vyneseny jednotlivé koncentrace testované látky v μ M. Jednotlivé vzorky byly připravovány v dubletech. Pro použití těchto vzorků pro vyhodnocení výsledků jednotlivých inhibičních studií byly akceptovány naměřené hodnoty v dubletech nelíšící se vzájemně o více než 10 %.

CYP1A2

Celkový objem reakční směsi: 100 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Specifický substrát: 2,5µM 7-ethoxyresorufin

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

Preinkubace 30 minut při 37 °C

NADPH generující systém

Inkubace 15 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 100% methanol

Centrifugace 10 minut při 14000 RPM při 4°C

Ke stanovení aktivity enzymu CYP1A2 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 6,638. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 10 minut

Tab. III: Podmínky stanovení aktivity CYP1A2 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	25mM Na ₂ HPO ₄ pH = 7 : 100% CH ₃ OH (58:42)
Eluce	isokratická
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Tlak	13,8 MPa
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	25 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	fluorescenčně, excitace při 535 nm, emise při 585 nm

CYP2A6

Celkový objem reakční směsi: 100 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Specifický substrát: 6,2µM kumarin

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

Preinkubace 15 minut při 37 °C

NADPH generující systém

Inkubace 15 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 100% methanol

Vortex, centrifugace 10 minut při 14000 RPM při 4°C

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2A6 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 3,708. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 6 minut

Tab. IV: Podmínky stanovení aktivity CYP2A6 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	0,5% CH ₃ COOH/ACN (60/40)
Eluce	isokratická
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Tlak	9,7 MPa
Nástřik vzorku	5 µl
Teplota kolony	25 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	fluorescenčně, excitace při 338 nm, emise při 485 nm

CYP2B6

Celkový objem reakční směsi: 100 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Specifický substrát: 3,75µM 7-ethoxy-4-(triflouromethyl) kumarin

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

Preinkubace 30 minut při 37 °C

NADPH generující systém

Inkubace 15 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 100% methanol

Vortex, centrifugace 10 minut při 14000 RPM při 4°C

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2B6 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 5,205. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 8 minut

Tab. V: Podmínky stanovení aktivity CYP2B6 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	20mM Na ₂ HPO ₄ pH=7,5 / 100% CH ₃ OH (46/54)
Eluce	isokratická
Průtok mobilní fáze	1,2 ml/min
Tlak	16 MPa
Nástřik vzorku	5 µl
Teplota kolony	35 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	fluorescenčně, excitace při 410 nm, emise při 510 nm

CYP2C8

Celkový objem reakční směsi: 200 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 50 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

NADPH generující systém

Preinkubace 15 minut při 37 °C

Specifický substrát: 1,44µM paclitaxel

Inkubace 30 minut při 37 °C

Zastavení reakce: acetonitril

Centrifugace 10 minut při 12000 RPM při 4°C

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2C8 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 25,5. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 34 minut

Tab. VI: Podmínky stanovení aktivity CYP2C8 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	A: 10% CH ₃ OH B: 100% CH ₃ OH
Eluce	gradientová
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Tlak	16 MPa
Nástřik vzorku	75 µl
Teplota kolony	45 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	UV při 230 nm

CYP2C9

Celkový objem reakční směsi: 200 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

NADPH generující systém

Preinkubace 25 minut při 37 °C

Specifický substrát: 16µM diklofenak

Inkubace 25 minut při 37 °C

Zastavení reakce: acetonitril/kyselina octová (94:6)

Centrifugace 10 minut při 12000 RPM při 4°C

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2C9 bylo odebráno 150 µl supernatantu.

Retenční čas: 9,070. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 33 minut

Tab. VII: Podmínky stanovení aktivity CYP2C9 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	A: ACN/2mM HClO ₄ (3:7) B: 100% CH ₃ OH
Eluce	gradientová
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Tlak	7,8 - 4,9 MPa
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	50 °C
Teplota racku	5 °C
Detekce	UV při 280 nm

CYP2D6

Celkový objem reakční směsi: 200 μ l

Pufr: 100mM KH_2PO_4 , pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 67,3 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ M zopiklon

Specifický substrát: 25 μ M bufuralol

Preinkubace 30 minut při 37 °C

NADPH generující systém

Inkubace 20 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 70% HClO_4

Centrifugace 10 minut při 14000 RPM při laboratorní teplotě

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2D6 bylo odebráno 150 μ l supernatantu.

Retenční čas: 5,264. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 15 minut

Tab. VIII: Podmínky stanovení aktivity CYP2D6 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C_{18}
Mobilní fáze	A: ACN/2mM HClO_4 B: ACN
Eluce	gradientová
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Tlak	6,3 - 11,1 MPa
Nástřik vzorku	5 μ l
Teplota kolony	45 °C
Teplota racku	20 °C
Detekce	Fluorescenčně, při excitaci 252 nm, emisi 302 nm

CYP2E1

Celkový objem reakční směsi: 1000 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 160 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

NADPH generující systém

Preinkubace 30 minut při 37 °C

Specifický substrát: 56µM chlorzoxazon

Inkubace 20 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 42,5% kyselina fosforečná

Extrakce: 2-propanol/chloroform

vortex 20 s

Centrifugace 10 minut při 2000 RPM při 4°C

Odebrat 1 ml spodní vrstvy čistou skleněnou pipetou

Odpařit při 40 °C pod N₂

Odparek rozpustit ve 200 ml mobilní fáze

ultrazvuk 10 s

Ke stanovení aktivity enzymu CYP2E1 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 4,816. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 20 minut

Tab. IX: Podmínky stanovení aktivity CYP2E1 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	0,5% CH ₃ COOH/ACN (3:1)
Eluce	isokratická
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Tlak	8 MPa
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	40 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	UV při 287 nm

CYP3A4

Celkový objem reakční směsi: 500 µl

Pufr: 100mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy: 100 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM zopiklon

NADPH generující systém

Preinkubace 30 minut při 37 °C

Specifický substrát: 100µM testosteron

Inkubace 20 minut při 37 °C

Zastavení reakce: 1M Na₂CO₃/2M NaCl

Extrakce: 2 ml dichlormethan

vortex 15 s

Centrifugace 5 minut při 3000 RPM při 4°C

Odebrat 1 ml spodní vrstvy čistou skleněnou pipetou

Odpařit při 40 °C pod N₂

Odparek rozpustit ve 200 ml mobilní fáze

10 s ultrazvuk

Ke stanovení aktivity enzymu CYP3A4 bylo odebráno 200 µl supernatantu.

Retenční čas: 4,687. minuta, **doba analýzy jednoho vzorku:** 17 minut

Tab. X: Podmínky stanovení aktivity CYP3A4 pomocí HPLC systému

Stacionární fáze	C ₁₈
Mobilní fáze	64% CH ₃ OH
Eluce	isokratická
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Tlak	13 MPa
Nástřík vzorku	50 µl
Teplota kolony	30 °C
Teplota racku	10 °C
Detekce	UV při 245 nm

8.2 Určení mechanismu inhibičního účinku zopiklonu na aktivitu CYP *in vitro* (Time dependent inhibice)

Cílem dalších experimentů bylo zjistit, zdali mechanismus inhibičního účinku S či R zopiklonu na enzymové aktivity vybraných CYP je reversibilní či ireversibilní.

Pro zjištění typu inhibice byl vybrán experiment Single Point Assay, která je založena na sledování mechanismu inhibičního vlivu testované látky na CYP aktivitu při jedné koncentraci testovaného inhibitoru (převzato z www.cyprotex.com). V prvním vzorku je testovaná látka (inhibitor) preinkubována spolu s NADPH generujícím systémem a lidskými jaterními mikrosomy s 10krát vyšší koncentrací než je v běžné reakční směsi při inkubaci s prototypickým substrátem. Do druhého vzorku s inhibitorem a mikrosomy je NADPH generující systém přidán až po preinkubaci. Je-li testovaná látka time-dependentním inhibitorem (ireversibilním inhibitorem), pak se inhibice projeví pouze v přítomnosti NADPH generujícího systému v preinkubaci. V třetím a čtvrtém vzorku je sledováno, zdali se na inhibičním vlivu nepodílí také vehikulum, organické rozpouštědlo - DMSO, v kterém je rozpuštěn zopiklon. Vše je testováno v duplikátech. Po preinkubaci je alikvotní podíl vzorků zředěn 10 násobně pufrém obsahujícím markerový substrát pro daný CYP. Následuje další inkubace 30 minut a zastavení reakce. Ředěním testované látky 10krát s markerovým substrátem se minimalizuje potenciální vliv reversibilní (kompetitivní) inhibice na aktivitu daného CYP enzymu (pipetovací postup je znázorněn ve Schématu 1 níže) . Vliv případné reversibilní inhibice je také snížen použitím vysoké koncentrace specifických substrátů jednotlivých CYP (www.cyprotex.com, 11.4.2014). Pro míru ireversibilní inhibice enzymové aktivity testovaným inhibitorem lze využít následující vzorec:

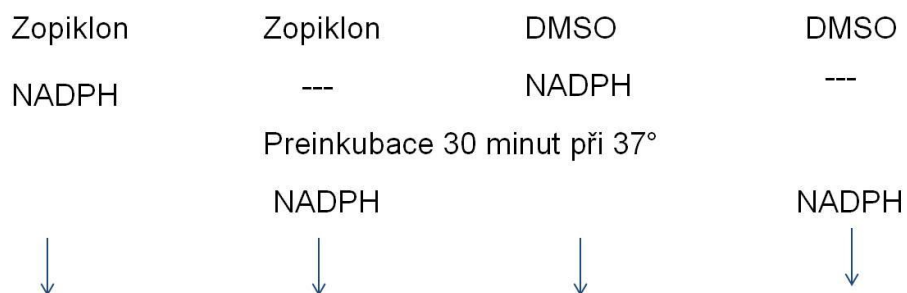
$$\text{Procento inhibice} = 100 * \left[1 - \left(\frac{R_{\text{Test compd} + \text{NADPH}}}{R_{\text{Vehicle} + \text{NADPH}}} / \frac{R_{\text{Test compd} - \text{NADPH}}}{R_{\text{Vehicle} - \text{NADPH}}} \right) \right]$$

Schéma 1: Pipetovací schéma pro Single Point Assay



Fosfátový pufr, pH = 7,4

Lidské jaterní mikrosomy (10x vyšší koncentrace)



Alikvoty naředit 10krát pufrům s markerovým substrátem

Inkubace 30 minut při 37 °C

Zastavení reakce

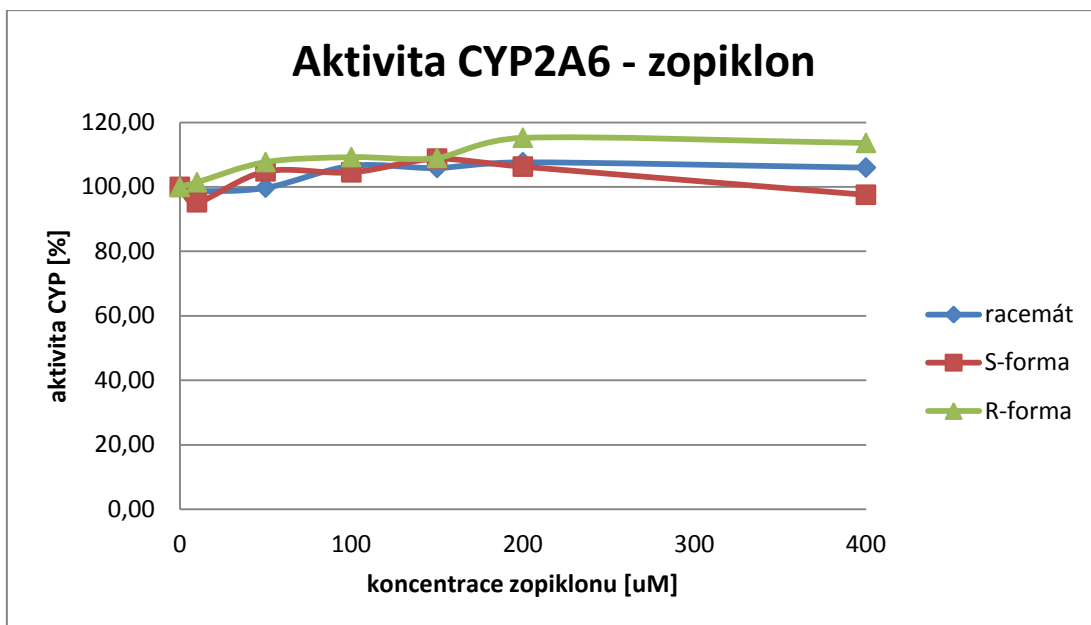
9. VÝSLEDKY

9.1 Interakce testované látky s lidskými jaterními mikrosomálními CYP

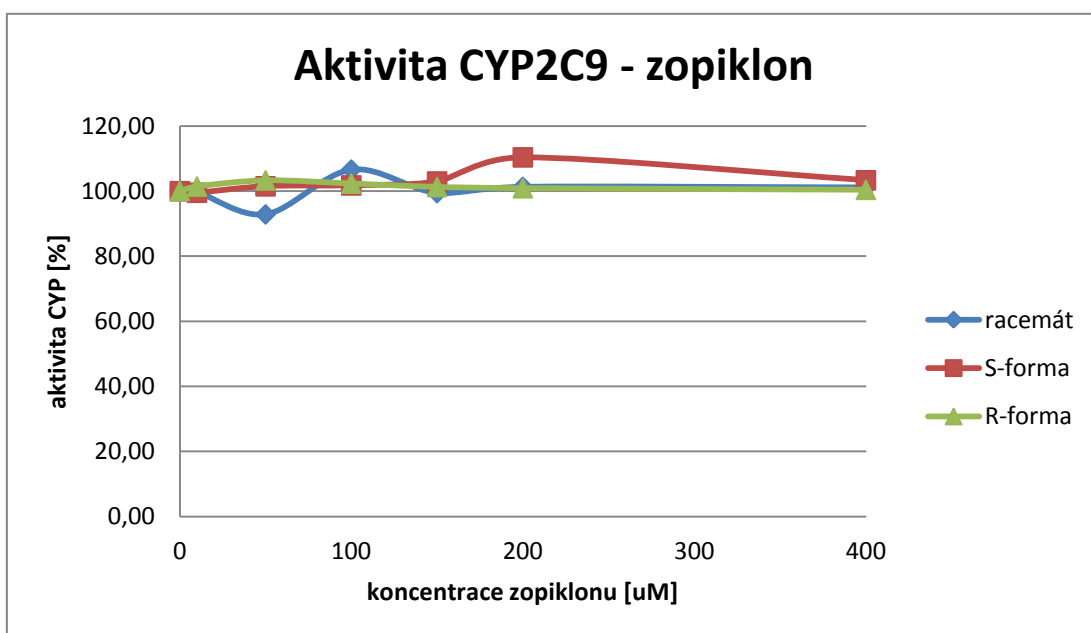
9.1.1 *In vitro* inhibice markerové aktivity CYP zopiklonem v mikrosomální frakci lidských jater

Možný inhibiční vliv zopiklonu na enzymovou aktivitu CYP byl testován na osmi významných jaterních formách CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4). Inhibiční vliv zopiklonu na jednotlivé formy CYP byl sledován v šesti koncentračních úrovních jednotlivých stereoisoforem inhibitoru a racemátu (racemát, S-forma, R-forma). Tento široký rozsah koncentrací testované látky byl zvolen tak, aby byl dostatečně zachycen průběh změny enzymové aktivity se zvyšující se koncentrací potenciálního inhibitoru. Zopiklon neměl významný vliv na enzymovou aktivitu CYP2A6 a CYP2C9. R enantiomer testované látky dále statisticky nevýznamně interagoval s CYP1A2, CYP2B6 a CYP2E1. U těchto CYP nebyla signifikantně snížena enzymová aktivita ani v přítomnosti vysokých koncentrací zopiklonu ($\geq 200\mu\text{M}$). Naopak významný inhibiční účinek (střední) zopiklonu byl prokázán na enzymovou aktivitu CYP2D6, CYP2C8 a CYP3A4 (i v koncentracích $50\mu\text{M}$).

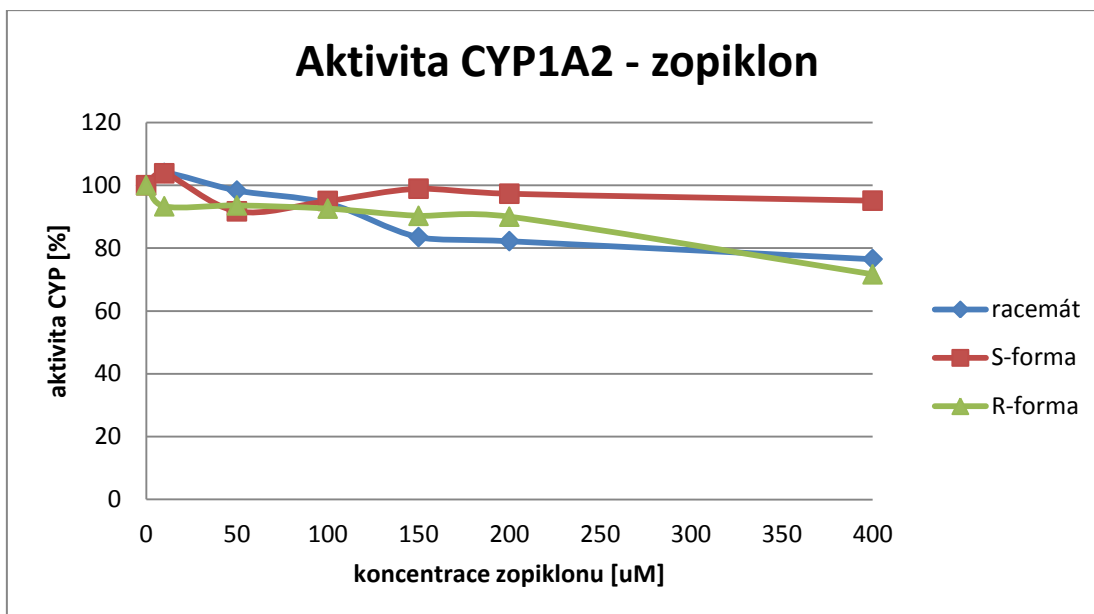
Shrnutí výsledků inhibičního vlivu jednotlivých stereoisoforem zopiklonu včetně racemické směsi léčiva na specifickou enzymovou aktivitu všech testovaných CYP je graficky znázorněno v Grafech 4 - 11.



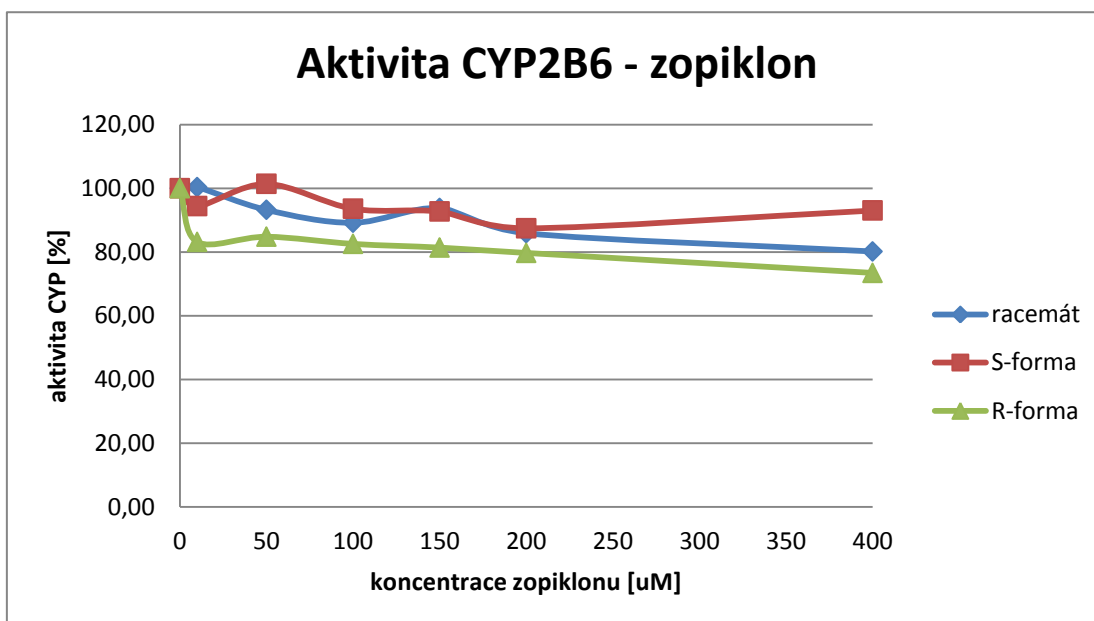
Graf 4: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2A6 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM.



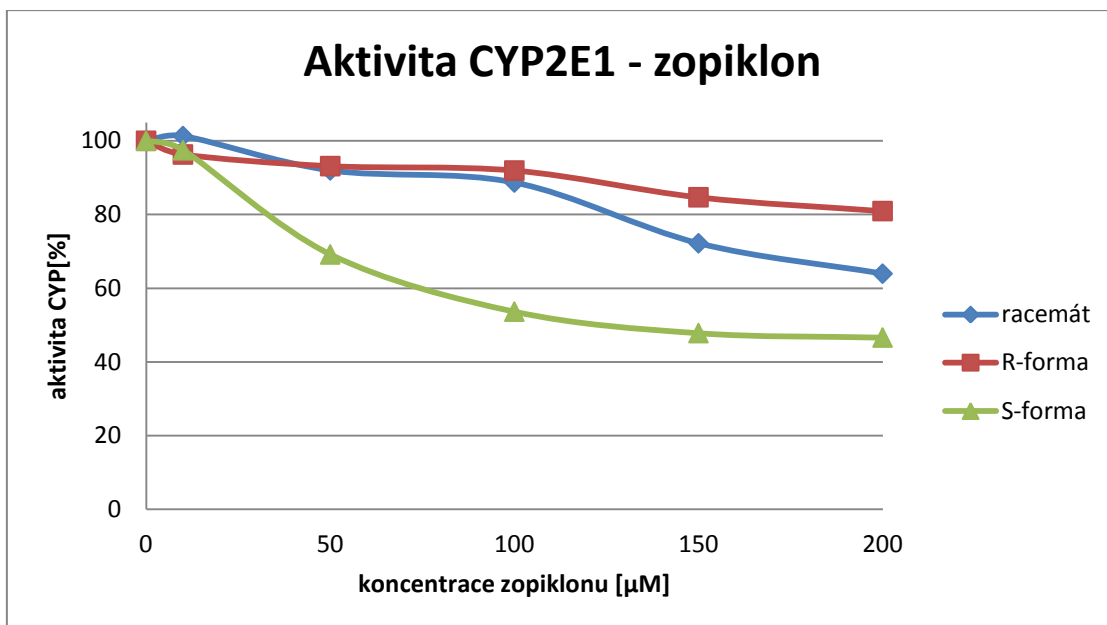
Graf 5: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM.



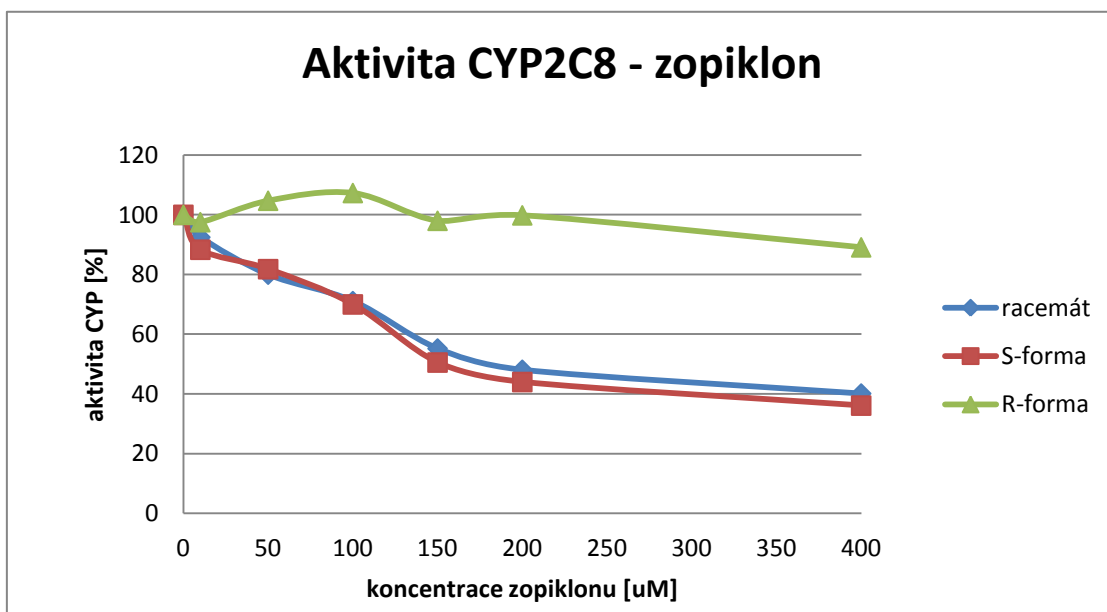
Graf 6: Ovlivnění enzymové aktivity CYP1A2 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ M.



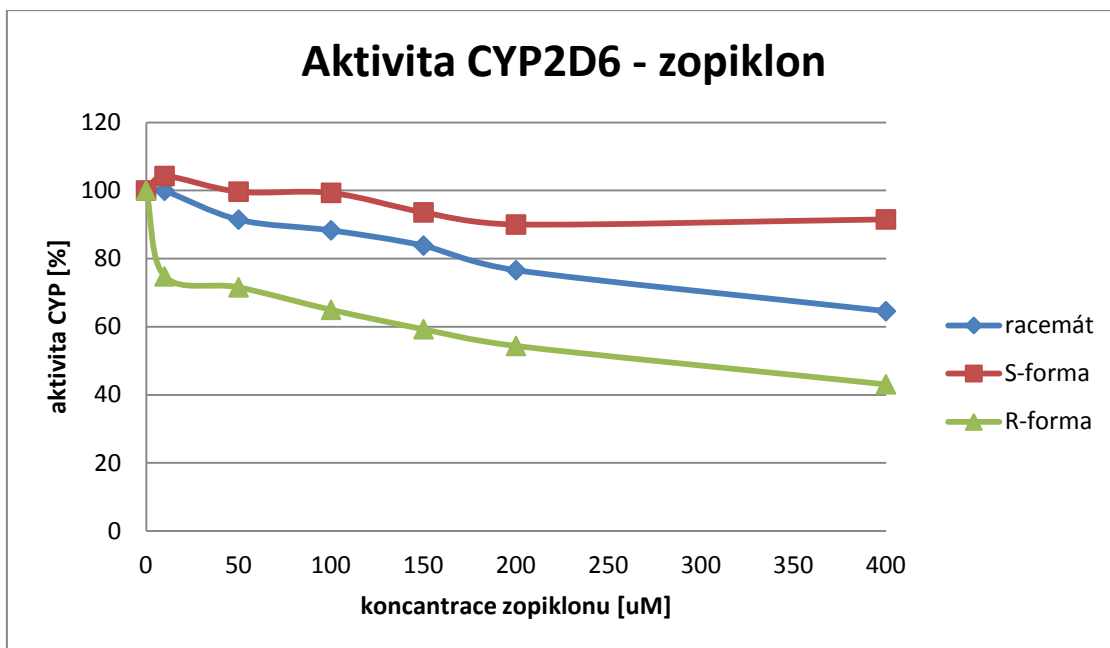
Graf 7: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2B6 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ M.



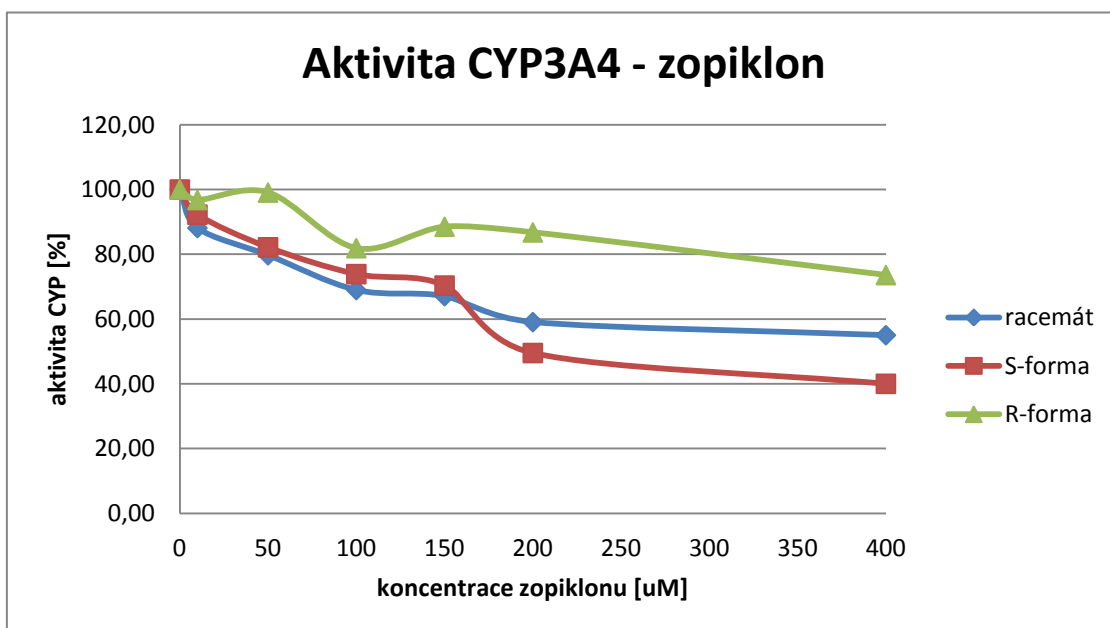
Graf 8: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2E1 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM.



Graf 9: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2C8 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM.



Graf 10: Ovlivnění enzymové aktivity CYP2D6 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μM.



Graf 11: Ovlivnění enzymové aktivity CYP3A4 zopiklonem v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μM.

Významný pokles enzymové aktivity vlivem zopiklonu byl sledován u CYP2C8, CYP2D6 a CYP3A4. Inhibiční vliv na aktivitu enzymu u CYP2C8 a CYP3A4 byl způsoben S formou zopiklonu. V případě enzymu CYP2D6 byla však prokázána inhibice R-formou zopiklonu. Při nejvyšší koncentraci S-zopiklonu došlo k poklesu enzymové aktivity CYP2C8 na 36 %, CYP3A4 na 40 % z původní enzymové aktivity kontrolního vzorku, bez přidání testované látky. Vlivem R-zopiklonu byla aktivita enzymu CYP2D6 snížena na 43 % enzymové aktivity v kontrolním vzorku. Takto významný rozsah inhibice potvrzuje, že zopiklon interaguje s těmito třemi CYP poměrně specificky.

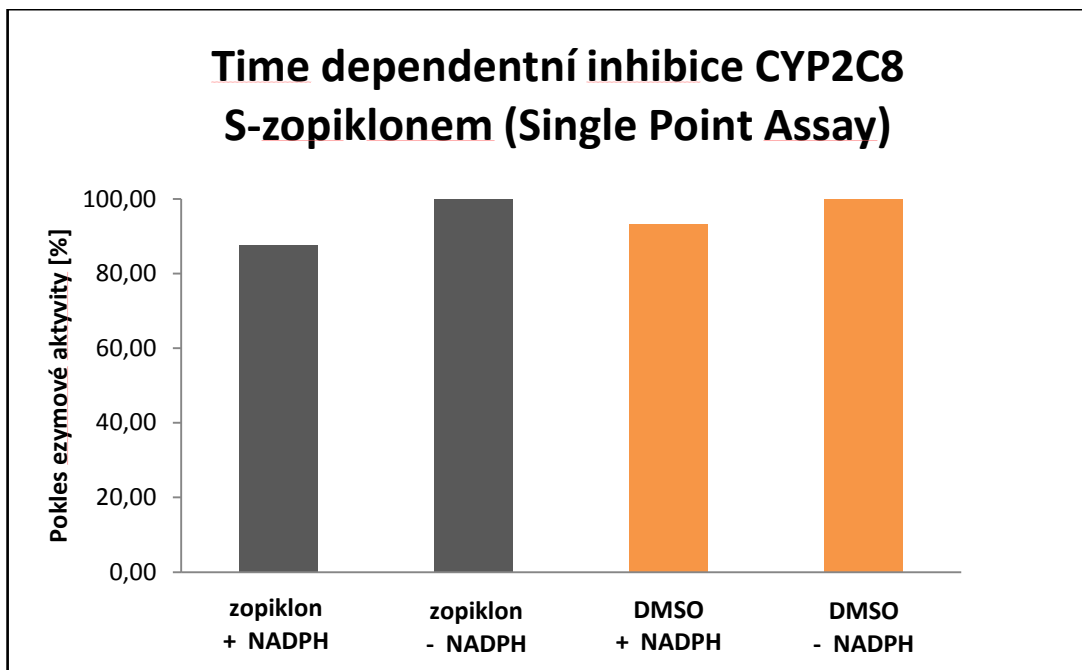
9.1.2 Mechanismus inhibice enzymové aktivity CYP stereoisomery zopiklonu pomocí Single Point Assaye

V předešlých experimentech byl prokázán inhibiční účinek stereoisomerů S a R zopiklonu na aktivitu enzymů CYP2C8, CYP2D6 a CYP3A4. Pro zjištění, zdali se jedná o reversibilní či ireversibilní inhibici enzymové aktivity, byl vybrán screeningový experiment Single Point (time-dependent) Assay (www.cyprotex.com).

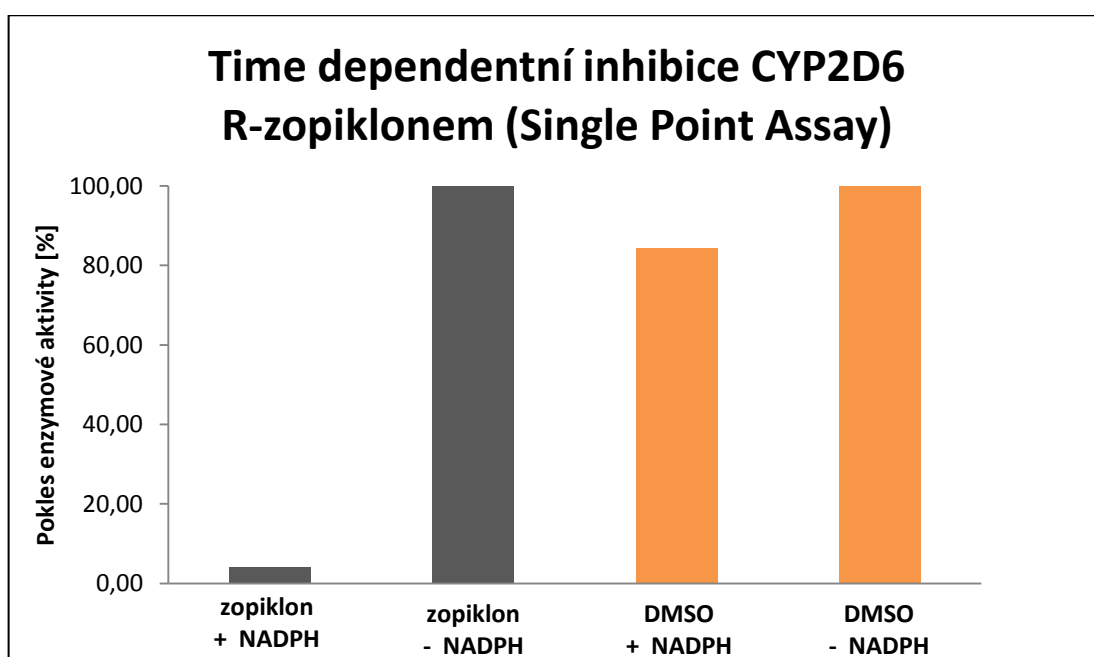
U CYP inhibovaných zopiklonem, byl sledován pokles inhibice ve dvou vzorcích obsahující jednotnou koncentraci inhibitoru, ale s rozdílnou dobou přidání NADPH generujícího systému (u jednoho vzorku nebyl NADPH generující systém přidán do preinkubace). Další dva vzorky, v kterých byl zopiklon nahrazen organickým rozpouštědlem DMSO, sloužily jako kontrola vyloučení vlivu vehikula na enzymovou aktivitu daného CYP.

Enzymová aktivita CYP2C8 je inhibována S formou zopiklonu. Přidáním NADPH generujícího systému do reakční směsi pro preinkubaci klesla aktivita CYP2C8 nevýznamně ve srovnání se vzorkem, do kterého byl NADPH generující systém přidán až po preinkubaci. Procento time-dependentní inhibice činilo zhruba 5,9 %. Taktéž v případě sledování mechanismu účinku inhibice CYP3A4 aktivity S-zopiklonem bylo procento ireversibilní inhibice statisticky nevýznamné. Míra inhibice činila pouze 2,88 %, což naznačuje, že se jedná o kompetitivní inhibici CYP3A4. Naopak u enzymu CYP2D6 byla prokázána významná inhibice R-zopiklonem při přidání NADPH do reakční směsi před preinkubací. Procento enzymové inhibice bylo orientačně 95 %, což naznačuje, že by se v případě inhibice CYP2D6 mohlo jednat o mechanism-based inhibici, či jinými slovy time-dependentní inhibici.

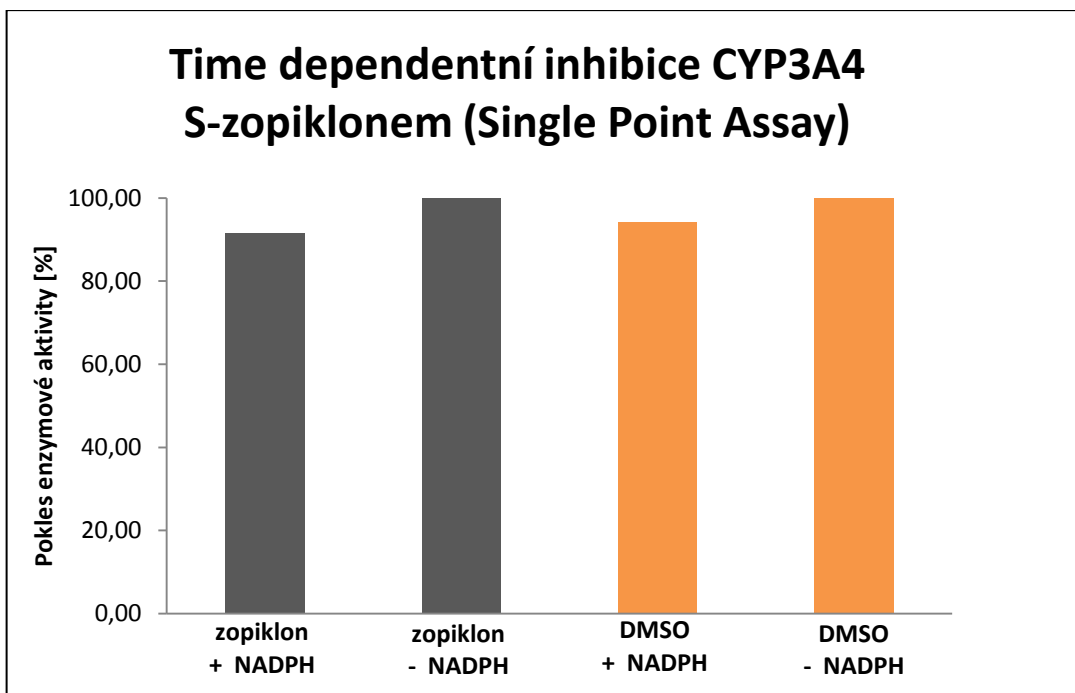
Shrnutí výsledků inhibičního vlivu jednotlivých stereoisomerních forem zopiklonu na specifickou enzymovou aktivitu všech testovaných CYP je graficky znázorněno v Grafech 13 - 15.



Graf 13: Inhibiční vliv S-zopiklonu na specifickou enzymovou aktivitu CYP2C8



Graf 14: Inhibiční vliv R-zopiklonu na specifickou enzymovou aktivitu CYP2D6



Graf 15: Inhibiční vliv S-zopiklonu na specifickou enzymovou aktivitu CYP3A4

10. DISKUZE

Zopiklon patří mezi hypnotika, látky, které se v organismu váží na tlumivé receptory GABA_A, které mají v periferní nervové soustavě myorelaxační účinek a v centrální nervové soustavě hypnotické, antikonvulzivní a další účinky. Zopiklon patří mezi nebenzodiazepinové tzv. Z-látky a je v klinické praxi užívám od roku 2006 jako hypnotikum účinkující na prohloubení spánku a snížení počtu probuzení během doby spánku. Na rozdíl od některých dalších hypnotik jeho účinky nepřesahují do dalšího dne a způsobuje minimální počet vedlejších účinků.

Zopiklon je derivátem cyklopyrrolu obsahující centrum chiralitu, díky němuž se vyskytuje ve dvou stereoisomerních formách - S a R. Avšak vyšší farmakologickou aktivitou, způsobenou také rozdílnou distribucí v mozku disponuje S-zopiklon, který má 50krát větší afinitu k vazbě na GABA_A receptor než R forma zopiklonu (Blaschke *et al*, 1993, Fernandez *et al*, 2002). Zopiklon je metabolizován především v játrech na dva hlavní metabolity - demethylací vzniká farmakologicky neúčinný *N*-desmethyl-zopiklon (ND-Z), oxidací vzniká *N*-oxid zopiklon (NO-Z), který je farmakologicky aktivní (Goa *at* Heel, 1986). V metabolismu zopiklonu hraje významnou roli jaterní mikrosomální CYP3A4 a CYP2C8.

Výzkum se v minulosti zabýval především indukcí a inhibicí metabolismu zopiklonu na úrovni CYP a z něj plynoucích možných lékových interakcí se současně podávanými induktory a případně inhibitory dané formy CYP. Skupina vědců pod vedením Laurenta Becquemonta zjistila, že významný inhibiční vliv na formaci metabolitu zopiklonu ND-Z má především ketokonazol a sulfafenazol. V metabolismu NO-Z je signifikantní inhibiční účinek prokázán pro ketokonazol. Inhibitory CYP1A2, CYP2D6 a CYP2E1 měly jen minoritní efekt na metabolismus zopiklonu. Silným induktorem zapojeným v metabolismu zopiklonu je rifampicim, induktor CYP3A4, který signifikantně zvyšoval eliminaci zopiklonu (Becquemont *et al*, 1999). Tyto výsledky potvrzují možný výskyt nežádoucích mezilékových interakcí zopiklonu se současně podávanými inhibitory či induktory jaterních CYP3A4 a CYP2C8.

Je však nutné zmínit, že doposud nebyl podrobně sledován inhibiční vliv zopiklonu na enzymovou aktivitu jednotlivých forem CYP. Proto bylo zajímavé se v rámci diplomové práce zabývat tímto běžně předepisovaným hypnotikem a jeho možným inhibičním účinkem na enzymatickou aktivitu osmi významných lidských CYP obsažených v jaterních

mikrosomech, které se významnou měrou podílí na biotransformaci běžně předepisovaných léčiv.

V předložené práci byl sledován možný inhibiční vliv racemátu a dvou čistých enantiomerních forem zopiklonu na enzymovou aktivitu následujících osmi CYP: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Ke stanovení aktivity jednotlivých CYP byly použity zavedené metody využívající markerových substrátů na jejichž biotransformaci se podílí jednotlivé jaterní mikrosomální CYP. Experimenty neodhalily žádný inhibiční efekt zopiklonu na aktivitu enzymů CYP2A6 a CYP2C9. V případě CYP1A2, CYP2B6 a CYP2E1 došlo jen ke slabé interakci s R formou zopiklonu. Naopak statisticky významný pokles, tedy inhibiční efekt zopiklonu byl zaznamenán u CYP2C8, CYP2D6 a CYP3A4. Za snížení enzymové aktivity CYP2C8 a CYP3A4 byl zodpovědný S-zopiklon. Zajímavým zjištěním v rámci této diplomové práce bylo to, že také CYP2D6 byl výrazně inhibován v přítomnosti zopiklonu, avšak inhibiční účinek v rámci tohoto CYP enzymu byl vyvolán exkluzivně R formou zopiklonu.

Dalším experimentálním cílem vyplývajícím z výsledků získaných v prvotních experimentech bylo odhalení mechanismu inhibičního účinku jednotlivých enantiomerů zopiklonu na enzymovou aktivitu CYP2C8, CYP3A4 a CYP2D6. Konkrétně se jednalo o zjištění, zdali jednotlivé enantiomery zopiklonu vystupují jako reversibilní či ireversibilní inhibitory těchto tří zmíněných CYP. K tomuto zjištění byl využit tzv. test Single Point Assay pro odhalení time-dependentní inhibice. V případě CYP3A4 a CYP2C8 je již známo, jaké metabolity zopiklonu vznikají. Naše experimenty neprokázaly time-dependentní typ inhibice CYP3A4 a CYP2C8 S-zopiklonem, z čehož je možné usoudit, že vznikající metabolity, *N*-oxid či *N*-desmetyl zopiklon, se kovalentně neváží na aktivní místo enzymu a inhibice CYP3A4 a CYP2C8 je zřejmě reversibilního charakteru. Naopak v případě inhibice CYP2D6 R-zopiklonem bylo prokázáno, že se jedná o time-dependentní mechanismus účinku R-zopiklonu (procentuální míra ireversibilní inhibice byla odhadnuta na 95 %).

Cytochromy P450 jsou skupina enzymů hrající významnou roli v metabolismu léčiv. Proto inhibice lidských CYP je jedním z nejčastějších mechanismů, které mohou vést k nežádoucím mezilékovým interakcím. Mechanismus inhibice může být reversibilní (vratný) nebo ireversibilní, jinými slovy nevratný. Někdy bývají ireversibilní inhibitory nazývány time-dependentní. Tyto ireversibilní inhibitory nazývané také jako tzv. sebevražedné substráty jsou přeměňovány cílovým enzymem na metabolity, které způsobí nevratnou inhibici daného enzymu a nevratně tak změni jeho strukturu. Důsledky nevratné inhibice jsou považovány za

vážnější než v případě reversibilní inhibice, protože inaktivovaný enzym musí být znovu resyntetizován, aby došlo k obnovení jeho aktivity (Riley *et al*, 2007). Navíc, ireversibilní inaktivace obvykle souvisí s vytvořením kovalentní vazby mezi metabolitem a enzymem, což může vést k tvorbě haptenu s potenciálem vyvolat v některých případech autoimunitní odpověď. Je třeba zmínit, že zopiklon je stále celosvětově podáván ve formě racemické směsi, s výjimkou USA, kde se již započalo s distribucí zopiklonu v jeho S formě, která je oproti R formě farmakologicky účinná. Proto zjištění, že R enantiomer zopiklonu interaguje s CYP2D6 ve smyslu jeho potenciální ireversibilní inaktivace, nabízí otázku, zda by tato *in vitro* interakce mohla mít klinický význam pro vyvolání lékových interakcí, je-li zopiklon ve formě racemické směsi podáván současně s dalšími substráty CYP2D6. Další doplňující preklinické testy pro studování inhibičního účinku R-zopiklonu na CYP2D6 aktivitu by měly být provedeny pro doplnění a ověření výsledků získaných v této diplomové práci. Bylo by také vhodné identifikovat strukturu metabolitu zopiklonu, který je zodpovědný za ireversibilní inhibici CYP2D6 enzymu.

Z důvodů vyloučení výskytu závažných lékových interakcí je důležité studovat míru a mechanismus inhibice CYP novými potenciálními léčivy již v počátku jejich farmakologického hodnocení. Zároveň je i vhodné u racemických směsí léčiv testovat interakci čistých enantiomerů léčiva, jsou-li k dispozici, s cílovými strukturami v lidských tkáních.

11. ZÁVĚR

V rámci předložené diplomové práce byly sledovány interakce klinicky užívaného hypnotika zopiklonu a především jeho čistých enantiomerů s významnými biotransformačními enzymy. Cílem experimentální části bylo posoudit možný inhibiční efekt této látky, jak v racemické podobě, tak i ve formě čistých optických isomerů, na enzymovou aktivitu lidských CYP obsažených v jaterních mikrosomech. Inhibiční vliv zopiklonu na markerové aktivity jednotlivých CYP byl testován pomocí zavedených biochemických inhibičních testů s využitím HPLC metody pro detekci markerových metabolitů. V dalším kroku byl dále sledován mechanismus inhibice vybraných CYP jednotlivými enantiomery zopiklonu.

Výsledky experimentální části práce poukázaly na statisticky významný pokles enzymové aktivity CYP2C8, CYP3A4 a CYP2D6 vlivem zopiklonu avšak s rozdílným inhibičním podílem jednotlivých enantiomerů léčiva. S forma zopiklonu inhibovala významně enzymovou aktivitu CYP2C8 a CYP3A4. Naopak aktivita CYP2D6 byla ovlivněna výrazně R-zopiklonem. V případě ostatních jaterních CYP nebyl pozorován statisticky významný inhibiční efekt zopiklonu na jejich enzymovou aktivitu. R-zopiklon je time-dependentním inhibitorem CYP2D6. V případě CYP2C8 a CYP3A4 se jedná zřejmě o kompetitivní typ inhibice.

12. LITERATURA

ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 737 – 747.

BECQUEMONT L., LE BOT M. A., RICHE C., FUNCK-BRENTANO C., JAILLON P., BEAUNE P. (1998): Use of heterologously expressed human cytochromes P4501A2 to predict tanine-fluvoxamine drug interaction in man. *Pharmacogenetics* 8:101-108.

BELELLI D., LAMBERT J. J. (2005): Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nature Reviews Neuroscience* 6:565-575.

BERG J. M., GERRITSEN W. B., HAAS F. J., KELDER H. C., VERHEUGT F. W., PLOKKER H. W. (2002): High-dose aspirin in addition to daily low-dose aspirin decreases platelet activation in patients before and after percutaneous coronary intervention. *Thrombosis Research* 105(5):385-90.

BJORNSSON T. D., CALLAGHAN J. T., EINOLF H. J., FISCHER V., GAN L., GRIMM S., KAO J., KING S. P., MIWA G., NI L., KUMAR G., MCLEOD J., OBACH R. S., ROBERTS S., ROE A., SHAH A., SNIKERIS F., SULLIVAN J. T., TWEEDIE D., VEGA J. M., WALSH J., WRIGHTON S. A. (2003): The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug metabolism and Disposition* 31: 815-832.

BLASCHKE G., HEMPEL G., MULLER, W. E. (1993): Preparative and analytical separation of the zopiclone enantiomers and determination of their affinity to the benzodiazepine receptor binding site. *Chirality* 5: 419-421.

BOWMAN S. E. J., BREN K. L. (2008): The Chemistry and Biochemistry of Heme c: Functional Bases for Covalent Attachment. *Natural Product Reports* 25: 1118-1130.

BUSBY W. F., ACKERMANN J. M., CRESPI C. L. (1999): Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 246 -249.

DESAI H. D., SEABOLT J., JANN M. W. (2001): Smoking in patients receiving psychotropic medications: a pharmacokinetic perspective. *CNS Drugs* 15: 469-494.

DOSTÁLEK M., JUŘICA J., JANOŠTIKOVÁ E., ZAHRADNÍKOVÁ L. (2006): Farmakokinetika. Grada Publishing a.s., Praha 83-124, ISBN: 80-247-1464-7.

DROVER, D. R. (2004): Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of short-acting hypnotics: zaleplon, zolpidem nad zopiclone. *Clinical Pharmacokinetics* 43: 227-238.

DVOŘÁK Z., CVEK B. (2011): Vybrané kapitoly z buněčné biologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, skripta, ISBN: 978-80-244-2724-9.

FERENČÍK M., ŠKÁRKA B., NOVÁK M., TURECKÝ B. (2000): Biochémia, Alfa, Bratislava 881-887.

FERNANDEZ C., ALET P., DAVRINCHE C., ADRIEN J., THUILLIER A., FARINOTTI R., GIMENEZ F. (2002): Stereoselective distribution and stereoconversion of zopiclone enantiomers in plasma and brain tissues in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54: 335-340.

FILPPULA A. M., LAITILA J., NEUVONEN P. J., BACKMAN J. T. (2012): Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates. *British journal of pharmacology* 165: 2787-2798.

FUKASAWA T., SUZUKI A., OTANI K. (2007): Effects of Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 Enzymes on the Pharmacokinetics of Benzodiazepines. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 32: 333-341

GAILLOT J., HEUSSE D., HOUGHTON G. W., MARC AURELE J., DREYFUS J. F. (1983): Pharmacokinetics and metabolism of zopiclone. *Pharmacology* 27: 76-91.

GLASS J., LANCTOT K. L., HERMANN N., SPROULEB. A., BUSTO, U. E. (2005): Sedative hypnotics in older people with insomnia: meta-analysis of risks and benefits. *BMJ* 331:1169.

GOA K. L., HEEL R. C. (1986) Zopiclone: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as an hypnotic. *Drugs* 32:48–65.

GUENGERICH F. P., MACDONALD T. L. (1990): Mechanisms of cytochromes P-450 catalysis unified. *FASEB journal* 4: 2453-9.

GUENGERICH F. P. (2002): Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biological chemistry* 383: 1553-1564.

CHAURET N., GAUTHIER A., NICOLL-GRIFFITH D. A. (1998): Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 26: 1-4.

ISIN E. M., GUENGERICH F. P. (2007): Complex reactions catalyzed by cytochrom P450 enzymes. *Biochemica et Biophysica Acta* 1770: 314-329.

KLINGENBERGR M. (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics* 75: 376-386.

KREMERS P. (2002): In vitro test for predicting drug-drug interactions: the need for validated procedures. *Pharmacology and Toxicology* 91:209-217.

LAZAROU J. L., POMERANZ B. H., CONEY P. N. (1998): Incidence of adverse drug reactions in hospitalised patients: a meta analysis of prospective studies. *Journal of the American Medical Association* 279: 1200-1205.

LE LIBOUX A., FRYDMAN A., GAILLOT J. (1987): Simultaneous determination of zopiclone and its two major metabolites (*N*-oxide and *N*-desmethyl) in human biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 417: 151-158.

LEWIS D. F. V., ITO Y. (2008): Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics, Chapter I: Cytochrome P450 Structure and Function: An Evolutionary, editor: Costas Ioannides, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK; ISBN – 13: 9780854042746.

MARTIGNONI M., GROOTHUIS G. M., DE KANTER R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2: 875 – 894.

NELSON D. R., KAMATAKI T., WAXMAN D. J., GUENGERICH F. P., ESTABROOK R.W., FEYEREISEN R., GONZALEZ F.J., COON M.J., GUNSALUS I.C., GOTOH O., OKUDA K., NEBERT D. W. (1993): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* 12: 1-51.

NEUVONEN P. J. (2010): Drug interaction with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): The importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics. *Current Opinion in Investigational Drugs* 11: 323 – 332.

NOBLE S., LANGTRY H. D., LAMB H. M. (1998): Zopiclone. An update of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the treatment of insomnia. *Drugs* 55: 277-302.

PATOČKA J., DVOŘÁK A. (2004): Chirální léčiva v psychiatrii aneb psychofarmaka před a za zrcadlem. *Psychiatrie* 8: 27-30.

PATOČKA J., DVOŘÁK A. (2006): S-zopiclon - výsledek strategie „chirálního přesmyku“. *Biomedicína* 8: 1-200.

PÁVEK P., DVOŘÁK Z.(2008): Xenobiotic-induced transcriptional of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 9: 129-143.

RILEY R. J., GRIME K., WEAVER R. (2007): Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 3: 51-66.

VACÍK J., BARTHOVÁ J., PACÁK J., STRAUCH B., SVOBODOVÁ M., ZEMÁNEK F. (1999): Přehled středoškolské chemie. SPN - pedagogické nakladatelství, ISBN 80-7235-108-7.

VINKERS CH. H., OLIVIER B. (2012): Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA_A Receptor Modulators? *Advances in Pharmacological Sciences* 2012: 416864.

WELKER H. A., WILTSHIRE H., BULLINGHAM R. (1998): Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clinical pharmacokinetics* 35(6):405-23.

ZHOU S., YUNG CHAN S., CHER GOH B., CHAN E., DUAN W., HUANG M., MCLEOD H. L. (2005): Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clinical Pharmacokinetic* s44(3):279-304.

Internetové zdroje:

http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_us&cid=10049055, 3.2. 2014)

<http://www.labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>, 3.2. 2014

<http://www.drug-interactions.eu/en/phase1.htm>, 7.2. 2014

<http://www.hplc.cz>, 4.2. 2014

<http://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-metabolism/cytochrome-p450-tdi-single-point/>,
11.4.2014

13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CYP	cytochrom P450
UV-VIS	záření v ultrafialové a viditelné oblasti (Ultraviolet–Visible Spectroscopy)
COOH	karboxylová funkční skupina
OH	hydroxylová funkční skupina
NH ₂	aminoskupina
SH	thiolová funkční skupina
RH	substrát
ROH	oxidovaný substrát
ES	komplex enzym-substrát
K _m	Michaelisova konstanta
V _{lim}	limitní rychlost
ND-Z	N-desmethyl-zopiklon
NO-Z	N-oxid-zopiklon
GABA _A receptor	gamaaminomáselná kyselina
REM	fáze spánku - rapid eye movement (rychlé pohyby očí)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
SFC	superkritická chromatografie (Supercritical fluid Chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
PC	plošná papírová chromatografie (Paper Chromatography)

TLC	plošná tenkovrstvá chromatografie (Thin-layer Chromatography)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukovaný
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
MPa	megapascal
RPM	jednotka otáčky za minutu (revolution per minute)
C ₁₈	HPLC kolona s reversní fází C ₁₈