

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2023

Natálie Frankeová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Vliv vybraných přírodních látek na jaterní biotransformační enzymy

Bakalářská práce

Autor: Natálie Frankeová

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.

Rok: 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, kterou cituji. Práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Olomouci dne:

.....

Frankeová Natálie

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Lence Jourové, Ph.D. za její odborné vedení a cenné rady, které mi poskytla v průběhu vypracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. Za její cenné rady, připomínky a předané zkušenosti. Mé poděkování patří také Mgr. Veronice Frýbortové a Mgr. Štefanu Šatkovi za pomoc a rady během práce v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení:	Natálie Frankeová
Název práce:	Vliv vybraných přírodních látek na jaterní biotransformační enzymy
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Školitel:	Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Abstrakt: Lidský organismus je denně vystaven velkému množství cizorodých látek ať bez našeho vědomí či cíleně, a to ve formě léčiv, doplňků stravy atd. V případě, že je do našeho organismu aplikováno více xenobiotik zároveň, může docházet k jejich vzájemné interakci a ovlivnění jejich účinku. Hlavními enzymy podílejícími se na biotransformaci cizorodých látek jsou cytochromy P450 (CYP). CYP jsou zodpovědné za metabolismus až 70 % všech klinicky užívaných léčiv. Nejdůležitějším enzymem je CYP3A4, který je nejhojněji zastoupen v lidských játrech a je schopen metabolizovat až 50 % všech klinicky užívaných léčiv.

Cílem bakalářské práce bylo studium vlivu kyseliny fytové na aktivitu CYP v jaterní mikrosomální frakci lidských jater. Inhibiční experimenty ukázaly, že IP6 v určitých koncentracích snižuje aktivity CYP3A4 až o 50 %, což by mohlo ovlivnit farmakokinetiku a účinnost široké škály klinicky užívaných léčiv.

Klíčová slova:	cytochromy P450, kyselina fytová, metabolismus cizorodých látek
Počet stran:	46
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Natálie Frankeova

Title: Influence of selected natural substances on liver biotransformation enzymes

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Institute of medical chemistry and biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc

Advisor: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: The human organism is daily exposed to a large amount of foreign substances, either without our knowledge or on purpose, in the form of medicine, food supplements etc. When several xenobiotics are applied to our body at the same time, they may interact and their effects may be mutually influenced. The main enzymes involved in biotransformation of foreign substances are cytochromes P450 (CYPs). CYPs are responsible for the metabolism of up to 70% of all clinically used drugs. The most important form is CYP3A4, which is the most abundant in the human liver and metabolizes approximately 50 % of all clinically used drugs.

The aim of the bachelor's thesis was to study the effect of phytic acid on CYP activity in the liver microsomal fraction of human liver. Inhibition experiments have shown that IP6 at certain concentrations reduces CYP3A4 activities by up to 50%, which could affect the pharmacokinetics and efficacy of a wide range of clinically used drugs.

Keywords: cytochromes P450, phytic acid, metabolism of xenobiotics

Number of pages: 46

Language: Czech

Seznam použitých zkratek:

A – absorbance

ABC – adenosine triphosphate – binding cassette (transportní protein)

ACN – acetonitril

AhR – arylový uhlovodíkový receptor

ATP – adenosintrifosfát

c – molární koncentrace

CYP – cytochrom P450

CYPOR – cytochrom P-450 oxidoreduktasa

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FAD – flavinadeninidnuleotid

FMN – flavinmononukleotid

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IDH – isocitrátdehydrogenasa

IP6 – kyselina fytová

KCl – chlorid draselný

KH_2PO_4 – fosfátový pufr (dihydrogenfosforečnan draselný)

MeOH – methanol

MRP2 – protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí

NADP^+ – nikotinamidadeninidnukleotidfosfát

NADPH – nikotinamidadeninidnukleotidfosfát

NAFLD – nealkoholické tukové jaterní onemocnění

OAT – organic anion transporters (transportní protein)

OATP – organic anion transport protein (transportní protein)

OCT – organic cation transporters (transportní protein)

pH – koncentrace vodíkových iontů H^+

PMSF – fenylmethylsulfonylfluorid

RPM – otáčky za minutu

SLC – solute carriers (transportní protein)

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

UDP-glukuronosyltransferasa – uridin 5'-difosfo-glukuronosyltransferasa

UV-Vis – ultrafialovo-viditelná spektroskopie

Obsah

Obsah	9
Cíle.....	11
Úvod.....	12
Teoretická část.....	13
1. Metabolismus cizorodých látek (xenobiotik)	13
1.1 Úvod	13
1.2 Biotransformace xenobiotik v buňce.....	13
1.3 Cytochromy P450.....	14
1.4 Nomenklatura cytochromů P450.....	16
1.5 Nejdůležitější formy cytochromů P450 pro metabolismus léčiv u člověka. 17	
1.5.1 CYP1A	18
1.5.2 CYP2A6	18
1.5.3 CYP2B6	19
1.5.4 CYP2C (2C8, 2C9, 2C19).....	19
1.5.5 CYP2D6	19
1.5.6 CYP2E1.....	20
1.5.7 CYP3A	20
1.6 Lékové interakce	21
2. Cyklitoly	22
2.1 Kyselina fytová.....	22
2.2 Metabolismus kyseliny fytové v lidském organismu.....	24
2.3 Benefity kyseliny fytové na lidský organismus.....	24
Experimentální část.....	26
3. Použité materiály a přístrojové vybavení.....	26

3.1	Enzymové systémy.....	26
3.2	Chemikálie.....	26
3.3	Přístrojové vybavení.....	27
4.	Metody.....	28
4.1	Příprava jaterní mikrosomální frakce.....	28
4.2	Stanovení koncentrace cytochromů P450 v mikrosomální frakci spektrofotometricky.....	29
4.3	Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP.....	29
4.3.1	Stanovení aktivity CYP3A4 1'-hydroxylací midazolamu.....	30
4.3.2	Stanovení aktivity CYP2A6 hydroxylací kumarinu.....	30
4.3.3	Stanovení aktivity CYP2B6 dealkylací pentoxyresorufinu.....	31
5.	Výsledky.....	33
5.1	Stanovení aktivity vybraných jaterních cytochromu P450.....	33
5.1.1	Stanovení aktivity enzymu CYP3A4 1'-hydroxylací midazolamu.....	33
5.1.2	Stanovení aktivity CYP2A6 hydroxylací kumarinu.....	34
5.1.3	Stanovení aktivity CYP2B6 dealkylací pentoxyresorufinu.....	35
	Diskuse.....	37
	Závěr.....	39
	Literatura.....	40

Cíle

Cílem teoretické části předkládané práce bylo vypracovat stručný přehled o metabolismu cizorodých látek se zaměřením na enzymy cytochromy P450, které metabolizují většinu všech klinicky užívaných léčiv u lidí. Dále byla popsána kyselina fytová, která má díky své jedinečné chemické struktuře velký potenciál ve využití ve farmacii a lékařství.

Prvním cílem praktické části bylo osvojení si práci s biologickým materiálem a metody, které slouží ke stanovení aktivit studovaných enzymů. Hlavním cílem praktické části bylo zjistit vliv kyseliny fytové na aktivitu nejdůležitějších enzymů I. fáze biotransformace xenobiotik, cytochromů P450.

Úvod

Lidský organismus je vystaven velkému množství cizorodých látek, které na něj působí. Xenobiotika (cizorodé látky) se mohou dostávat do našeho organismu bez našeho vědomí nebo jsou aplikovány cíleně ve formě léků nebo doplňků stravy. V případě, kdy je do našeho organismu aplikováno více xenobiotik ať cíleně nebo bez našeho vědomí, může mezi jednotlivými látkami docházet ke vzájemným interakcím, a to zejména na úrovni metabolismu¹. Procesem podílejícím se na metabolismu xenobiotik je takzvaná biotransformace, která probíhá v několika fázích a je katalyzovaná především jaterními enzymy s širokou substrátovou specifikou. Samotný proces biotransformace má za cíl snížení toxicity xenobiotik a jejich snadnější vyloučení z organismu².

Mezi nejdůležitější enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik jsou cytochromy P450 (CYP). CYP se řadí mezi skupinu enzymů s monooxygenasovou aktivitou, které se nacházejí především v membráně endoplazmatického retikula ale také v mitochondriích. V lidském organismu jsou CYP zodpovědné za metabolismus 65-70 % všech klinicky užívaných léčiv a významně přispívají také k variabilitě odpovědi pacientů na léčbu³.

Předmětem mého zájmu bylo zjištění vlivu kyseliny fytové (IP6) na tyto enzymy. IP6 se vyskytuje ve velkém množství potravin spojených s vlákninou, jako jsou otruby, luštěniny, zrna, oleje a semena. V dnešní době je také přidávána do kosmetiky, doplňků stravy, a tudíž se do těla může dostávat ve velkém množství. U kyseliny fytové byly prokázány jak pozitivní, tak negativní účinky na lidský organismus. Je tedy nutné se zamyslet, jestli by přítomnost této látky nemohla ovlivňovat také metabolismus léčiv.

Experimentální část je zaměřena na měření aktivity vybraných CYP v přítomnosti různých koncentrací IP6 v mikrosomální frakci izolované z lidských jater.

Teoretická část

1. Metabolismus cizorodých látek (xenobiotik)

1.1 Úvod

Xenobiotika jsou chemické látky, které se mohou dostat do lidského organismu, ale nevyskytují se v něm přirozeně a nejsou jím produkovány. Mezi cizorodé látky, které se dostávají do lidského organismu cíleně, řadíme zejména léčiva nebo doplňky stravy a různé složky výživy. V přírodním prostředí jsou cizorodé látky přítomny také ve formě pesticidů, produktů průmyslové výroby, výfukových látek z dopravních prostředků, mykotoxinů apod. Ty se do lidského organismu, na rozdíl od léku, dostávají nevědomě. Xenobiotika, konkrétně léčiva, mají často lipofilní strukturu, proto je jejich vyloučení z organismu složitější. Obecně lze říct, že průběh vylučování xenobiotik z organismu je závislý na jejich polaritě¹.

Hlavním mechanismem pro udržení homeostázy, během vystavení organismu cizorodým látkám, je proces biotransformace, kdy dochází k přeměně ve vodě nerozpustných nepolárních látek na látky polárnější. Existují také výjimky. Například metylace a acetylace patří mezi biotransformační reakce, které mohou rozpustnost některých xenobiotik ve vodě snižovat. Biotransformace je katalyzována zejména jaterními enzymy, ale mohou se na ni podílet i enzymy jiných tkání. Samotné biotransformace u cizorodých látek se účastní jen omezený počet enzymů se širokou substrátovou specifitou. To umožňuje enzymům, které metabolizují xenobiotika metabolizovat mimo jiné i velké množství endogenních látek, mezi které řadíme mastné kyseliny, žlučové kyseliny, aceton, také steroidní hormony či některé vitamíny³.

1.2 Biotransformace xenobiotik v buňce

Biotransformace xenobiotik je rozdělena do tří fází. Jen několik xenobiotik je vyloučeno v nezměněné formě, bez jakékoliv metabolické degradace. Reakce I. fáze, kdy dochází převážně k oxidaci, se účastní několik enzymových systémů.

Nejvýznamnější jsou enzymy nazývané cytochromy P450. Reakce II. fáze biotransformace jsou katalyzovány např. glutathion S-transferasami a UDP-glukuronosyltransferasami. Dochází zde ke konjugaci cizorodé látky s endogenní látkou a vznikající produkty jsou většinou biologicky neaktivní⁴. Po dokončení I. a II. fáze biotransformace dochází ke vzniku polárnějších, ve vodě rozpustných metabolitů, které jsou vhodným substrátem pro membránové transportní proteiny. Tyto „transportéry“ jsou důležité pro přenos xenobiotik přes buněčnou membránu do buňky a po metabolické přeměně mimo buňku. Tento proces je někdy též označován jako III. fáze biotransformace⁵. Mezi transportní proteiny řadíme ABC a SLC (z angl. solute carriers) transportní proteiny⁶. Mezi ABC proteiny řadíme např: P-glykoproteiny proteiny odpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci (MRP2).

Ve většině případů vedou biotransformační reakce ke snížení toxicity xenobiotika a usnadnění vyloučení z organismu. V určitých případech může však dojít ke vzniku toxických nebo karcinogenních produktů.

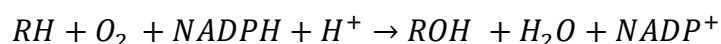
1.3 Cytochromy P450

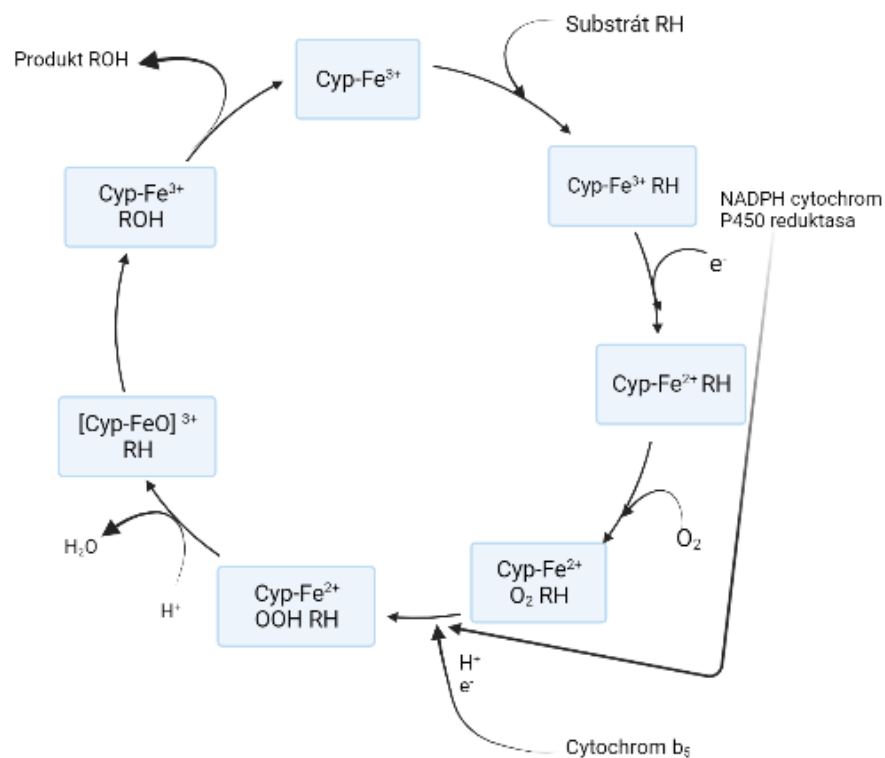
Nejdůležitějšími biotransformačními enzymy I. fáze jsou cytochromy P450 (CYP). Tyto enzymy se vyskytují od bakterií, rostlin a živočichů až k lidskému organismu⁷. Prvním, kdo publikoval výsledky získané při studiu CYP, byl v roce 1958 Martin Klingenberg, který studoval spektrofotometrické vlastnosti pigmentů u mikrosomálních frakcí, které připravoval z potkaních jater. Ve stejném roce popsal tento pigment v prasečí mikrosomální frakci také D. Garfinkel. Část názvu „P450“ vychází ze schopnosti redukované formy CYP v komplexu s CO absorbovat světlo o vlnové délce 450 nm (u jednotlivých forem to může být v rozmezí 447- 452 nm)⁸.

U eukaryotických buněk existují CYP jako membránově vázané hemoproteiny, kdy každý obsahuje přibližně 500 aminokyselin a ferroporphyrin IX, který slouží jako prostetická skupina. To, čím se odlišují CYP od ostatních buněčných hemoproteinů, je úloha thiolové skupiny cysteinu. Funkce thiolové skupiny jako pátého ligandu železa protoporphyrinu IX spočívá v ovlivnění distribuce elektronové hustoty (přesněji v donaci elektronové hustoty do molekulových orbitalů původem z protivazebných orbitalů molekulárního kyslíku navázaného na hemové železo). Po dodání dvou dalších elektronů do reakce (v průběhu katalytického cyklu, viz dále Obr. 1) dojde k rozštěpení navázaného

dikyslíku na atom, který tvoří s dvěma protony molekulu vody, a na druhý atom, který je radikálem a vstoupí do molekuly substrátu (tj. výsledkem je hydroxylovaná molekula substrátu).

CYP patří mezi skupinu enzymů s monooxygenasovou aktivitou, které se nacházejí především v membráně endoplazmatického retikula a také v mitochondriích. Ve většině případů CYP katalyzují reakce oxidativní přeměny substrátu, nejčastěji se jedná o hydroxylace. S CYP působí v endoplasmatickém retikulu také flavoprotein NADPH:cytochrom P-450 oxidoreduktasa (CYPOR). Pro reakce katalyzované CYP jsou dále nezbytné NADPH, kyslík, FAD, FMN, cytochrom b_5 a fosfolipidy⁹. Oxidace substrátu katalyzovaná CYP enzymy probíhá sledem cyklické série reakcí (Obr. 1). Nejdříve se substrát váže do vazebného místa pro substráty, které je součástí aktivního místa spolu s hemem obsahujícím železo v oxidované formě. Následně dochází k jednoelektronové redukci železa přenosem elektronu z NADPH pomocí CYPOR. V dalším kroku je molekulární kyslík navázán na komplex RH-(Fe²⁺) za vzniku ternárního komplexu. Dále je na ternární komplex prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (nebo NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasy a cytochromu b_5) přenesen druhý elektron a v následujícím kroku dochází k uvolnění molekuly vody. Dalším krokem je navázání atomu kyslíku na substrát za vzniku hydroxylovaného produktu a regenerované oxidované formy CYP. Monooxygenasovou reakci katalyzovanou CYP lze zapsat souhrnnou rovnicí:

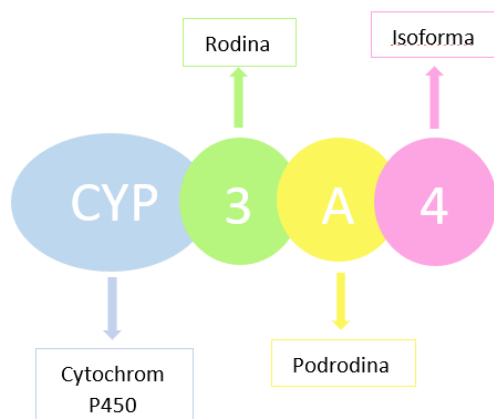




Obr. 1: Schématické znázornění katalytického cyklu cytochromů P450. RH, substrát; ROH, hydroxylovaný produkt⁹.

1.4 Nomenklatura cytochromů P450

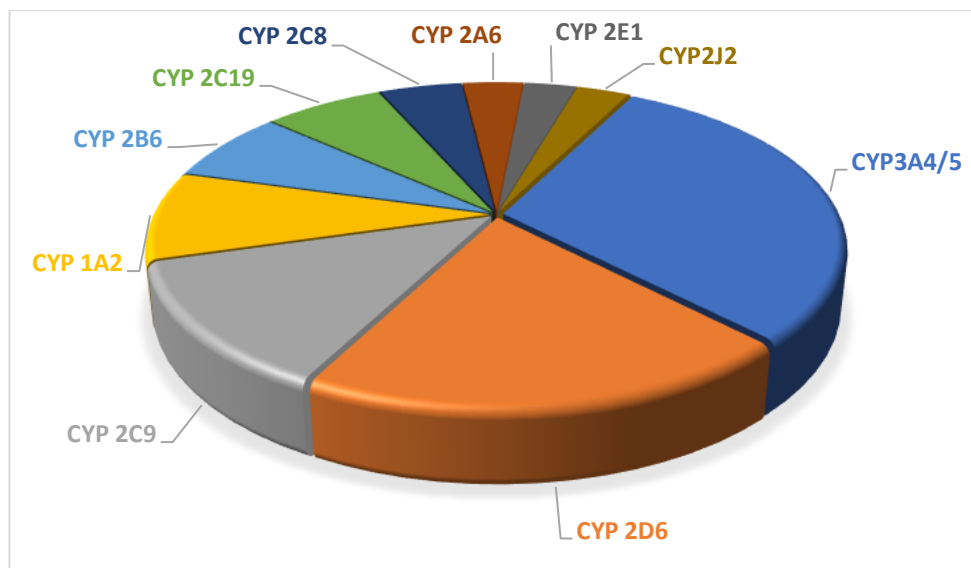
Pro přehlednost má nomenklatura CYP definovanou strukturu a enzymy jsou vhodně uspořádány do rodin a podrodin podle podobnosti sekvence aminokyselin. Názvy CYP jsou postupně uváděny v pořadí číslo – písmeno – číslo, kdy je prvním číslem označovaná rodina CYP. Enzymy patřící do stejné rodiny musí vykazovat podobnost aminokyselinové sekvence minimálně 40%. Následující písmeno označuje podrodinu CYP, která je dána podobností aminokyselinové sekvence a to z 55 % a výše. Konečné číslo popisuje individuální členy v rámci rodin či podrodin (Obr. 2)¹⁰.



Obr. 2: Systematické názvosloví CYP (upraveno podle Furge a Guengerich, 2006¹¹⁾)

1.5 Nejdůležitější formy cytochromů P450 pro metabolismus léčiv u člověka

V lidském organismu je možné nalézt 57 aktivních genů CYP, které jsou rozděleny do 18 rodin. Za metabolismus přibližně 65-70 % všech klinicky užívaných léčiv jsou zodpovědné CYP z rodiny zahrnující CYP 1-3. Lidské CYP jsou zastoupeny především v játrech. V nižších koncentracích je lze detekovat také v ledvinách, gastrointestinálním traktu, plicích, mozku a kůži. Nejdůležitější formou CYP pro metabolismus léčiv u člověka, a zároveň nejhojněji zastoupenou formou v játrech je CYP3A4, který je zodpovědný za metabolismus téměř 50 % léčiv. Mezi další významné formy, které se účastní metabolismu léčiv, řadíme CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A5². Výskyt každého CYP je ovlivněna jedinečnou kombinací mechanismů a faktorů, včetně genetického polymorfismu, indukce xenobiotiky, regulace hormony nebo cytokiny během onemocnění, také pohlavím, věkem atd¹². Zastoupení významných CYP v lidských játrech je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3: Procentuální rozdělení klinicky významných forem CYP v lidských játrech¹²

1.5.1 CYP1A

Důležitým členem rodiny CYP1A je CYP1A1, který je považován za hlavní enzym zprostředkovávající oxidaci a metabolickou aktivaci některých prokarcinogenů (např. polycyklické aromatické uhlovodíky nebo nitrosaminy) na reaktivní metabolity¹⁰. Podílí se na oxidačním i redukčním metabolismu různých látek, včetně léčiv, xenobiotik a chemických látek z životního prostředí. CYP1A1 je poměrně selektivně exprimován v extrahepatálních tkáních¹³.

CYP1A2 je důležitým biotransformačním enzymem z hlediska metabolismu léčiv, který tvoří okolo 13 % z celkového obsahu jaterních CYP. Je konstitutivně vysoce exprimován v játrech a je indukovaletný v játrech, plicích, zažívacím traktu, mozku či slinivce břišní. Je známo přes 100 substrátů CYP1A2, a to včetně velkého množství klinicky významných léků, prokarcinogenů či endogenních substrátů. CYP1A2 je zodpovědný za primární metabolizování kofeinu, proto je kofein využíván jako lék k hodnocení aktivity tohoto cytochromu *in vivo*. Ke studiím *in vitro* bývá využíván jako specifický marker aktivity fenacetin¹⁴. Expres obou forem CYP1A1 a CYP1A2 je v těle regulována aryluhlovodíkovým receptorem (AhR).

1.5.2 CYP2A6

CYP2A6 je převážně jaterním enzymem (zaujímá ~ 4 % všech CYP). Samotný enzym má prostorově omezené aktivní místo pro substrát, proto je schopen metabolizovat pouze

menší molekuly xenobiotik. Pro CYP2A6 jsou typickými substráty nikotin a kumarin¹⁵. Gen kódující protein CYP2A6, je vysoce polymorfní a genetická variabilita CYP2A6 je spojena s různou rychlostí metabolismu nikotinu *in vitro* a *in vivo*¹⁶.

1.5.3 CYP2B6

Lidský enzym CYP2B6 je sice v játrech zastoupen v relativně nízkém množství (3-6 % z celkového obsahu jaterních CYP), mezi jeho substráty však patří několik klinicky významných léčiv (např. bupropion, methadon, cyklofosfamid, ketamin) a látek znečišťující životní prostředí (např. polychlorované a polybromované bifenyly)¹⁷. Expres CYP2B6 je vysoce variabilní mezi jednotlivci vlivem genetického polymorfismu a dalších faktorů, což může vést ke změnám metabolismu výše zmíněných léčiv, nežádoucím účinkům nebo selhání léčby¹⁸.

1.5.4 CYP2C (2C8, 2C9, 2C19)

Podskupina CYP2C je klinicky významná, jelikož metabolizuje řadu klinicky podávaných léků¹⁹. U člověka byly identifikovány celkem čtyři členové této podrodiny, a to CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19. CYP2C se vyskytuje převážně v játrech, ale nachází se také v ledvinách, mozku, děloze a dvanáctníku. CYP2C9 je důležitý pro metabolismus některých terapeuticky užívaných látek, včetně antikoagulačního léku warfarinu a řady protizánětlivých nesteroidních léků²⁰. CYP2C19 metabolizuje řadu běžně předepisovaných léků, jako jsou antiepileptika S-mefenytin a diazepam, inhibitory protonové pumpy např. omeprazol, a také antidepressiva první a druhé generace. Typickým znakem této podrodiny je výrazný genetický polymorfismus, který komplikuje využití určitých léčiv¹⁹.

1.5.5 CYP2D6

CYP2D6 představuje jen malou část všech CYP v játrech, přesto je jeho role v metabolismu léčiv poměrně důležitá, jelikož je schopen metabolizovat až 25 % léčiv²¹. Mezi substráty CYP2D6 řadíme tricyklická antidepressiva (např. desipramin), selektivní inhibitory serotoninových receptorů (např. paroxetin), β -blokátory (např. metoprolol) opioidní analgetika (např. kodein) a protinádorové látky (např. tamoxifen). Metabolismus léčiv zprostředkovaný CYP2D6 vykazuje velkou interindividuální variabilitu danou výhradně genovým polymorfismem²².

1.5.6 CYP2E1

CYP2E1 má mezi lidskými CYP výjimečné postavení v jaterní patofyziologii. Má totiž zásadní význam pro výskyt různých akutních a chronických jaterních onemocnění, které jsou vyvolány léky, toxickými látkami a nadměrným užíváním alkoholu²³. V tomto prostředí vytváří CYP2E1 reaktivní metabolity vyvolávající oxidační stres, mitochondriální dysfunkci a buněčnou smrt. Také hrají roli při procesu ztukovatění jater, které souvisí s obezitou. Zvýšená aktivita CYP2E1 u nealkoholického ztukovatění jater (NAFLD) vyvolává nadprodukcii reaktivních forem kyslíku, což následně vyvolává oxidační stres, zánět a fibrózu²⁴. Jaterní CYP2E1 katalyzuje biotransformaci jak endogenních molekul, tak exogenních molekul. U endogenních může metabolizovat aceton, což je jedna ze tří ketolátek, které vznikají při mitochondriální β -oxidaci mastných kyselin²⁵. Dále metabolizuje glycerol a různé mastné kyseliny včetně nasycených mastných kyselin C12-C18 a některé polynenasycené mastné kyseliny (kyselina arachidonová, epoxyeikosatrienová)^{25,26}. Mezi léčiva, která jsou tímto enzymem katalyzovaná, patří paracetamol, těkavá anestetika (halotan, enfluran, isofluran), nesteroidní protizánětlivá léčiva (kyselina salicylová), a antiepileptika (kyselina valproová)^{27,28}. Mezi toxické látky z přírodního prostředí se řadí tetrachlormethan, vinylchlorid, styren, thioacetamid a různé nitrosaminy^{25,28}. Biotransformací většiny uvedených xenobiotik, která je zprostředkována CYP2E1 vznikají toxické metabolity^{27,29}.

1.5.7 CYP3A

CYP3A je enzymovou podrodinou, která se u člověka vyskytuje ve čtyřech formách a to CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43. Enzymy CYP3A jsou zodpovědné za zhruba tři čtvrtiny všech reakcí metabolizujících léčiva v lidském těle a podílí se také na metabolismu steroidních hormonů, žlučových kyselin, leukotrienů, eikosanoidů a polynenasycených mastných kyselin^{30,31}. Aktivita CYP3A může být ovlivněna antropogenními chemickými látkami z životního prostředí (organofosfáty, parabeny, karbamáty, UV stabilizátor)^{32,33}. Také přírodní látky obsažené v potravinách např. flavonoidy mohou ovlivnit aktivitu enzymů CYP3A. Nejdůležitější formou, které tvoří přibližně 30 % celkových jaterních CYP a metabolizuje přibližně 50 % všech klinicky užívaných léčiv, je CYP3A4. Jeho význam je dán širokým spektrem substrátů, které metabolizuje, díky dostatečně velkému a flexibilnímu aktivnímu místu³⁴. Mezi substráty

CYP3A4 se řadí statiny, antidepresiva, imunosupresiva (např. cyklosporin A, takrolimus), protirakovinné léky (např. taxol) a mnoho dalších^{12,3}. Forma CYP3A4 je také zodpovědná za několik klinicky významných interakcí, o kterých bude zmínka v následující kapitole.

1.6 Lékové interakce

Lékovou interakci je možné definovat jako změnu účinku léčiva, která je následkem současného podávání léku jiného, nebo podáním látky v potravě (např. flavonoidy z grapefruitového džusu) nebo zvykem (např. kouřením, indukujícím CYP1A2 se všemi důsledky)³⁵. Znalost osudu léčiva a zapojení konkrétní formy CYP při jeho metabolismu jsou tedy velmi důležité s ohledem na možné lékové interakce. K interakcím mezi léčivy dochází relativně často a je skutečností, že mohou vést ke vzniku nežádoucích až toxických účinků léčiva nebo ke snížení jeho terapeutického účinku, a tedy k selhání léčby³⁶.

Míra, do jaké inhibitory ovlivňují metabolismus léčiv, závisí na faktorech, jako je dávka a schopnost inhibitoru vázat se na enzym. Léčivo může být metabolizováno stejným enzymem a zároveň jej inhibovat nebo být metabolizováno jedním enzymem a jiným být inhibované. Léčiva mohou být také záměrně kombinovaná, aby se využilo inhibice CYP³⁷. Inhibiční mechanismus může být reversibilní i ireversibilní. Ireversibilní mechanismus může vést k tvorbě reaktivních metabolitů, což vede k trvalé ztrátě enzymové aktivity do doby, než dojde k syntetizování nových enzymů³⁸.

Induktory zvyšují aktivitu enzymu CYP, tím napomáhají zrychlení metabolismu léčiva a snižují jeho plazmatické hladiny. S tím souvisí snížení terapeutického účinku, který je způsoben indukci exprese odpovídajícího CYP. Indukcí dochází ke zvýšení syntézy enzymu nebo může dojít ke zvýšení aktivity (vzácně) též stabilizací struktury příslušného enzymu. Příkladem indukce je indukce CYP3A4 v přítomnosti barbiturátu nebo indukce CYP3A, CYP2C v přítomnosti karbamazepinu. Ke zvýšení aktivity CYP dochází zvýšenou transkripcí příslušného genu, která je vyvolaná induktorem. Najdeme zde také výjimku, kterou je CYP2E1, který je indukován stabilizací enzymu při posttranslační modifikaci^{2,39,40}.

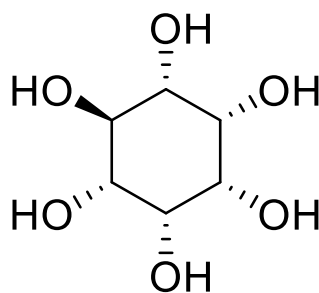
Je prokázáno, že variace v genech pro enzymy CYP přispívá k interindividuálním rozdílům v sérových koncentracích substrátu léčiv. To vede k jejich variabilitě mezi

jednotlivými pacienty, jak z pohledu účinku, tak bezpečnosti léčiv. U několika typů CYP byl ještě navíc objeven funkční polymorfismus, tedy přítomnost více variant jedné formy CYP (lišících se aktivitou) v důsledku existence variantních alel. Těmito souvislostmi a důsledky se zabývá farmakogenetika⁴¹. Biotransformace je pro pochopení metabolických drah a potenciální interakce nových kandidátů na léčiva s jinými léky jedním z nejdůležitějších ukazatelů v preklinických studiích při procesu objevování léčiv. Jsou zde zkoumány jak *in vitro*, tak i *in vivo* modely živočišných druhů, u nichž jsou zkoumány hlavní farmakokinetické, farmakodynamické a toxikologické profily⁴².

Nedílnou součástí výzkumu léčiv jsou studie lékových interakcí mezi jednotlivými léčivy, avšak interakce mohou nastat i v kombinaci léčiva s doplňkem stravy či stravou samotnou.

2. Cyklitoly

Cyklitoly jsou řazeny mezi sacharidy, které ve své struktuře obsahují pouze hydroxylové skupiny a mají cyklickou strukturu. Nejznámější cyklitol myo- inositol se ve volné formě vyskytuje prakticky ve všech rostlinách. Mimo izomeru myo- existuje dalších, celkem osm izomerů (např. chiro-, neo-, allo-, cis-), navzájem se od sebe lišících orientací hydroxylových skupin vzhledem k cyklohexanovému kruhu. U těchto izomerů však není prokázána biologická aktivita. Izomer myo- inositol má strukturu v rovinné symetrii, díky tomu nevykazuje žádnou optickou aktivitu (Obr. 4)⁴³.

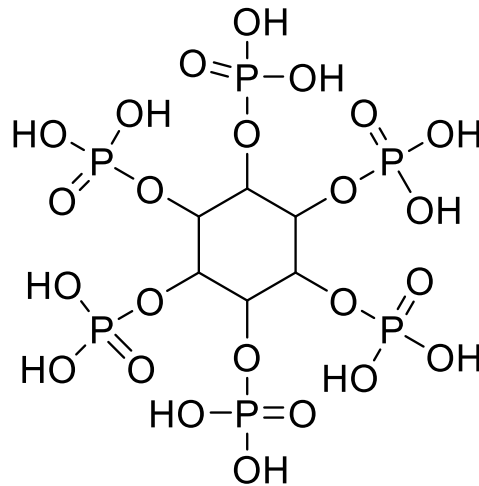


Obr. 4: Struktura izomeru myo- inositolu

2.1 Kyselina fytová

Kyselina fytová neboli myo- inositol-1,2,3,4,5,6- hexakisfosfát (IP6), je esterem myo- inositolu a kyseliny fosforečné. Jak ze struktury IP6 vyplývá, jedná se o 12 sytnou

sloučeninu (Obr. 5), díky čemuž má velkou kapacitu vázat různé kationty. IP6 je přirozeně vyskytuje v podobě draselných a hořečnatých solí označovaných fytáty nebo vápenato-hořečnatých solí označovaných jako fytin. Ve formě fytinu se IP6 vyskytuje ve většině rostlin s nejvyšší koncentrací v semenech a zrnech⁴⁴.



Obr. 5: Struktura kyseliny fytové

2.2 Metabolismus kyseliny fytové v lidském organismu

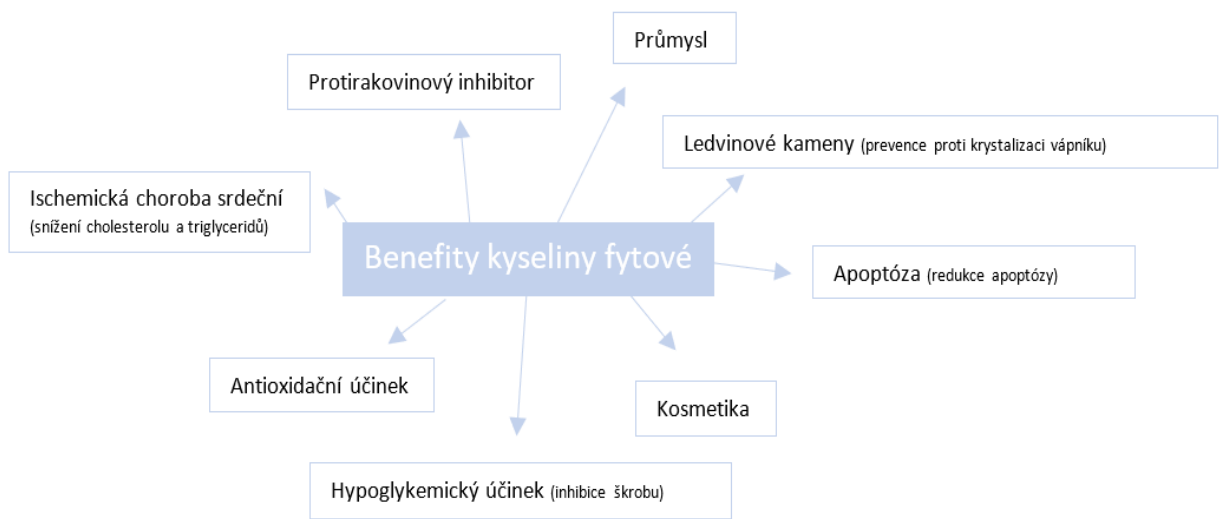
IP6 se nachází v rostlinách a rostlinných produktech využívaných mimo jiné k výživě zvířat. Hojně se vyskytuje v rostlinách a potravinách spojených s vlákninou, jako jsou otruby, zrna, luštěniny, ořechy, oleje a semena. Vliv IP6 v metabolických procesech začíná již v trávicím traktu, kdy reaguje se složkami obsaženými v střevním lumen. Nejčastěji pozorovaný negativní vliv IP6 je inhibice vstřebávání některých hlavních i stopových prvků obsažených v trávicím traktu, což může vést k deficitu minerálů v těle a rozvoji například anemických onemocnění. Dalším důležitým aspektem je interference IP6 s procesy trávení, čímž dochází k inhibici degradace proteinů. Tento aspekt souvisí s její jedinečnou strukturou, která ji umožňuje vázat se s bílkovinami v širokém spektru pH. V kyselém prostředí, kdy je pH kyseliny pod izoelektrických bodem bílkoviny, dochází ke vzniku vazby mezi záporně nabitými fosfátovými zbytky IP6 s kladně nabitými aminoskupinami aminokyselin, z nichž se protein skládá. Zvyšováním pH se mění nejen náboj na bílkovině ale také povaha vazeb. Záporně nabitě karboxylové zbytky bílkovin se váží skrze záporně nabitě fosfátové zbytky IP6 přes multivalentní kovové kationty⁴⁵. Afinita kyseliny fytové k různým bílkovinám se liší na základě mnoha faktorů, mezi které řadíme složení aminokyselin bílkoviny a uspořádání bílkovinné molekuly, která určuje dostupnost určitých aminokyselinových zbytků⁴⁶. Vazba IP6 s bílkovinami vede k tvorbě komplexů, které jsou charakteristické nízkou rozpustností v pH tenkého střeva. Bílkoviny v těchto komplexech se stávají méně náchylné k degradaci proteolytickými enzymy^{46,47}.

2.3 Benefity kyseliny fytové na lidský organismus

Metabolit IP6, inositol-1, 4, 5-trifosfát (IP3), hraje významnou roli v podobě druhého posla během buněčné signalizace. Vysoká koncentrace IP6 zabraňuje hnědnutí a hnilobě některých druhů ovoce a zeleniny tím, že inhibuje enzym polyfenoloxidasu a využívá se tedy jako aditivum v potravinářském a kosmetickém průmyslu. V poslední době silně roste zájem o použití IP6 také v medicíně při terapii různých onemocnění, především díky jejím protizánětlivým, antibakteriálním, antioxidačním a antinádorovým účinkům. Ochranné

účinky IP6 byly popsány u patologických stavů, jako jsou neurodegenerativní onemocnění, rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění^{48,49}. V neposlední řadě byl také prokázán hepatoprotektivní vliv IP6 především na steatotické onemocnění jater u potkanů⁵⁰.

Její vliv na metabolismus léčiv v játrech a možná interakce s biotransformačními enzymy zatím nebyly zkoumány.



Obr. 6: Benefity kyseliny fytové pro lidský organismus

Experimentální část

3. Použité materiály a přístrojové vybavení

3.1 Enzymové systémy

Jako enzymové systémy byla použita lidská jaterní mikrosomální frakce. Lidská mikrosomální frakce byla připravena standartními postupy frakční centrifugací. Játra byla obdržena od multiorgánových dárců a použita po schválení Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se zákonem č. 285/2000 Sb.

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly p.a. čistoty, vhodné pro experimenty s biologickým materiálem a pro enzymová stanovení.

Sigma Aldrich (Praha, CZ): nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADP⁺), kyselina DL–isocitronová (ISO), kumarin, Trizma base (Tris), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH₂PO₄ · 2 H₂O), pentoxyesorufin, isocitrátdehydrogenasa (IDH), glycerol

Lach – Ner (Neratovice, CZ): dihydrogenfosforečnan draselný (K/PO₄), síran hořečnatý (MgSO₄), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina octová (CH₃COOH), octan sodný (CH₃COONa), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), chlorid draselný (KCl), dithioničitan sodný (Na₂S₂O₄),

Merck (Praha, CZ): methanol (CH₃OH)

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

Abcam (Cambridge, Spojené království): midazolam

Penta chemicals (Praha, CZ): dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄ · 12 H₂O),

VWR International (Stříbrná Skalice, CZ): acetonitril (ACN)

3.3 Přístrojové vybavení

Zařízení pro přípravu čisté a ultračisté vody Watrex Ultrapur (Wartex, Praha, CZ),

pH metr Schott CG 843 (Fischer Scientific, Pardubice, CZ),

pH metr XS Instruments pH 50 (Carpi, Italy),

Analytické váhy GR-202 (Schoeller Instruments, Praha, CZ),

Magnetická míchačka s ohřevem IKA RH digital, Merci (Brno, CZ),

Třepačka typu „vortex“ V-1plus, Biosan (Riga, Lotyšsko)

Ultrazvuková lázeň UCC4, Notus-Powersonic (Vráble, SK),

Termomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Německo),

Ponorný homogenizátor *Ultra-Turrax T 25 basic* (IKA-Werke, Německo)

UV – Vis spektrofotometr TECAN Infinite M200, Schoeller Instruments (Praha, CZ),

Membránové filtry Pall Corporation, hydrophilic polypropylene membrane filters 100 IPK,

Chlazená centrifuga LISA, AFI Group (Château-Gontier, Francie)

Chlazená centrifuga Z 323 K, Hermle LaborTechnik GmbH (Wehingen, Německo),

Ultracentrifuga Optima XPN-90, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

Ultrazvuková lázeň UCC4, Notus-Powersonic (Vráble, Slovensko)

HPLC, Řídící jednotka (Shimadzu sstem controller SCL-10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japonsko), kolona LichroCART 250 - 4 s náplní LiChrosper 100 RP-18, velikost částic 5 μm (Merck, Praha, CZ), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO – 10AC, Japonsko), odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu degasser DGU – 20A5, Japonsko), UV/Vis detektor (Shimadzu, UV-VIS detector SPD- 10A, Japonsko), fluorimetrický detektor (Shimadzu diode array detector SPD – 10A, Japonsko), autosampler se smyčkou 50 μl (Shimadzu autoinjektor SIL – 10ADVP, Japonsko), pumpa (Shimadzu liquid chromatography LC – 10AT, Japonsko)

4. Metody

4.1 Příprava jaterní mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce z lidských jater je získávána pomocí frakční centrifugace jaterního homogenátu. Po celou dobu práce s játry jsou všechny kroky prováděny na ledu a v chladicí místnosti. Použité nástroje i přístroje musí být před prací vychlazeny. Nejprve se játra zváží a nastříhají nůžkami v homogenizačním pufru o složení 0,25 mol/l sacharóza a 1 mmol/l EDTA o pH 7,4 s přísávkem 0,2 mol/l PMSF v isopropanolu, který funguje jako inhibitor proteáz. Pufr s játry se slije přes gázu, a ještě dvakrát se játra homogenizačním pufrem promyjí. Po promytí se k 1 g jater přidá trojnásobné množství homogenizačního pufru. Následně se část jater přemístí do plastové zkumavky za pomoci pinzety, přidá se homogenizační pufr a homogenizuje se ponorným homogenizátorem třikrát maximálně 10 s. Získaný homogenát se přelije do větších (50 ml) plastových zkumavek (falkonek), které se po vyvážení centrifugují ve velké centrifuze 10 min. při 5290x g, která je vychlazená na 4° C. Vzniklý supernatant se opatrně odlije do čisté plastové zkumavky a opět se centrifuguje, tentokrát při 15150x g, 25 min. při 4° C. Vzniklý supernatant se opatrně slije do ultracentrifugačních zkumavek, které je opět potřeba důkladně vyvážit. Po vyvážení centrifugujeme při 125000x g, 60 minut při 4° C. Po centrifugaci se získaný supernatant odstraní, jelikož mikrosomální frakce je sediment. Sediment se opatrně setře skleněnou tyčinkou a přidá se promývací pufr (0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l KCl, pH 7,4, 0,2 mol/l PMSF). Sediment s pufrem se homogenizuje a opět přelije do čisté ultracentrifugační zkumavky, která je doplněná promývacím pufrem tak aby po uzavření nebyla ve zkumavce žádná vzduchová bublinka. Centrifuguje se opět při 125000x g, 60 min při 4° C. Získaný supernatant se odlije a sediment se znovu, pomocí skleněné tyčinky opatrně přesune do čisté zkumavky. Do zkumavky se přidá rehomogenizační pufr (0,02 mol/l KH₂PO₄, 0,25 mol/l EDTA, 20 % (v/v) glycerol, pH 7,4) v takovém objemu, aby byl jeho objem 0,2 x násobek váhy jater. Zhomogenizované mikrozomy se rozpipetují do mikrozukumavek a zamrazí na -79° C.

4.2 Stanovení koncentrace cytochromů P450 v mikrosomální frakci spektrofotometricky

Koncentrace CYP v mikrosomální frakci se stanovuje pomocí spektrofotometrického měření (500–400 nm) po redukci dithioničnanem sodným a následným navázáním oxidu uhelnatého. Získaná frakce z lidských jater se nejprve 20 x zředí pomocí fosfátového pufru (100 mmol/l, pH 7,4) a následně se zredukuje přidávkem ditioničitanu sodného. Roztok se následně rozdělí do dvou kyvet, které se poté vloží do dvoupaprskového spektrofotometru a změří se tzv. baseline. Kyveta se vzorkem se probublává proudem CO po dobu jedné minuty dokud nedojde k vytvoření komplexu CYP s CO a opět se provede spektrofotometrické měření. Z naměřených absorbancí se vypočítá celková koncentrace CYP v mikrosomální frakci podle vzorce:

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_{500}}{0,091} \cdot 20$$

A_{450} ...absorbance při vlnové délce 450 nm

A_{500} ... absorbance při vlnové délce 500 nm

c_{P450} ... koncentrace CYP

0,091 ... hodnota molárního absorpčního koeficientu pro CYP [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

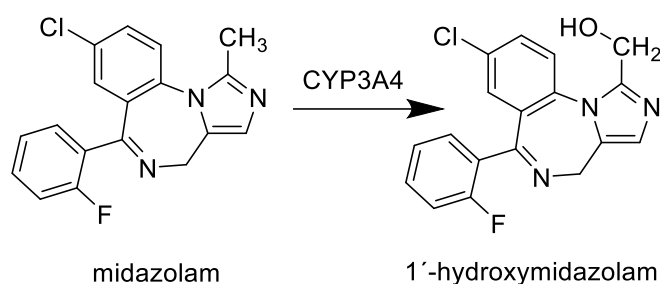
Celková koncentrace CYP v mikrosomální frakci použitá pro následné experimenty byla stanovena na 9,01 $\mu mol/l$.

4.3 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP

S využitím specifických substrátů byla v lidské jaterní mikrosomální frakci stanovena aktivita vybraných CYP. Koncentrace produktů byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Vliv kyseliny fytové na jednotlivé formy byla měřena v reakční směsi, která obsahovala mikrosomální frakci jater, NADPH generující systém a kyselinu fytovou o různé koncentraci (10, 50, 100, 150, 200, 400, 1000 $\mu mol/l$). Ke stanovení enzymových aktivit byly použity poolovaná lidská jaterní mikrosomální frakce od deseti donorů.

4.3.1 Stanovení aktivity CYP3A4 1'-hydroxylací midazolamu

Midazolam je primárně metabolizován v játrech a střevní stěně pomocí enzymu CYP3A4 a CYP3A5⁵¹. Nejprve dochází k hydroxylaci midazolamu za vzniku dvou aktivních metabolitů 1'-hydroxymidazolamu a 4-hydroxymidazolamu. Metabolit 1'-hydroxymidazolam vzniká oproti 4-hydroxymidazolamu ve větší míře.



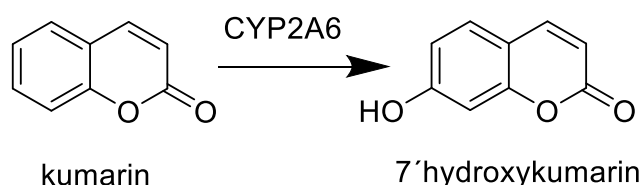
Obr. 7: Schéma hydroxylace midazolamu

Celkový objem reakční směsi byl 100 μ l. Do mikrozkušavek bylo napipetováno 20 μ l naředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l fosfátovým pufrém, pH 7,4), tak aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 12,5 pmol CYP. Dále 50,9 μ l roztoku, který obsahoval IP6 naředěný 100 mmol/l fosfátovým pufrém, tak, aby výsledná koncentrace kyseliny fytové byla 10, 50, 100, 150, 200, 400 a 1000 μ mol/l. Nakonec bylo napipetováno 20 μ l NADPH generující systém o složení NADP⁺ 0,5 mmol/l, isocitrát 3,7 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 10 U/ml, MgSO₄ 50 mmol/l. Poté se daly mikrozkušavky na 30 minut preinkubovat při 37 °C. Po přidání substrátu midazolamu (9,1 μ l, 30,7 μ mol/l) a promíchání se směs dala inkubovat 8 minut při 37 °C, následně byla reakce zastavena 100 μ l MeOH. Po zastavení reakce se vzorky nechaly centrifugovat při 4 °C po dobu 10 minut při 14000 RPM. Následovalo přenesení 150 μ l supernatantu do vialek a analýza pomocí HPLC.

Podmínky pro HPLC analýzu: mobilní fáze o složení ACN a CH₃COONa (10 mmol/l) v poměru 36:64 (pH 4,7), izokratická eluce, průtok mobilní fáze 0,6 ml/min, doba měření 14,2 min/vzorek. Detekce UV při 240 nm.

4.3.2 Stanovení aktivity CYP2A6 hydroxylací kumarinu

CYP2A6 je hlavním enzymem podílejícím se na klíčové metabolické přeměně kumarinu na 7'-hydroxykumarinu v lidských jaterních mikrozomech⁵².



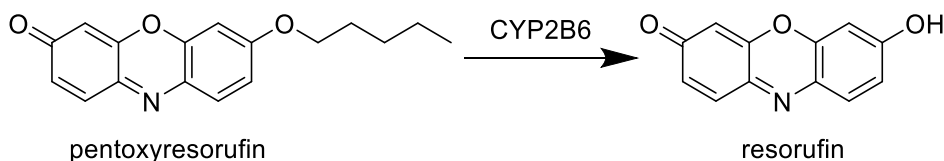
Obr. 8: Schéma hydroxylace kumarinu a vzniku 7'-hydroxykumarinu

Celkový objem reakční směsi byl 100 μl . Do mikrozkušavek bylo napipetováno 46 μl naředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l fosfátovým pufrém, pH 7,4), tak aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 35 pmol CYP. Dále reakční směs obsahovala 25 μl roztoku, který obsahoval IP6 naředěný 100 mmol/l fosfátovým pufrém tak, aby výsledná koncentrace kyseliny fytové byla 10, 50, 100, 150, 200, 400 a 1000 $\mu\text{mol/l}$ a kumarin o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Poté se daly mikrozkušavky se vzorkem na 30 minut preinkubovat při 37 $^{\circ}\text{C}$. Po preinkubaci se do reakční směsi napipetovalo 29 μl NADPH generujícího systému o složení NADP⁺ 0,5 mmol/l, isocitrát 3,7 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 10 U/ml, MgSO₄ 100 mmol/l. Po promíchání se směs dala opět inkubovat na 15 minut při 37 $^{\circ}\text{C}$, pak byla reakce zastavena 200 μl MeOH. Po zastavení reakce se vzorky nechaly centrifugovat při 4 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut při 14000 RPM. Následovalo napipetování 150 μl supernatantu do vialek s následnou analýzou pomocí HPLC.

Podmínky pro HPLC analýzu: mobilní fáze o složení ACN a CH₃COOH v poměru 40:60, izokratická eluce, průtok mobilní fáze 1 ml/min, doba měření 7 min/vzorek. Detekce fluorescenční (excitace při 338 nm, emise 458 nm).

4.3.3 Stanovení aktivity CYP2B6 dealkylací pentoxyresorufinu

CYP2B6 je hlavním enzymem podílejícím se na klíčové metabolické přeměně pentoxyresorufinu na resorufin v lidských jaterních mikrozomech.



Obr. 9: Schéma dealkylace pentoxyresorufinu za vzniku resorufinu

Celkový objem reakční směsi byl 100 μ l. Do mikrozkušavek bylo napipetováno 45 μ l naředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l fosfátovým pufrem, pH 7,4), tak aby výsledné množství reakční směsi byla 35 pmol CYP. Dále bylo pipetováno 26 μ l roztoku, který obsahoval IP6 naředěný 100 mmol/l fosfátovým pufrem tak, aby výsledná koncentrace kyseliny fytové byla 10, 50, 100, 150, 200, 400 a 1000 μ mol/l a pentoxyresorufin o koncentraci 20 μ mol/l. Poté se daly mikrozkušavky se vzorkem na 30 minut preinkubovat při 37 °C. Po preinkubaci se do reakční směsi napipetovalo 29 μ l NADPH G.S. o složení NADP⁺ 0,5 mmol/l, isocitrát 3,7 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 10 U/ml, MgSO₄ 100 mmol/l a promíchaná směs se dala inkubovat na 15 minut při 37 °C, pak byla reakce zastavena 200 μ l MeOH. Po zastavení reakce se vzorky nechaly centrifugovat při 4 °C po dobu 10 minut při 14000 RPM. Následovalo napipetování 150 μ l supernatantu do vialek s následnou analýzou pomocí HPLC.

Podmínky pro HPLC analýzu: mobilní fáze o složení Na₂HPO₄ (25 mmol/l, pH 7) a MeOH (100%) v poměru 58:42, izokratická eluce, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, čas měření 10 min/vzorek. Detekce fluorescenční (excitace při 535 nm, emise při 585 nm).

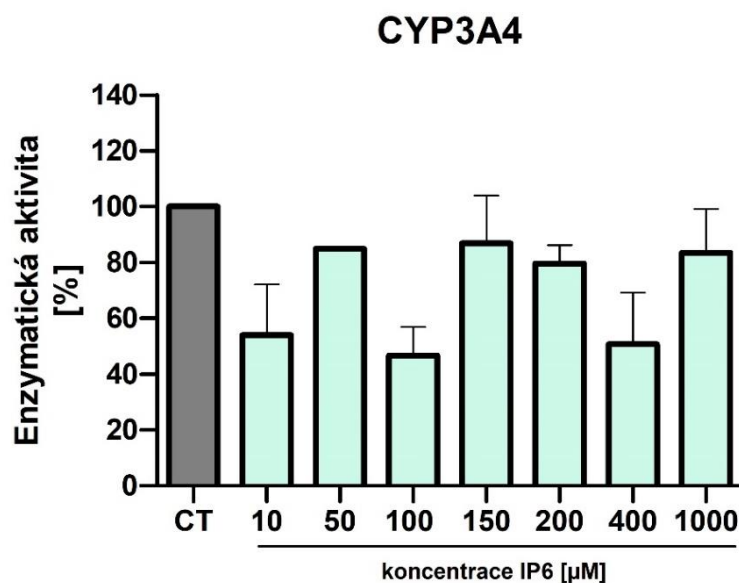
5. Výsledky

5.1 Stanovení aktivity vybraných jaterních cytochromu P450

Pro posouzení vlivu IP6 v různých koncentracích (10 μ mol/l, 50 μ mol/l, 100 μ mol/l, 150 μ mol/l, 200 μ mol/l, 400 μ mol/l a 1000 μ mol/l) na aktivitu CYP byly vybrány tři významné rodiny z hlediska metabolismu léčiv u lidí – CYP3A4, CYP2A6 a CYP2B6. Aktivita vybraných CYP byla měřena v mikrosomální frakci získané z lidských jater od 10 donorů. Výsledky stanovení aktivit byly zpracovány do grafů, které jsou uvedeny na Obr. 10-12. Výsledky aktivit jsou vždy vztaženy ke kontrolní skupině vzorků bez přídatku IP6, která odpovídá 100 %. Stanovení aktivit vybraných CYP bylo vždy prováděno v tripletech a opakováno třikrát.

5.1.1 Stanovení aktivity enzymu CYP3A4 1'-hydroxylací midazolamu

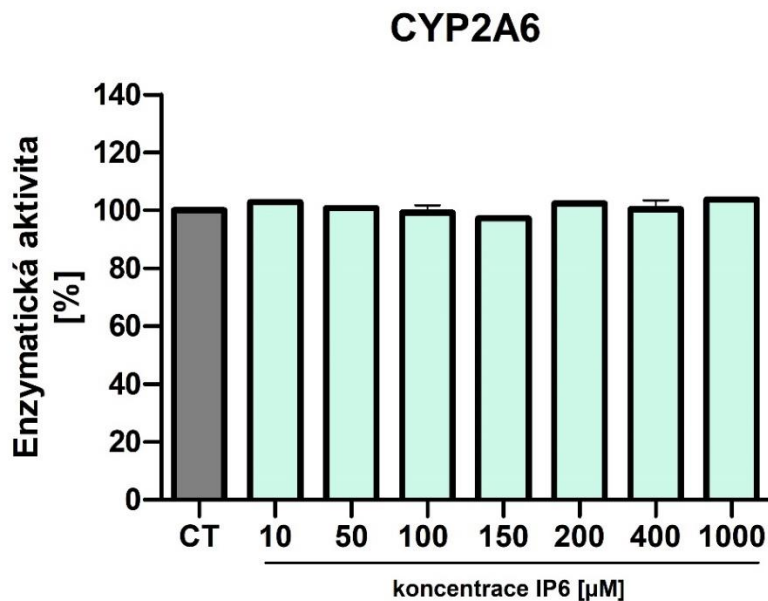
Stanovením vlivu IP6 na aktivitu CYP3A4 za použití midazolamu jako specifického substrátu byla zjištěna snížená aktivita přibližně o 50% u vzorků s koncentrací IP6 10 μ mol/l, 100 μ mol/l a 400 μ mol/l. U dalších zvolených koncentrací nebyla pozorována změna v aktivitě CYP3A4 v porovnání s kontrolou (Obr. 10).



Obr. 10: **Vliv IP6 na aktivitu CYP3A4 s využitím midazolamu.** Vzorky byly měřeny v triplikátech v poolované mikrosomální frakci z lidských jater (10 donorů). Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly (bez přidání IP6). Hodnoty aktivit jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplikátů v jednotlivých měřeních. **IP6**, kyselina fytová.

5.1.2 Stanovení aktivity CYP2A6 hydroxylací kumarinu

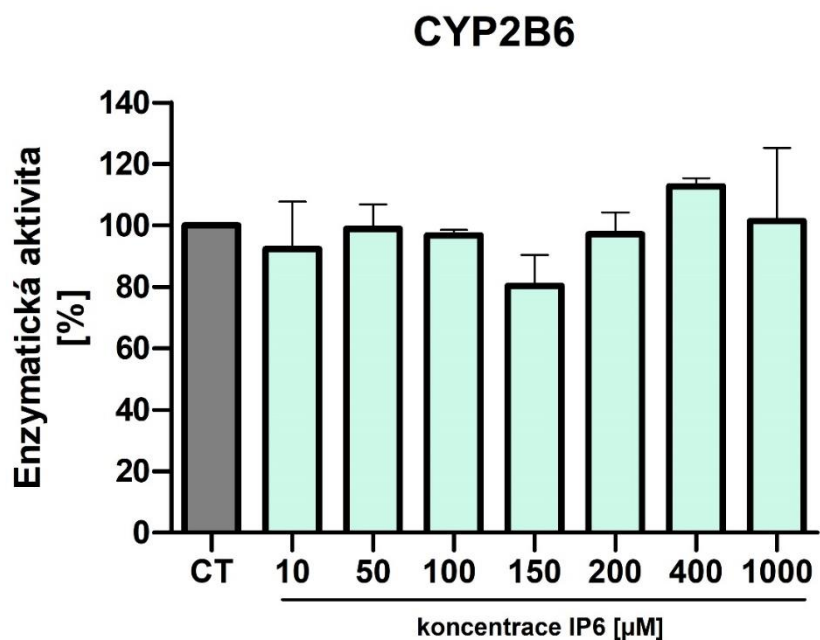
V případě aktivity CYP2A6 (substrátem byl kumarin) nebyla pozorována významná změna vlivem IP6 oproti kontrolní skupině (Obr. 11)



Obr. 11: **Vliv IP6 na aktivitu CYP2A6 s využitím kumarinu.** Vzorky byly měřeny v triplikátech v poolované mikrosomální frakci z lidských jater (10 donorů). Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly (bez přidání IP6). Hodnoty aktivit jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplikátů v jednotlivých měřeních. **IP6**, kyselina fytová.

5.1.3 Stanovení aktivity CYP2B6 dealkylací pentoxyresorufinu

Stanovení vlivu IP6 ve vybraných koncentracích na aktivitu CYP2B6 bylo provedeno za použití pentoxyresorufinu jako specifického substrátu. Stejně jako v případě aktivity CYP2A6, nedošlo k výraznému ovlivnění aktivity CYP2B6 přidavkem IP6 oproti kontrolní skupině. Mírná inhibice, přibližně o 20% v porovnání s kontrolou, se projevila jen v případě aplikace 150 µmol/l IP6 (Obr. 12).



Obr. 12: Vliv IP6 na aktivitu CYP2B6 s využitím pentoxyresorufinu. Vzorky byly měřeny v triplikátech v poolované mikrosomální frakci z lidských jater (10 donorů). Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly (bez přidání IP6). Hodnoty aktivit jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplikátů v jednotlivých měřeních. IP6, kyselina fytová.

Diskuse

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo stanovit vliv kyseliny fytové (IP6) na aktivitu jaterních biotransformačních enzymů I. fáze - cytochromů P450 (CYP). Vybrány byly významné rodiny z hlediska metabolismu léčiv u lidí, CYP3A4, CYP2A6 a CYP2B6. CYP metabolizují více jak 70% všech klinicky užívaných léčiv a významně přispívají k variabilitě v odpovědi pacientů na léčbu³. Změny v aktivitě těchto enzymů, tak mohou ovlivnit osud léčiva v organismu a jeho farmakologický účinek. Aktivita CYP může být ovlivněna celou řadou faktorů, jedním z nich je současné podávání více léčiv, kdy dochází k tzv. lékovým interakcím³⁶. Do metabolismu léčiv pomocí CYP mohou však výrazně zasáhnout i interakce léčiva s doplňky stravy nebo složky diety. IP6 je běžnou součástí lidské stravy a v poslední době se stala předmětem řady výzkumů především pro své potenciální antioxidační, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Její vliv na metabolismus léčiv v játrech a možná interakce s biotransformačními enzymy zatím nebyly objasněny⁴⁵.

Z výsledků experimentální části vyplývá, že aktivita CYP2A6 a CYP2B6 nebyla ovlivněna IP6 ve zvolených koncentracích v mikrosomální frakci lidských jater. Oba tyto enzymy jsou v játrech zastoupeny v malém množství, avšak CYP2B6 je i ke svému malému zastoupení schopen metabolizovat několik významných klinicky užívaných léčiva (např. bupropion, methadon, cyklofosfamid, ketamin). Lze tedy předpokládat, že přítomnost IP6 v organismu nebude mít vliv na metabolismus těchto léčiv.

Naopak, byla prokázán vliv IP6 na aktivitu CYP3A4 v mikrosomální frakci lidských jater. Aplikace IP6 v koncentracích 10 μ mol/l, 100 μ mol/l a 400 μ mol/l vedla ke snížení aktivity CYP3A4 přibližně o 50 %. To může být významné z klinického hlediska, jelikož CYP3A4 metabolizuje až 50 % všech klinicky užívaných léčiv, včetně statinů, imunosupresiv, antidepresiv, chemoterapeutik a mnoho dalších. Vliv IP6 na aktivitu CYP3A4 však nemá lineární průběh, inhibice tedy není přímo úměrná koncentraci IP6. Inhibice CYP3A4 může být vysvětlena zhoršením/zlepšením přístupu substrátu do aktivního místa enzymu v přítomnosti IP6.

Výsledky stanovení aktivity CYP2A6 a CYP2B6, ukazují že IP6 má malý, pokud vůbec nějaký, vliv na vznik interakce s metabolismem léčiv metabolizovaných těmito enzymy. Zvýšená konzumace potravin bohatých na IP6 nebo užívání IP6 jako doplněk stravy by tedy neměla vést ke klinicky významnému ovlivnění aktivity těchto biotransformačních enzymů. Pozorovaná inhibice aktivity CYP3A4 přítomností IP6 v mikrosomální frakci lidských jater může být důvodem interakce mezi IP6 a léčivy s klinickými dopady. Proto jsou zapotřebí další studie k vyhodnocení komplexních funkcí IP6 a jeho možné interakce s metabolismem léčiv, aby se jeho slibný terapeutický potenciál převedl do klinické praxe.

Závěr

V předkládané bakalářské práci byl zkoumán vliv kyseliny fytové (IP6) na aktivitu vybraných jaterních cytochromů P450 (CYP3A4, CYP2A6, CYP2B6). Enzymové aktivity byly stanoveny v jaterní mikrosomální frakci získaných z lidských jater pomocí specifických substrátů pro jednotlivé CYP.

Z výsledků experimentů vyplývají následující závěry:

- Inhibiční experimenty ukázaly, že IP6 pravděpodobně neovlivňuje metabolismus současně podávaných léčiv metabolizovaných enzymy CYP2A6 a CYP2B6.
- Aktivita CYP3A4 byla snížena přibližně o 50% vlivem 10 μ mol/l, 100 μ mol/l a 400 μ mol/l IP6, což by mohlo ovlivnit farmakokinetiku a účinnost široké škály klinicky užívaných léčiv.

Literatura

- (1) Parkinson, A.; Ogilvie, B. W.; Buckley, D. B.; Kazmi, F.; Czerwinski, M.; Parkinson, O. Biotransformation of Xenobiotics. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8e*; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2012.
- (2) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58* (5), 737–747.
<https://doi.org/10.1007/PL00000897>.
- (3) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Drug-Metabolizing Enzymes-An Overview. In *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012; pp 1–25.
<https://doi.org/10.1002/9783527630905.ch1>.
- (4) Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed. Pap.* **2010**, *154* (2), 103–116.
<https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>.
- (5) Omiecinski, C. J.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew, G. H.; Peters, J. M. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120* (SUPPL.1), 2022. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq338>.
- (6) Hoffmann, M. F.; Preissner, S. C.; Nickel, J.; Dunkel, M.; Preissner, R.; Preissner, S. The Transformer Database: Biotransformation of Xenobiotics. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (D1), D1113–D1117.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1246>.
- (7) 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. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*

- (1), 1–51. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.1>.
- (8) Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239* (7), 2370–2378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82244-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82244-3).
- (9) Kim, J.-J. P.; Shen, A. L.; Xia, C. 4 Structure and Catalytic Mechanism of NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: A Prototype of the Diflavin Oxidoreductase Family of Enzymes. In *Handbook of Flavoproteins*; DE GRUYTER, 2013; pp 73–102. <https://doi.org/10.1515/9783110298345.73>.
- (10) Gurusamy, U.; Shewade, D. G.; Pharmacoge-, H. Cytochrome P450 1A1 Pharmacogenomics in India MicroRNA : Regulation of P450 and Pharmacogenetics. **2015**, *1*.
- (11) Furge, L. L.; Guengerich, F. P. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism and Chemical Toxicology: An Introduction. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2006**, *34* (2), 66–74. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.49403402066>.
- (12) Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic Variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138* (1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- (13) Yamazoe, Y.; Yoshinari, K. Prediction of Regioselectivity and Preferred Order of CYP1A1-Mediated Metabolism: Solving the Interaction of Human and Rat CYP1A1 Forms with Ligands on the Template System. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2020**, *35* (1), 165–185. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.10.008>.
- (14) Thorn, C. F.; Aklillu, E.; Klein, T. E.; Altman, R. B. PharmGKB Summary. *Pharmacogenet. Genomics* **2012**, *22* (1), 73–77. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834c6efd>.
- (15) Tanner, J.-A.; Prasad, B.; Claw, K. G.; Stapleton, P.; Chaudhry, A.; Schuetz, E. G.; Thummel, K. E.; Tyndale, R. F. Predictors of Variation in CYP2A6 MRNA, Protein, and Enzyme Activity in a Human Liver Bank: Influence of Genetic and Nongenetic Factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *360* (1), 129–139. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237594>.

- (16) Al Koudsi, N.; Hoffmann, E. B.; Assadzadeh, A.; Tyndale, R. F. Hepatic CYP2A6 Levels and Nicotine Metabolism: Impact of Genetic, Physiological, Environmental, and Epigenetic Factors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2010**, *66* (3), 239–251. <https://doi.org/10.1007/s00228-009-0762-0>.
- (17) Mangó, K.; Kiss, Á. F.; Fekete, F.; Erdős, R.; Monostory, K. CYP2B6 Allelic Variants and Non-Genetic Factors Influence CYP2B6 Enzyme Function. *Sci. Rep.* **2022**, *12* (1), 2984. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07022-9>.
- (18) Langmia, I. M.; Just, K. S.; Yamoune, S.; Brockmüller, J.; Masimirembwa, C.; Stingl, J. C. CYP2B6 Functional Variability in Drug Metabolism and Exposure Across Populations—Implication for Drug Safety, Dosing, and Individualized Therapy. *Front. Genet.* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.692234>.
- (19) Isvoran, A.; Louet, M.; Vladoiu, D. L.; Craciun, D.; Loriot, M. A.; Villoutreix, B. O.; Miteva, M. A. Pharmacogenomics of the Cytochrome P450 2C Family: Impacts of Amino Acid Variations on Drug Metabolism. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.015>.
- (20) Goldstein, J. A.; de Morais, S. M. F. Biochemistry and Molecular Biology of the Human CYP2C Subfamily. *Pharmacogenetics* **1994**, *4* (6), 285–300. <https://doi.org/10.1097/00008571-199412000-00001>.
- (21) Robin, C.; Hennart, B.; Broly, F.; Gruchala, P.; Robin, G.; Catteau-Jonard, S. Could Cytochrome P450 2D6, 3A4 and 3A5 Polymorphisms Explain the Variability in Clinical Response to Clomiphene Citrate of Anovulatory PCOS Women? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.718917>.
- (22) Ning, M.; Duarte, J. D.; Rubin, L. H.; Jeong, H. CYP2D6 Protein Level Is the Major Contributor to Interindividual Variability in CYP2D6-Mediated Drug Metabolism in Healthy Human Liver Tissue. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, *104* (5), 974–982. <https://doi.org/10.1002/cpt.1032>.
- (23) Massart, J.; Begriche, K.; Hartman, J. H.; Fromenty, B. Role of Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 in Healthy and Diseased Liver. *Cells* **2022**, *11* (2), 288. <https://doi.org/10.3390/cells11020288>.
- (24) Harjumäki, R.; Pridgeon, C. S.; Ingelman-Sundberg, M. CYP2E1 in Alcoholic

- and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (15), 8221.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158221>.
- (25) Koop, D. R. Oxidative and Reductive Metabolism by Cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* **1992**, *6* (2), 724–730. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.2.1537462>.
- (26) Porubsky, P. R.; Battaile, K. P.; Scott, E. E. Human Cytochrome P450 2E1 Structures with Fatty Acid Analogs Reveal a Previously Unobserved Binding Mode. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (29), 22282–22290.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.109017>.
- (27) Guengerich, F. P. Cytochrome P450 2E1 and Its Roles in Disease. *Chem. Biol. Interact.* **2020**, *322*, 109056. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109056>.
- (28) Chen, J.; Jiang, S.; Wang, J.; Renukuntla, J.; Sirimulla, S.; Chen, J. A Comprehensive Review of Cytochrome P450 2E1 for Xenobiotic Metabolism. *Drug Metab. Rev.* **2019**, *51* (2), 178–195.
<https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1632889>.
- (29) Lee, D. W.; Oh, W.-Y.; Yi, S. H.; Ku, B.; Lee, M.-Y.; Cho, Y. H.; Yang, M. Estimation of Bisphenol A—Human Toxicity by 3D Cell Culture Arrays, High Throughput Alternatives to Animal Tests. *Toxicol. Lett.* **2016**, *259*, 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.711>.
- (30) Waring, R. H. Cytochrome P450: Genotype to Phenotype. *Xenobiotica* **2020**, *50* (1), 9–18. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1648911>.
- (31) Tracy, T. S.; Chaudhry, A. S.; Prasad, B.; Thummel, K. E.; Schuetz, E. G.; Zhong, X. -b.; Tien, Y.-C.; Jeong, H.; Pan, X.; Shireman, L. M.; Tay-Sontheimer, J.; Lin, Y. S. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2016**, *44* (3), 343–351.
<https://doi.org/10.1124/dmd.115.067900>.
- (32) Burk, O.; Wojnowski, L. Cytochrome P450 3A and Their Regulation. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2004**, *369* (1), 105–124.
<https://doi.org/10.1007/s00210-003-0815-3>.
- (33) Fujino, C.; Sanoh, S.; Katsura, T. Variation in Expression of Cytochrome P450

- 3A Isoforms and Toxicological Effects: Endo- and Exogenous Substances as Regulatory Factors and Substrates. *Biol. Pharm. Bull.* **2021**, *44* (11), b21-00332. <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00332>.
- (34) Anzenbacherová, E.; Bec, N.; Anzenbacher, P.; Hudeček, J.; Souček, P.; Jung, C.; Munro, A. W.; Lange, R. Flexibility and Stability of the Structure of Cytochromes P450 3A4 and BM-3. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (10), 2916–2920. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01305.x>.
- (35) PELKONEN, O.; MÄEENPÄEÄ, J.; TAAVITSAINEN, P.; RAUTIO, A.; RAUNIO, H. Inhibition and Induction of Human Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *Xenobiotica* **1998**, *28* (12), 1203–1253. <https://doi.org/10.1080/004982598238886>.
- (36) Lynch, T.; Price, A. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *Am. Fam. Physician* **2007**, *76* (3), 391–396.
- (37) Ray, W. A.; Murray, K. T.; Meredith, S.; Narasimhulu, S. S.; Hall, K.; Stein, C. M. Oral Erythromycin and the Risk of Sudden Death from Cardiac Causes. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (11), 1089–1096. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040582>.
- (38) Martignoni, M.; Groothuis, G. M. M.; de Kanter, R. Species Differences between Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human CYP-Mediated Drug Metabolism, Inhibition and Induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2* (6), 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>.
- (39) Cederbaum, A. I. CYP2E1 – Biochemical and Toxicological Aspects and Role in Alcohol-Induced Liver Injury. In *Advances in Bioactivation Research*; Springer New York: New York, NY, 2008; pp 1–36. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77300-1_6.
- (40) Lin, J. H.; Lu, A. Y. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* **1998**, *35* (5), 361–390.
- (41) Shankar, K.; Mehendale, H. M. Cytochrome P450. In *Encyclopedia of Toxicology*; Elsevier, 2014; pp 1125–1127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00299-2>.

- (42) Benet, L. Z.; Bowman, C. M.; Koleske, M. L.; Rinaldi, C. L.; Sodhi, J. K. Understanding Drug–Drug Interaction and Pharmacogenomic Changes in Pharmacokinetics for Metabolized Drugs. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2019**, *46* (2), 155–163. <https://doi.org/10.1007/s10928-019-09626-7>.
- (43) Bemiller, J. N. Cyclitols Aminoglycosides , Bioactive Bacterial. **2019**, No. 2.
- (44) Shitan, N.; Yazaki, K. *New Insights into the Transport Mechanisms in Plant Vacuoles*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2013; Vol. 305. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407695-2.00009-3>.
- (45) Szkudelski, T. Phytic Acid - Its Influence on Organism. *J. Anim. Feed Sci.* **1997**, *6* (4), 427–438. <https://doi.org/10.22358/jafs/69556/1997>.
- (46) Boyd, L. Complexation of Phytate with Proteins and Cations in Corn Germ and Oilseed Meals. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24* (4), 804–808. <https://doi.org/10.1021/jf60206a034>.
- (47) KNUCKLES, B. E.; KUZMICKY, D. D.; BETSCHART, A. A. Effect of Phytate and Partially Hydrolyzed Phytate on in Vitro Protein Digestibility. *J. Food Sci.* **1985**, *50* (4), 1080–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13016.x>.
- (48) Anekonda, T. S.; Wadsworth, T. L.; Sabin, R.; Frahler, K.; Harris, C.; Petriko, B.; Ralle, M.; Woltjer, R.; Quinn, J. F. Phytic Acid as a Potential Treatment for Alzheimer’s Pathology: Evidence from Animal and in Vitro Models. *J. Alzheimer’s Dis.* **2011**, *23* (1), 21–35. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101287>.
- (49) Vucenik, I.; Podczasy, J. J.; Shamsuddin, A. M. Antiplatelet Activity of Inositol Hexaphosphate (IP6). *Anticancer Res.* **1999**, *19* (5 A), 3689–3693.
- (50) Onomi, S.; Okazaki, Y.; Katayama, T. Effect of Dietary Level of Phytic Acid on Hepatic and Serum Lipid Status in Rats Fed a High-Sucrose Diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68* (6), 1379–1381. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1379>.
- (51) Kronbach, T.; Mathys, D.; Umeno, M.; Gonzalez, F. J.; Meyer, U. A. Oxidation of Midazolam and Triazolam by Human Liver Cytochrome P450III A4. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36* (1), 89–96.
- (52) Pelkonen, O.; Rautio, A.; Raunio, H.; Pasanen, M. CYP2A6: A Human

Coumarin 7-Hydroxylase. *Toxicology* **2000**, *144* (1–3), 139–147.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00200-0).