

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
Ústav farmakologie

Mgr. Michal Šiller

**ROLE CYTOCHROMŮ P450 A DALŠÍCH ENZYMŮ METABOLISMU  
LÉČIV V BIOTRANSFORMACI DVOU SYNTETICKÝCH DERIVÁTŮ  
CYTOKININŮ**

Disertační práce

Olomouc 2010

PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC  
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY  
Department of Pharmacology

Mgr. Michal Šiller

**A ROLE OF CYTOCHROMES P450 AND OTHER DRUG METABOLISING  
ENZYMES IN BIOTRANSFORMATION OF TWO SYNTHETIC  
CYTOKININE DERIVATIVES**

Thesis

Olomouc 2010

*Prohlášení*

Prohlašuji, že předkládaná práce je původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpal informace, jsou v práci řádně citovány a uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci .....

.....  
(podpis)

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

V Olomouci .....

.....  
(podpis)

Děkuji všem pracovníkům Ústavu farmakologie, Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci za vytvoření přívětivé a přátelské atmosféry během mého doktorského studia. Rád bych především poděkoval mému školiteli, prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za důsledné a především odborné vedení mé doktorské práce, za předávání jeho zkušeností a praktických rad při řešení experimentálních problémů ale i při psaní odborných článků a při přípravě prezentací na různých konferencích, které jsem během studia absolvoval. Dále děkuji doc. Evě Anzenbacherové, CSc. za předávání odborných zkušeností při provádění jednotlivých experimentů. Děkuji pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů (pod vedením prof. Miroslava Strnada, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého) za poskytnutí inhibitorů cyklin-dependentních kináz pro mé experimenty. Dr. Vlastimilu Maškovi a Mgr. Aleně Tunkové děkuji za obětavou pomoc při osvojování si laboratorních dovedností v laboratořích Ústavu farmakologie. Dr. Janu Strojilovi děkuji za stylistické jazykové rady. Závěrem bych velice rád poděkoval své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

***Finanční podpora***

*Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství a kultury (MSM6198959216),  
Grantovou agenturou České republiky (GACR303/09/H048, Univerzitou Palackého  
(Internal grant 91110221) a projektem Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.00.30.*

## SOUHRN

Olomoucín II a látka NGF1568 patří mezi perspektivní syntetické látky odvozené od rostlinných cytokininů, které by mohly v budoucnosti sloužit k terapii nádorových onemocnění či zánětlivých stavů. Doposud neexistují informace o interakcích těchto potenciálních léčiv s významnými lidskými enzymovými systémy podílejícími se na metabolismu xenobiotik. Předkládaná disertační práce je v první části zaměřena na studium inhibičního vlivu olomoucínu II a NGF1568 na enzymové aktivity hlavních enzymů I. fáze metabolismu xenobiotik, cytochromů P450 (CYP). V přítomnosti olomoucínu II byla *in vitro* významně inhibována enzymová aktivita CYP1A2 (7-ethoxyresorufin *O*-deethylace), CYP2C9 (diklofenak 4'-hydroxylace) a CYP3A4 (testosteron 6 $\beta$ -hydroxylace). Hodnota  $K_i$  pro inhibici CYP1A2 byla 50  $\mu$ M a pro inhibici CYP2C9  $K_i = 75\mu$ M a pro CYP3A4 se  $K_i$  pohybovala v desítkách  $\mu$ mol/l. Olomoucín II inhiboval enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP3A4 nekompetitivně, v případě inhibice CYP1A2 se choval olomoucín II jako inhibitor smíšeného typu. Látka NGF1568 inhibovala významně pouze enzymovou aktivitu CYP2C9 a to akompetitivním mechanismem ( $K_i = 349 \mu$ M). V další části disertační práce byl studován potenciální metabolismus olomoucínu II a NGF1568 biotransformačními enzymy obsaženými v jaterní mikrosomální frakci. Výsledky experimentů, při kterých byly olomoucín II a NGF1568 inkubovány s jaterní mikrosomální frakcí a NADPH, ukázaly, že olomoucín II je zřejmě metabolizován lidskými CYP. Tato domněnka byla potvrzena experimenty s inhibicí tvorby metabolitu oxidem uhelnatým a inkubací olomoucínu II s rekombinantními CYP. Olomoucín II podléhá v I. fázi metabolismu 5'-hydroxylaci a CYP3A4 je hlavní enzym katalyzující tuto reakci. Dále byl sledován příspěvek vybraných enzymů II. fáze metabolismu xenobiotik (UGT a SULT) k biotransformaci testovaných látek. Oba cytokininové deriváty jsou glukuronidovány *in vitro*. Jaterní UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT2B7 a střevní UGT1A10 se podílí na glukuronidaci olomoucínu II, zatímco NGF1568 je glukuronidována predominantně extrahepatálními UGT1A7, UGT1A8 a UGT1A10. UGT1A9, jako jediný zástupce jaterních forem UGT, přispívá k metabolismu NGF1568. Na rozdíl od NGF1568 je olomoucín II také substrátem lidských sulfotransferas.

Klíčová slova: olomoucín II, NGF1568, cytochrom P450, UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, biotransformace

## SUMMARY

Olomoucine II and substance NGF1568 belong to prospective synthetic compounds derived from plant cytokinines with potential use in cancer therapy (olomoucine II) or as antiinflammatory agents (NGF1568) in the future. The interactions of these potential drugs with human enzyme systems participating in drug metabolism have not been evaluated yet. The first part of thesis presented here is focused on study of inhibitory effect of olomoucine II and NGF1568 on enzymatic activities of main phase I drug metabolising enzymes, cytochromes P450 (CYP). In the presence of olomoucine II the enzymatic activities of CYP1A2 (7-ethoxyresorufin *O*-deethylation), CYP2C9 (diclofenac 4'-hydroxylation) and CYP3A4 (testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation) were significantly inhibited. The  $K_i$  value for CYP1A2 inhibition was 50  $\mu$ M, for CYP2C9 inhibition was  $K_i = 75 \mu$ M and for CYP3A4 inhibition was  $K_i$  in range of tens  $\mu$ mol/l. The enzymatic activities of CYP2C9 and CYP3A4 were inhibited noncompetitively by olomoucine II, while olomoucine II acted as mixed type inhibitor in case of CYP1A2 inhibition. Substance NGF1568 inhibited considerably only enzymatic activity of the CYP2C9 enzyme as uncompetitive inhibitor ( $K_i = 349 \mu$ M). In the next part, the potential metabolism of olomoucine II and NGF1568 by human liver microsomal enzymes of drug metabolism was studied. The results from experiments in which olomoucine II and NGF1568 were incubated with human liver microsomal fraction and NADPH showed that olomoucine II was probably metabolised by human CYP. This assumption was confirmed by inhibition of metabolite formation by carbon monoxide and by incubation of olomoucine II with recombinant CYP. Olomoucine II is subjected to 5'-hydroxylation in phase I of drug metabolism and CYP3A4 is the major enzyme catalyzing this reaction. Further, the contribution of phase II enzymes (UGT and SULT) to biotransformation of compounds tested was examined. Both cytokinine derivatives are glucuronidated *in vitro*. Hepatic UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT2B7 and intestinal UGT1A10 participate in glucuronidation of olomoucine II, while NGF1568 is predominantly glucuronidated by extrahepatic UGT1A7, UGT1A8 and UGT1A10. Among the all liver UGT forms tested only the UGT1A9 contributes to metabolism of NGF1568.

Keywords: olomoucine II, NGF1568, cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferases, sulfotransferases, biotransformation

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	9
2.	CÍL PRÁCE.....	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1.	Metabolismus léčiv.....	12
3.2.	Cytochromy P450.....	16
3.3.	Konjugáčn enzymy .....	24
3.3.1.	UDP-glukuronosyltransferasy.....	26
3.3.2.	Sulfotransferasy .....	29
3.4.	Lkov interakce odvozen od metabolismu lchiv .....	31
3.4.1.	Lkov interakce na úrovni CYP .....	32
3.4.1.1.	Inhibice CYP.....	32
3.4.1.2.	Indukce CYP .....	36
3.4.1.3.	Vliv genetických faktorů na metabolismus lchiv cytochromy P450 ....	40
3.4.2.	Lkov interakce na úrovni konjugáčnch enzymů .....	41
4.	EXPERIMENTLN ČÁST .....	43
4.1.	Chemikálie a pstrojov vybaven .....	43
4.1.1.	Chemikálie .....	43
4.1.2.	Pstrojov vybaven .....	44
4.1.3.	Původ enzymů .....	46
4.2.	Metody.....	46
4.2.1.	Stanoven aktivity lidských jaterních mikrosomálních CYP .....	46
4.2.2.	Sledování inhibibnho vlivu olomouciny II a NGF1568 na enzymovou aktivitu CYP <i>in vitro</i> .....	48
4.2.3.	Sledování vzniku potenciálních metabolitů testováních látek a potvrzení uasti CYP na tvorbě metabolitů .....	54
4.2.4.	Sledování uinku specifických inhibitorů CYP na vznik metabolitů testováních látek.....	56
4.2.5.	Identifikace forem CYP podlejcch se na metabolismu testováních látek .	57
4.2.6.	Prspvek UGT k metabolismu testováních látek <i>in vitro</i> .....	58
4.2.7.	Prspvek SULT lidsk jaterní cytosolární frakce k metabolismu testováních látek <i>in vitro</i> .....	59
4.2.8.	Identifikace metabolitů testováních látek pomocí hmotnostn spektrometrie ..	60
5.	VÝSLEDKY .....	62
5.1.	Interakce testováních látek s lidskými mikrosomálními jaterními CYP.....	62
5.1.1.	Inhibice markerov aktivity CYP v lidsk jaterní mikrosomální frakci .....	62
5.1.2.	Role lidských jaterních mikrosomálních CYP v metabolismu testováních látek .....	67
5.2.	Prspvek enzymů II. fáze metabolismu lchiv k biotransformaci testováních látek .	72
5.2.1.	Metabolismus olomouciny II a NGF1568 lidskými UGT .....	72
5.2.2.	Interakce olomouciny II a NGF1568 s lidskými jaterními cytosolárními SULT <i>in vitro</i> .....	75
6.	DISKUZE.....	77
7.	ZÁVĚR .....	84
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	86
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	87
10.	LITERATURA.....	91
11.	SEZNAM PUBLIKOVNCH PRC .....	106



# 1. ÚVOD

---

V posledních desetiletích zaznamenal vývoj nových léčiv obrovský rozkvět. Řada laboratoří organických syntéz produkuje desítky či možná dokonce stovky nových látek, které by mohly najít v budoucnosti uplatnění v terapii celé řady onemocnění. Trendem v dnešní době se zdá být především vývoj nových účinných protinádorových léčiv, protože nádorová onemocnění zaujímají ve světě ale i u nás přední příčky ve výskytu závažných civilizačních chorob často končících smrtí. Nádorové buňky se vymykají běžným regulačním mechanismům, které řídí buněčný cyklus a udržují buněčnou rovnováhu v jednotlivých tkáních. Na základě porušení regulačních mechanismů buněčného cyklu buněk v nádorové tkáni dochází k nekontrolovatelnému buněčnému dělení a tak progresivnímu růstu nádoru.

Syntetické látky odvozené od rostlinných hormonů, cytokininů patří do skupiny látek vykazujících právě protinádorovou aktivitu. Mezi látky odvozené od rostlinných hormonů patří především  $N_6$ -substituované deriváty adeninu (inhibitory cyklin dependentních kinas, CDK inhibitory) a purinové ribosidy. Tyto skupiny látek mají schopnost zamezit proliferaci nádorové tkáně různým mechanismem. CDK inhibitory mají schopnost blokovat buněčný cyklus v živočišných buňkách tak, že inhibují aktivitu cyklin-dependentních kinas hrajících důležitou roli v řízení buněčného cyklu buňky a následně tak zamezují DNA replikaci a dělení buňky (Krystof a spol., 2002; Krystof a spol., 2005). Cytokininové ribosidy mají pravděpodobně schopnost navodit buněčnou apoptózu vazbou na specifické extracelulární adeninové receptory (Kohno a spol., 1996) a zároveň mohou působit po vystavení se intracelulární fosforylaci i cytotoxicky (Cottam a spol., 1993). Nedávno byla syntetizována látka ribosidové struktury NGF1568, u které byl zjištěn překvapivý účinek na neutrofile: Tato látka stimuluje růst a funkci neutrofilů a tak defakto moduluje zánětlivé procesy. V budoucnu by tato experimentální látka mohla najít uplatnění například v léčbě zánětlivých procesů.

Stejně jako cizorodé látky (xenobiotika) podléhají i potenciální léčiva ze skupiny cytokininových derivátů po vstupu do organismu určitým farmakokinetickým procesům. Metabolismus léčiv je jedním z důležitých pochodů určujících osud léčiva v organismu. V rámci této fáze jsou látky v organismu přeměňovány na metabolity tzv. biotransformačními enzymy, které jsou lokalizovány zejména v játrech, ale také ve střevech a dalších tkáních. Ve většině případů vznikají

polární metabolity léčiv, které jsou pak na rozdíl od parentních látek díky vyšší rozpustnosti ve vodě snadněji eliminovány z těla močí nebo stolicí. Vznikající metabolity jednotlivých léčiv mohou také vykazovat stejnou nebo různou farmakologickou aktivitu ve srovnání s parentní látkou. Interakce léčiv s biotransformačními enzymy nemusí být ovšem jen organismu prospěšné. Některá léčiva vystupují jako inhibitory biotransformačních enzymů. Je-li podáno léčivo s úzkým terapeutickým rozmezím (léčivo A) současně s inhibitorem enzymu metabolizujícího dané léčivo A, může dojít k manifestaci nežádoucích toxických účinků léčiva A na organismus v důsledku jeho zvýšené (toxické) koncentrace v organismu. Na druhou stranu byla popsána i léčiva, která indukují syntézu daného enzymu, a tím urychlují často vlastní eliminaci, případně eliminaci jiného současně podávaného léčiva metabolizovaného indukovaným enzymem. Na základě faktu, že v nedávné době byly popsány velmi závažné lékové interakce u prakticky běžně předepisovaných léčiv vyplývající z interferencí na úrovni metabolismu léčiv, doporučuje FDA (Food and Drug Administration, USA) testovat interakce všech potenciálních léčiv s cytochromy P450 (CYP) a případně dalšími biotransformačními enzymy nejlépe ještě před uvedením do klinické praxe. Naše pracoviště, Ústav farmakologie se dlouhodobě zabývá interakcemi potenciálních léčiv s lidskými biotransformačními enzymy a hodnocením rizik vzniku lékových interakcí založených na metabolismu léčiv (Nekvindová a spol., 2007; Veinlichová a spol., 2009).

Uvedené cytokininové deriváty (CDK inhibitory a purinové ribosidy) patří právě do skupiny potenciálních léčiv, nadějných cytostatik či látek aplikovatelných při terapii zánětlivých stavů. Proto je vhodné sledovat jejich efekt na aktivitu nejvýznamnějších biotransformačních enzymů, především CYP, případně studovat dráhu jejich metabolické přeměny v organismu a zhodnotit míru rizika vzniku lékových interakcí na základě ovlivnění výše uvedených enzymových systémů v případě současného podání těchto cytokininových derivátů s ostatními léky.

## 2. CÍL PRÁCE

---

Cílem předkládané disertační práce bylo zhodnotit interakce dvou nových cytokininových derivátů, olomoucínu II (CDK inhibitor) a substance NGF1568 (purinový ribosid), s nejdůležitějšími enzymy metabolismu léčiv, tj. CYP a některými konjugacími enzymy, a pokusit se posoudit možné riziko vzniku lékových interakcí vyplývajících z podání těchto látek současně s dalšími léčivy, které jsou substráty zmíněných biotransformačních enzymů. Testované látky byly syntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů, společném pracovišti Akademie věd a Univerzity Palackého. Vzhledem k tomu, že v současnosti je již ve fázi klinického zkoušení jeden strukturně podobný cytokininový analog - CDK inhibitor roskovitin (seliciclib), bylo zajímavé i srovnání relativní bezpečnosti olomoucínu II a substance NGF1568 s roskovitem z hlediska vzniku lékových interakcí vyplývajících z ovlivnění nejdůležitějších biotransformačních enzymů těmito látkami.

Studium interakcí testovaných látek s biotransformačními enzymy bylo proto zejména zaměřeno na následující témata:

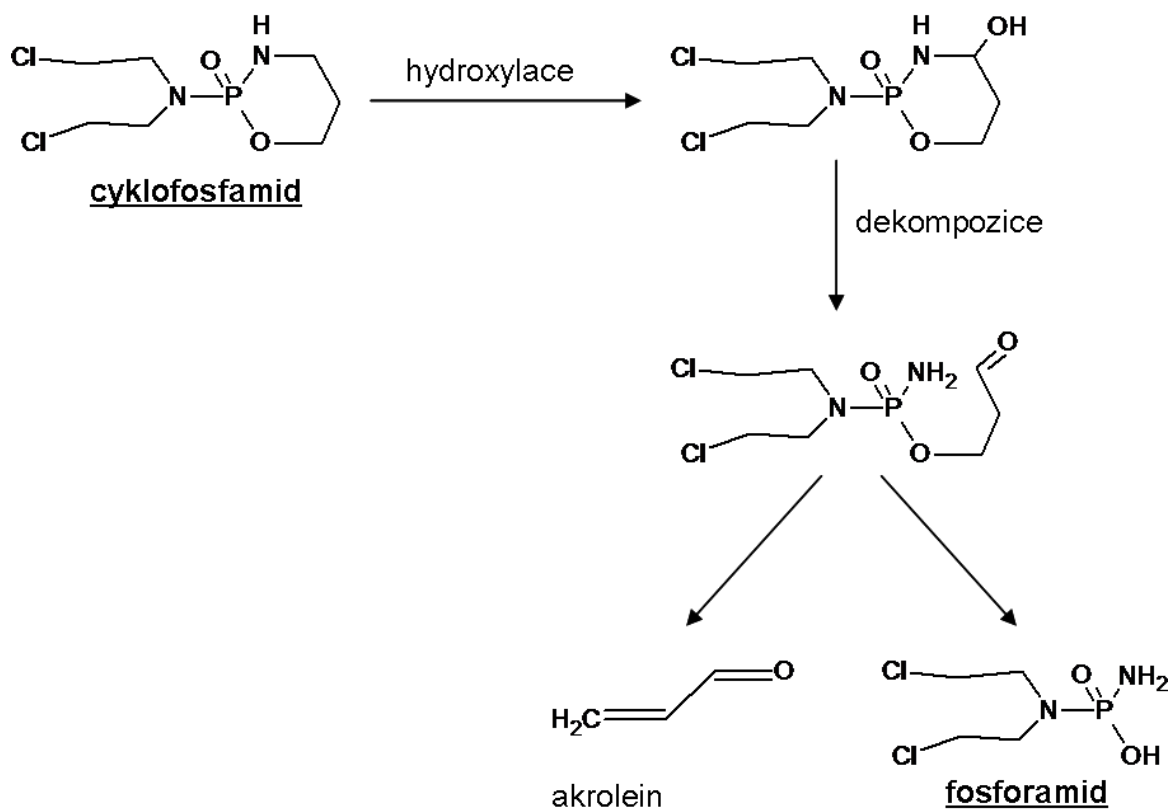
- Sledování vlivu cytokininových derivátů, olomoucínu II a NGF1568 na enzymovou aktivitu CYP obsažených v mikrosomální frakci lidských jater *in vitro*
- Metabolismus testovaných látek jaterními mikrosomálními CYP
- Příspěvek vybraných konjugacími enzymů k metabolismu testovaných látek

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

---

### 3.1. Metabolismus léčiv

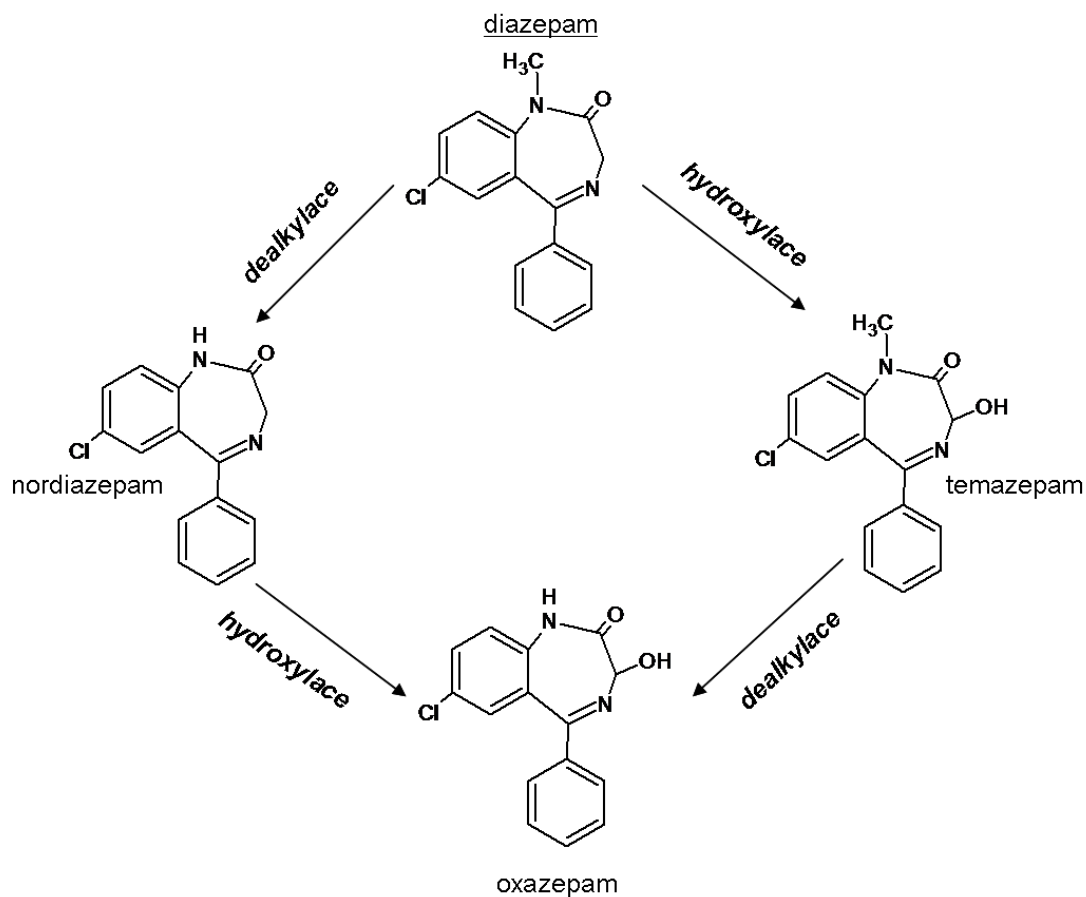
Všechna léčiva vstupující do organismu mají stejně jako i ostatní xenobiotika podobný osud. Po intravenózní aplikaci či absorpci, nejčastěji z různých částí gastrointestinálního traktu, je léčivo distribuováno krví nejen do cílových tkání, kde se projeví jeho farmakodynamický účinek, ale cestou vena portae se léčivo dostává i do jater. Játra představují hlavní biotransformační orgán a jsou místem majoritní exprese řady biotransformačních enzymů (Slaughter a spol., 1995). Kromě jaterních enzymů hrají důležitou roli v biotransformaci léčiv i enzymy, které se nachází ve střevech (Thelen a Dressman, 2009). Jsou to právě ty enzymy, které jsou jinak predominantně lokalizovány v játrech. Tyto enzymy jsou zodpovědné za zvýšenou clearance perorálně podávaných léčiv absorbovaných ve střevech. Např. salbutamol patří do skupiny  $\beta_2$ -sympatomimetik a je indikován k léčbě astma bronchiale. Právě toto léčivo v tenkém střevě podléhá do značné míry konjugaci s endogenním sulfátem a jeho biodostupnost je proto snížena (Morgan a spol., 1986). Na základě různých fyzikálně-chemických vlastností pramenících z chemické struktury, jsou léčiva různou měrou modifikována reakcemi, které katalyzují právě již zmíněné jaterní ale v některých případech i extrahepatální biotransformační enzymy. Obecně lze uvést, že z vysoce lipofilních léčiv, tj. léčiv rozpustných v tucích, vznikají látky, metabolity, které jsou na rozdíl od parentních léčiv více polární (rozpustné ve vodě), a jsou tak snadněji vyloučeny z těla nejčastěji močí nebo stolicí. Na druhou stranu existuje množství případů proléčiv neboli prodrugs, která jsou teprve až působením biotransformačních enzymů přeměněna na vlastní účinnou formu léčiva. Například řada léčiv ze skupiny cytostatik je aplikována ve formě proléčiv a až v organismu jsou tato léčiva působením enzymů přeměňována na aktivní metabolity, které jsou vlastními nositeli farmakologického účinku. Tak například cyklofosamid je působením biotransformačních enzymů přeměňován na 4-hydroxymetabolit, který se spontánně rozkládá na urotoxický akrolein a farmakologicky účinnou látku fosforamid (Obr. 1). Fosforamid obsahuje ve své struktuře tzv. hořčičný (yperitový) dusík, díky němuž tato látka alkylujícím mechanismem poškozuje strukturu DNA (Kwon, 1999).



Obrázek 1. Bioaktivace cyklofosfamidů; hydroxylovaný metabolit se rozkládá na účinný fosforamid

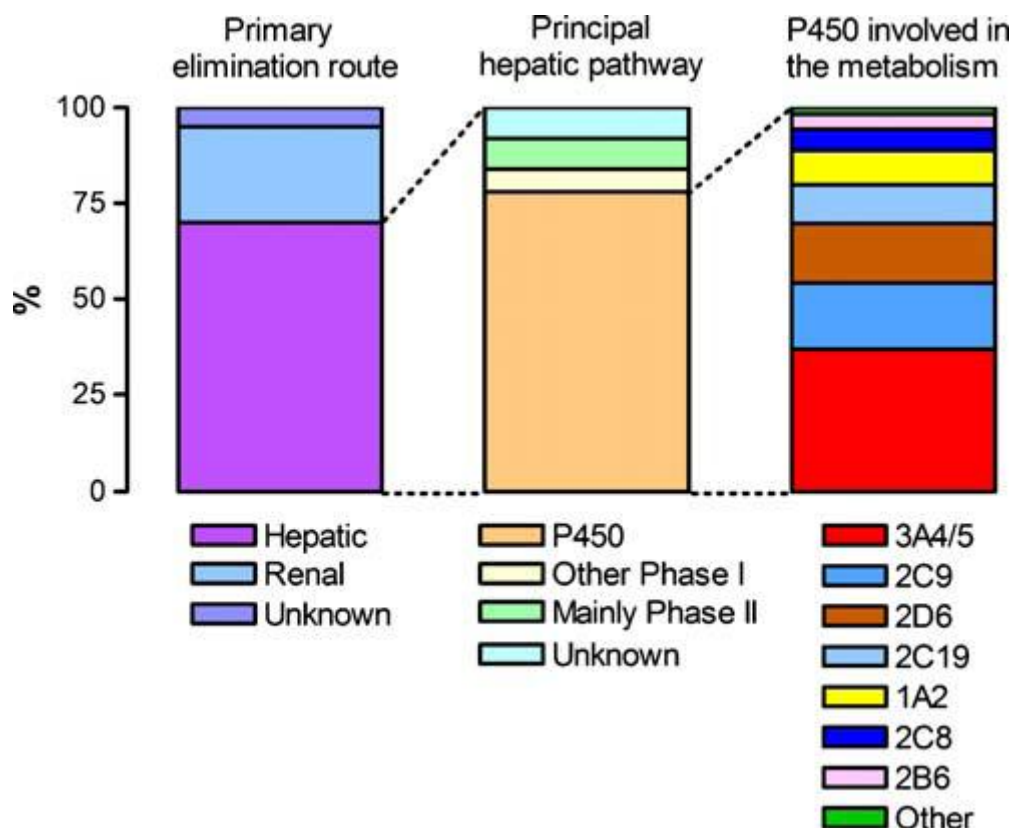
Řada farmakologicky účinných léčiv podléhá biotransformaci, která vede většinou k inaktivaci jejich účinku, ale v mnoha případech biotransformační přeměnou molekuly parentního léčiva vznikají farmakologicky aktivní metabolity. Například benzodiazepinový derivát diazepam je přeměňován na metabolity, které jsou taktéž biologicky aktivní (Obr. 2) (Anderson a Miller, 2002).

Metabolismus, resp. biotransformace léčiva, je tedy často souborem řady biotransformačních reakcí vedoucích ke vzniku škály metabolitů s různým farmakologickým účinkem ve srovnání s parentní látkou.



Obrázek 2. Biotransformace diazepamů systémem cytochromu P450; vznikající metabolity jsou více či méně farmakologicky účinné jako parentní léčivo diazepam

Biotransformace léčiv zahrnuje klasicky dvě fáze. V první fázi prochází léčivo převážně oxidačními nebo redukčními, případně hydrolytickými reakcemi, přičemž dochází k odhalení či syntéze polární funkční skupiny ve struktuře parentního léčiva (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH a -COOH funkční skupina). Tyto reakce jsou katalyzovány řadou tzv. enzymů I. fáze metabolismu xenobiotik, z nichž nejvíce se na metabolismu léčiv podílí systém cytochromů P450 (Obr. 3). Metabolity, vznikající v této fázi biotransformace jsou oproti parentnímu léčivu více polární. Fakticky dochází ke zvýšení rozpustnosti daného léčiva, resp. metabolitu ve vodě a tím se usnadní následně jeho eliminace z organismu.



Obrázek 3. Nejvýznamnější eliminační cesty běžně předepisovaných léčiv v USA (Zanger a spol., 2008)

Nově vzniklé funkční skupiny jsou pak často cílem působení enzymů II. fáze metabolismu xenobiotik neboli konjugačních enzymů. Název konjugační enzymy je odvozen od faktu, že tyto enzymy katalyzují konjugaci, tedy spojení léčiva, resp. jeho metabolitu, s látkami endogenní povahy. Výsledkem těchto reakcí je vznik vysoce polárního metabolitu, který je pak snadno vylučován z těla močí nebo žlučí a následně stolicí. Nejdůležitějšími enzymy II. fáze metabolismu jsou UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a sulfotransferasy (SULT). UGT katalyzují konjugaci látek s UDP-glukuronovou kyselinou, zatímco SULT katalyzují konjugaci látek s endogenním sulfátem, PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát). Tato práce se zabývá studiem interakcí potenciálních léčiv s CYP a vybranými konjugačními enzymy, proto další kapitoly budou věnovány vztahu těchto enzymů k metabolismu léčiv.

### 3.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) představují poměrně rozsáhlou nadrodinu enzymů, které jsou hojně exprimovány napříč celou rostlinnou a živočišnou říší. U rostlin se podílí na syntéze řady nezbytných tzv. sekundárních metabolitů, které slouží jednak k regulaci např. růstu rostliny (růstové hormony) a nebo k obraně před ostatními organismy (rostlinné toxiny). U živočichů a především u člověka tyto enzymy katalyzují reakce, které představují velmi důležité stupně biosyntézy řady endogenních látek (cholesterol, vitamíny, steroidní hormony, žlučové kyseliny, prostaglandiny) (Danielson, 2002). U člověka a dalších živočišných druhů se řada CYP podílí také na biotransformaci látek vstupujících do organismu z vnějšího prostředí (polutanty, toxiny, prokarcinogeny, léčiva). Do dnešní doby bylo identifikováno u člověka celkem 57 genů pro cytochromy P450, u některých z nich nebyla ještě dostatečně popsána jejich struktura a funkce, kterou zastupují v organismu (Guengerich, 1995). V Tabulce 1 je uveden obecný přehled nejdůležitějších lidských cytochromů P450 a jejich substrátů.

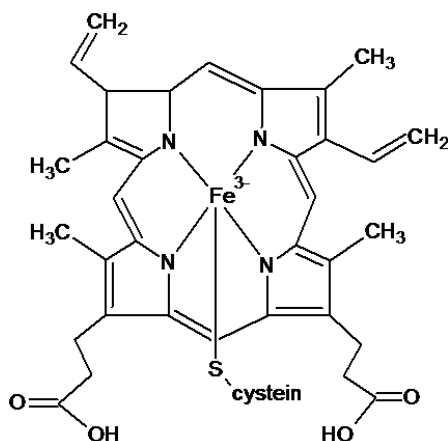
Substráty	Cytochromy P450
mastné kyseliny	4A11, 4B1, 4F12, 2J2
eikosanoidy	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1
vitamíny	24A1, 26A1, 26B1, 27B1
steroidy	7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1
xenobiotika	1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7

Tabulka 1. Rozdělení lidských cytochromů P450 dle typu jejich substrátů (Guengerich, 1995)

Cytochromy P450 patří do skupiny proteinů obsahujících hem, podobně jako je to v případě hemoglobinu či myoglobinu. Specifickou vlastností cytochromů P450 je jejich schopnost absorbovat UV-VIS záření o vlnové délce 450 nm po redukci hemového železa a vazbě oxidu uhelnatého na hem, čímž se odlišují od ostatních

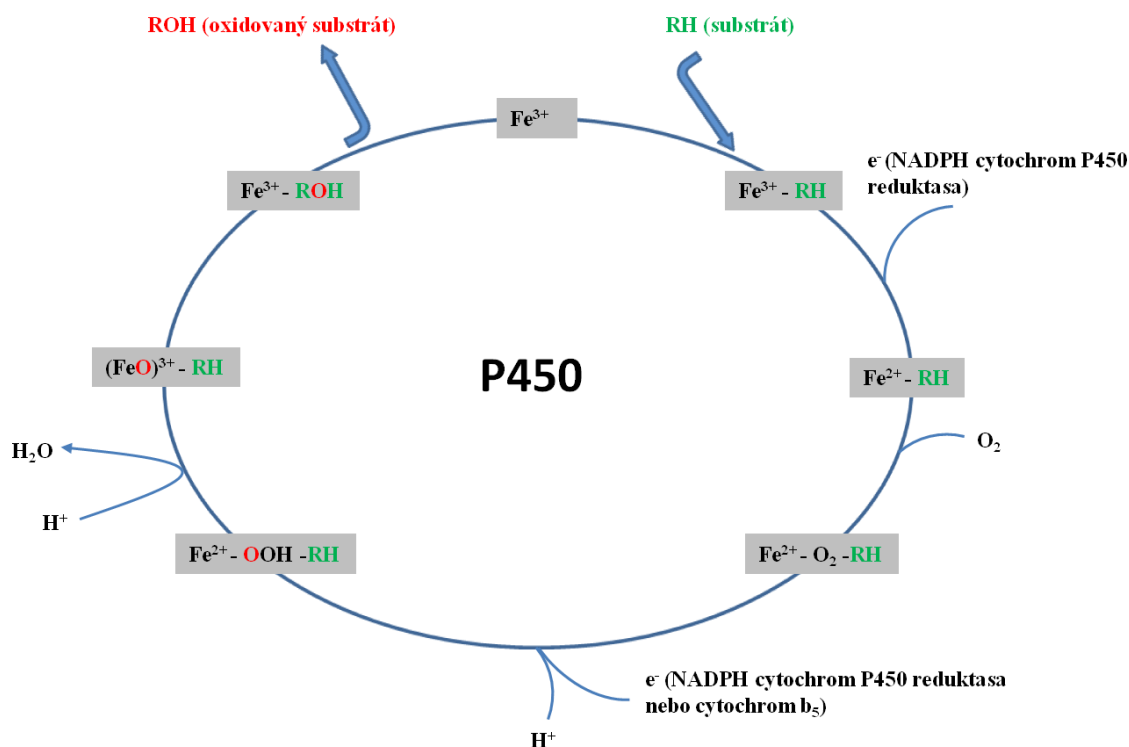


hemoproteinů. Tato vlastnost je způsobena vazbou specifického ligandu na hemové železo. Tímto ligandem je  $S^-$  (anion síry) pocházející z aminokyseliny cysteinu v aktivním místě enzymu (Nelson, 1999). Další čtyři ligandy, které se váží na hemové železo, představují atomy dusíku porfyrinového jádra hemu (Obr. 4). Posledním ligandem vázajícím se na hemové železo je atom kyslíku.



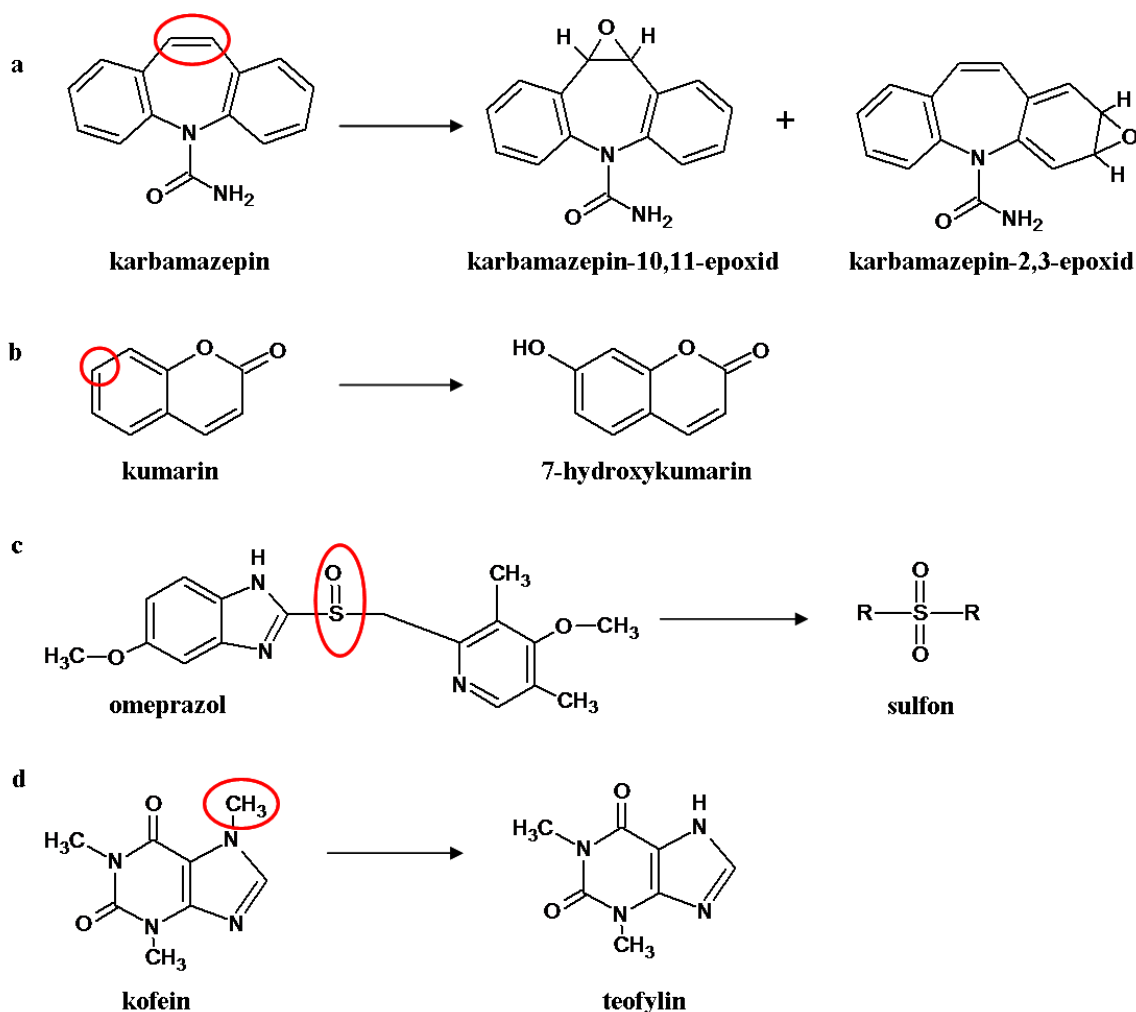
Obrázek 4. Struktura hemu v CYP; pátým ligandem, který se váže na hemové železo je síra pocházející z cysteinu v aktivním místě enzymu.

CYP jsou podle klasické enzymové nomenklatury oxidasami se smíšenou funkcí nebo také jinými slovy monooxygenasami, protože mají schopnost jeden atom kyslíku inkorporovat do molekuly substrátu a druhý atom z molekuly kyslíku poskytnout ke vzniku molekuly vody. Proto častým typem reakcí, které CYP katalyzují, jsou hydroxylace. Katalytický cyklus CYP je poměrně složitý a zahrnuje několik kroků (Obr. 5). Pro samotnou reakci je nutná přítomnost dalších složek kooperujících se samotným enzymem. V případě CYP podílejících se na metabolismu léčiv se jedná o NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasu, FAD, FMN, cytochrom  $b_5$  a fosfolipidy (Guengerich a Johnson, 1997).



Obrázek 5. Klasické schéma katalytického cyklu cytochromu P450 (překresleno dle [http://www.reactome.org/figures/p450\\_cat\\_cycle.JPG](http://www.reactome.org/figures/p450_cat_cycle.JPG))

CYP nekatalyzují pouze hydroxylační reakce na atomu uhlíku, ale účastní se i dalších biotransformačních reakcí jako jsou epoxidace na dvojně vazbě; oxygenace heteroatomu síry, dusíku a jódu; N-hydroxylace; dealkylace na heteroatomu síry, dusíku a kyslíku; dehydrogenace; oxidativní deaminace; redukční dehalogenace a štěpení esterové vazby. Příklady některých výše uvedených reakcí jsou znázorněny na Obr. 6 (Parkinson, 2005).



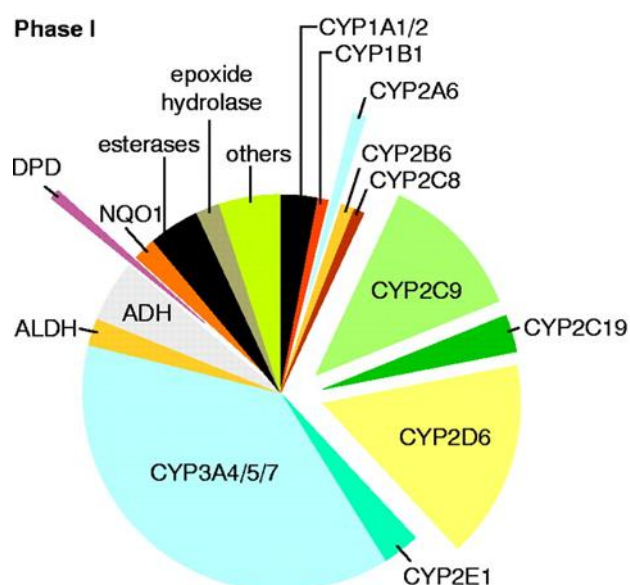
Obrázek 6. Příklady biotransformačních reakcí léčiv katalyzovaných lidskými mikrosomálními jaterními CYP: a) epoxidace karbamazepinu, b) hydroxylace kumarinu, c) *S*-oxygenace omeprazolu, c) *N*-dealkylace kofeinu

CYP jsou membránově vázané enzymy a v buňkách jsou lokalizovány na dvou místech, jednak v mitochondriích a jednak v mikrosomální buněčné frakci (membrány endoplazmatického retikula). Mitochondriální CYP se účastní zejména biosyntézy endogenních látek (např. steroidní hormony, prostaglandiny, cholesterol), zatímco mikrosomální CYP hrají velmi důležitou roli v metabolismu léčiv a jiných xenobiotik. V organismu jsou CYP metabolizující léčiva lokalizovány především v játrech. V určité míře jsou tyto enzymy exprimovány i v ostatních částech gastrointestinálního traktu, zejména ve střevech, ale nalézt je můžeme například i v plicích, ledvinách, nebo v mozku (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Tabulka 2 uvádí obsah celkového CYP proteinu ve vybraných lidských tkáních.

Tkáň	Obsah CYP (nmolP450/mg tkáně)
játra	0,30-0,60
nadledvinky	0,23-0,54
tenké střevo	0,03-0,21
mozek	0,10
ledviny	0,03
plíce	0,01
varlata	0,01

Tabulka 2. Množství celkového CYP ve vybraných lidských tkáních, jaterní tkáň obsahuje majoritní množství CYP (Hrycay a Bandiera, 2008)

Nejdůležitější cytochromy P450 podílející se na metabolismu léčiv patří do rodin CYP1, CYP2 a CYP3. Enzymy patřící do výše uvedených rodin jsou zodpovědné za 70-80 % reakcí, kterým podlehají v I. fázi metabolismu léčiva používaná v klinické praxi (Bertz a Granneman, 1997). Na Obr. 7 je uveden graf znázorňující podíl nejdůležitějších CYP na metabolismu léčiv z hlediska počtu přeměňovaných léčiv (Evans a Relling, 1999).



Obrázek 7. Podíl jednotlivých CYP na metabolismu léčiv z hlediska kvantity přeměňovaných léčiv (Evans a Relling, 1999)

V Tabulce 3 jsou uvedeny nejvýznamnější zástupci CYP podílející se na metabolismu léčiv; jejich hlavní orgánová lokalizace a příklady jejich substrátů (léčiv)(Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Ingelman-Sundberg, 2004; <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>, 2010).

CYP patří tedy mezi nejdůležitější enzymy I. fáze metabolismu léčiv. Léčiva biotransformovaná těmito enzymy vstupují často do lékových interakcí s dalšími léčivy. Tyto interakce mohou vést k výskytu nežádoucích, toxických účinků léčiva či v opačném případě k snížení plazmatické hladiny léčiva, resp. poklesu jeho hladiny v cílové tkáni na subterapeutickou úroveň. Tyto interakce vyplývají z faktu, že řada látek má schopnost inhibovat aktivitu některých CYP a jiné látky mohou naopak vyvolat indukci CYP (Pelkonen a spol., 2008). Blíže bude o těchto mechanismech zmíněno v příslušné kapitole o lékových interakcích.

<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát
<b>CYP1A2</b> <i>Játra</i> amitriptylin kofein klomipramin klozapin estradiol fluvoxamin haloperidol imipramin naproxen olanzapin ondansetron fenacetin paracetamol propranolol teofylin verapamil (R)-warfarin	<b>CYP2C8</b> <i>Játra, ledviny</i> paclitaxel torsemid amodiaquin cerivastatin repaglinid	<b>CYP2D6</b> <i>Játra, mozek, srdce</i> karvedilol S-metoprolol propafenon timolol amitriptylin klomipramin desipramin imipramin paroxetin haloperidol perfenazin risperidon thioridazin bufuralol chlorpromazin kodein debrisochin fluoxetin

<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát
		fluvoxamin lidokain metoklopramid nortriptylin ondansetron oxykodon fenacetin prometazin propranolol spartein tamoxifen tramadol venlafaxin
<b>CYP2A6</b> <i>játra</i> nikotin kumarin steroidy	<b>CYP2C9</b> <i>játra</i> diklofenak ibuprofen lornoxicam meloxicam naproxen piroxicam suprofen tolbutamid glipizid losartan irbesartan glyburid glibenklamid glipizid glimepirid amitriptylin celecoxib fluoxetin fluvastatin glyburid nateglinid fenytoin rosiglitazon tamoxifen torsemid S-warfarin	<b>CYP2E1</b> <i>Játra, plíce, mozek, srdce</i> <i>kostní dřev</i> enfluran halothan isofluran methoxyfluran sevofluran acetaminofen benzen chlorzoxazon ethanol

<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát
<b>CYP2B6</b> <i>játra, srdce</i> bupropion cyklofosfamid efavirenz ifosfamid methadon	<b>CYP2C19</b> <i>játra, srdce</i> lansoprazol omeprazol pantoprazol rabeprazol diazepam phenytoin mephenytoin phenobarbiton amitriptylin carisoprodol citalopram chloramphenicol clomipramin cyklofosfamid hexobarbital imipramin indomethacin moklobemid nelfinavir primidon progesteron propranolol teniposid R-warfarin	<b>CYP3A4</b> <i>játra, střeva, ledviny, plíce, mozek, lymfocyty placenta</i> klarithromycin erythromycin telithromycin antiarytmika alprazolam diazepam midazolam triazolam cyklosporin tacrolimus indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir cisaprid astemizol terfenadin amlodipin diltiazem felodipin nifedipin nitrendipin verapamil atorvastatin cerivastatin lovastatin simvastatin estradiol hydrokortison progesteron testosteron alfentanyl aripiprazol buspiron cilostazol kodein dapson dexamethason

<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Hlavní tkáňová lokalizace</i> Substrát
		dextromethorphan docetaxel domperidon fentanyl finasterid gleevec haloperidol irinotekan lidokain methadon ondansetron propranolol quetiapin quinin risperidon salmeterol sildenafil sirolimus tamoxifen taxol terfenadin trazodon vinkristin zaleplon zolpidem

Tabulka 3. Nejdůležitější CYP metabolizující léčiva, jejich tkáňová lokalizace a příkladysubstrátů jednotlivých CYP (podle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Ingelman-Sundberg, 2004; <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>, 2010)

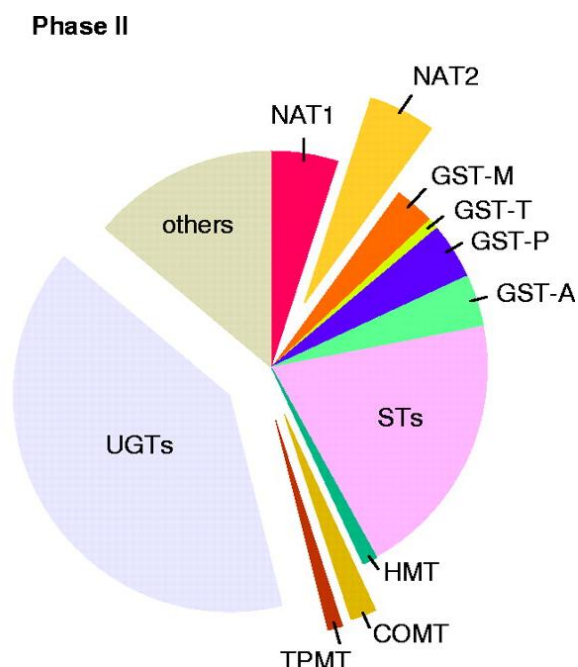
### 3.3. Konjugační enzymy

Konjugační enzymy nebo jiným názvem enzymy II. fáze metabolismu xenobiotik také velkou měrou přispívají k eliminaci řady léčiv. Tyto enzymy katalyzují reakce, ve kterých je léčivo konjugováno s endogenní látkou v místě polární funkční skupiny, která byla ve struktuře parentního léčiva často odhalena nebo syntetizována v reakcích katalyzovaných zejména jaterními mikrosomálními



CYP. Konjugační enzymy patří obecně mezi transferasy, tj. enzymy mající schopnost přenášet určité chemické struktury na molekuly cílové látky, v našem případě molekuly léčiva. Nejvýznamnějšími enzymy II. fáze metabolismu léčiv jsou UGT a SULT. Endogenní substráty vstupující do konjugačních reakcí (v případě UGT to je glukuronová kyselina, v případě SULT sulfát) jsou látky vysoce polární a jejich sloučení s léčivem vede ve většině případů k tvorbě vysoce polárního metabolitu a jeho následné eliminaci z organismu především močí nebo stolicí. Na Obr. 8 je shrnut příspěvek jednotlivých konjugačních enzymů k metabolismu léčiv.

Konjugační enzymy jsou v buňkách lokalizovány především v cytosolu. Výjimku tvoří UGT, které jsou vázány v membránách endoplazmatického retikula.



Obrázek 8. Podíl jednotlivých konjugačních enzymů na metabolismu léčiv z hlediska počtu přeměňovaných látek (UGT, UDP-glukuronosyltransferasy; ST, sulfotransferasy; NAT, *N*-acetyltransferasy; GST, glutathion-*S*-transferasy; HMT, histamin-*N*-methyltrans-ferasa; COMT, katechol-*O*-methyltransferasa; TPMT, thiopurinmethyltransferasa) (Evans a Relling, 1999)

### 3.3.1. UDP-glukuronosyltransferasy

UGT katalyzují tzv. glukuronidaci léčiv, která představuje hlavní biotransformační cestu řady látek v rámci II. fáze metabolismu léčiv u savců s výjimkou kočkovitých šelem (Miners a Mackenzie, 1991; Burchell a Coughtrie, 1989; Tukey a Strassburg, 2000).

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, UGT patří mezi membránově vázané enzymy. Jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu řady tkání, především v játrech, střevech, ledvinách, mozku, slezině, kůži a nosní sliznici.

Místem glukuronidace u léčiv bývají nukleofilní heteroatomy kyslíku, síry či dusíku, proto nejčastějšími substráty podléhajícími glukuronidaci jsou alifatické alkoholy, látky fenolické povahy, karboxylové kyseliny, látky obsahující aminoskupinu a další. Endogenní látkou vstupující do glukuronidační reakce je UDP-glukuronová kyselina. Vzniklé glukuronidy léčiv jsou snadno vylučovány z těla močí nebo stolicí díky jejich vysoké polaritě, kterou do léčiva vnáší právě glukuronová kyselina. Mezi substráty UGT patří i endogenní látky, jako jsou žlučové kyseliny, bilirubin nebo steroidní hormony, ale také i prokarcinogeny z vnějšího prostředí (Ritter, 2000; Tukey a Strassburg, 2000).

Samotná lokalizace UGT v membránách endoplazmatického retikula představuje dosud ne zcela vyřešený problém týkající se transportu hydrofilní UDP-glukuronové kyseliny k samotnému enzymu vázanému v hydrofóbní membráně a zároveň transport uvolněného UDP nazpět do cytosolu. Teorie předpokládá přítomnost určitého transportéru, který přenáší UDP-glukuronovou kyselinu do lumen endoplazmatického retikula a nazpět UDP do cytosolu pro syntézu nové UDP-glukuronové kyseliny. Radomska-Pandya a spol. (1999) navrhli, že tyto enzymy vytváří homo a heterodimery, které jsou stabilizovány vazbou substrátu. Tyto dimery vytváří kanály, kterými prostupují do endoplazmatického retikula molekuly UDP-glukuronové kyseliny a nazpět do cytosolu je uvolňován vzniklý glukuronid a UDP. Oligomerizace UGT může hrát roli při rychlosti eliminace léčiv (Lin a Wong, 2002). Lokalizace UGT na lumenální straně endoplazmatického retikula představuje určitý limitující krok při experimentech s mikrosomální frakcí lidských jater obsahující příslušné enzymy (Fisher a spol., 2001). Aby byly UGT přístupné pro léčivo a

konjugující substrát (UDP-glukuronovou kyselinu) *in vitro*, musí dojít k jejich uvolnění z membránových struktur. To se děje nejčastěji použitím detergentu, sonikací jaterní mikrosomální frakce ultrazvukem nebo použitím vhodného antibiotika (alamethicin) vytvářejícího póry v biologických membránách.

Nejdůležitější UGT podílející se na metabolismu léčiv patří do podrodin UGT1A a UGT2B. Tabulka 4 shrnuje nejvýznamnější UGT podílející se na metabolismu léčiv, jejich majoritní tkáňovou lokalizaci a přehled nejvýznamnějších substrátů (Tukey a Strassburg, 2000; Fisher a spol., 2001; Cheng a spol., 1998 and Kiang a spol., 2005). Pro tyto enzymy je typická nízká substrátová specifita, což znamená, že na glukuronidaci jednoho léčiva se podílí více jednotlivých UGT. Vyřazení jedné UGT z metabolismu daného léčiva např. vlivem inhibitoru nemusí tedy nutně vést ke snížení glukuronidace a následné pomalé eliminaci dané látky z organismu. Stejně jako u CYP může být aktivita UGT inhibována některými látkami, na druhou stranu jsou některé UGT také indukovatelné.

<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát
<b>UGT1A1</b> <i>játra</i> paracetamol buprenorfin karvedilol ethinylestradiol etoposid morfin kyselina mykofenolová naltrexon troglitazon	<b>UGT1A3</b> <i>játra</i> amitriptylin buprenorfin klofibrát klozapin diklofenak ibuprofen flurbiprofen ketoprofen imipramin morfin kyselina valproová	<b>UGT1A4</b> <i>játra</i> amitriptylin chlorpromazin klozapin imipramin olanzapin tamoxifen trifluoperazin	<b>UGT1A6</b> <i>játra</i> paracetamol morfin kyselina valproová
<b>UGT1A7</b> <i>jícen, žaludek, plíce</i> kyselina	<b>UGT1A8</b> <i>gastrointestinální trakt</i>	<b>UGT1A9</b> <i>játra</i> paracetamol	<b>UGT1A10</b> <i>gastrointestinální trakt</i>

<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát	<b>Enzym</b> <i>Lokalizace</i> Substrát
mykofenolová	morfin kyselina mykofenolová naloxon naltrexon propofol raloxifen	diklofenak flurbiprofen ibuprofen ketoprofen morfin kyselina mykofenolová nikotin oxazepam kyselina valproová propofol	warfarin morfin raloxifen kyselina mykofenolová
<b>UGT2B4</b> <i>játra</i> karvedilol	<b>UGT2B7</b> <i>játra</i> buprenorfin karvedilol karbamazepin kodein cyklosporin A diklofenak flurbiprofen ibuprofen ketoprofen morfin naproxen nalorfin oxazepam takrolimus zidovudin kyselina valproová	<b>UGT2B15</b> <i>játra</i> entacapon tolcapon oxazepam	<b>UGT2B17</b> <i>játra</i> ibuprofen

Tabulka 4. UGT podílející se na biotransformaci léčiv, jejich hlavní tkáňová lokalizace a nejvýznamnější substráty (Tukey a Strassburg, 2000; Fisher a spol., 2001; Cheng a spol., 1998 and Kiang a spol., 2005)

### 3.3.2. Sulfotransferasy

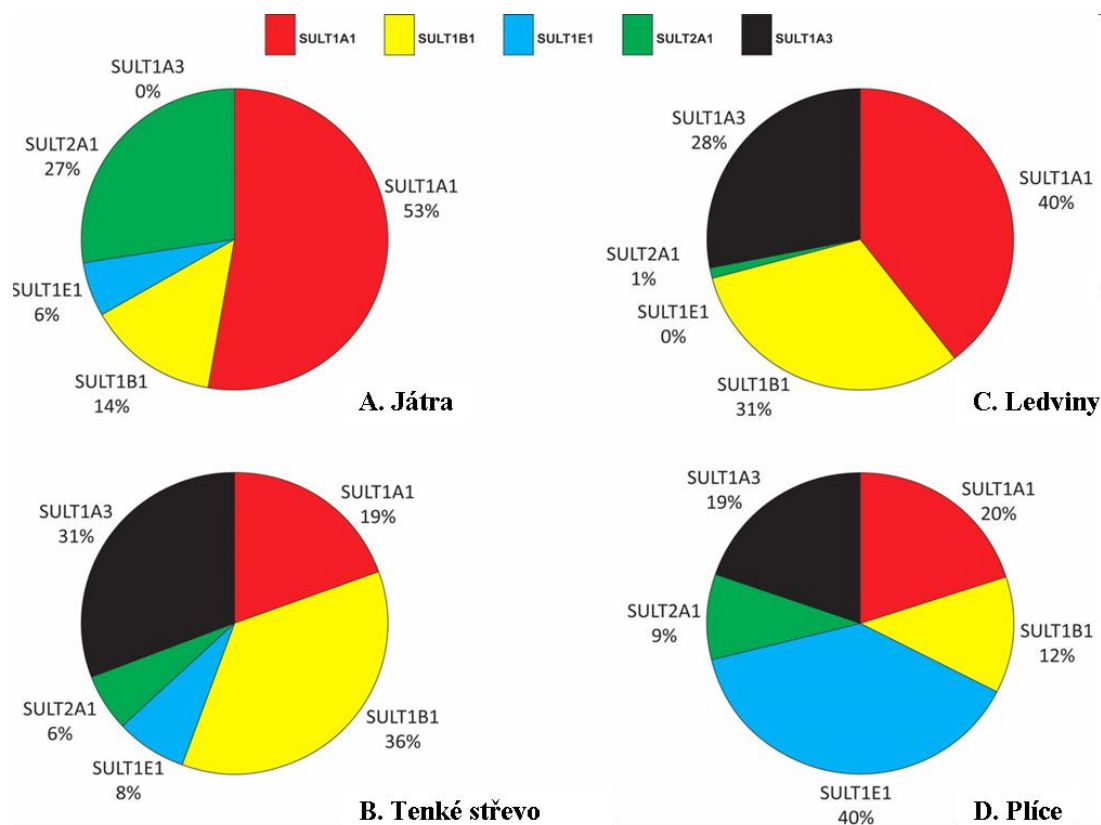
SULT patří stejně jako UGT k enzymům II. fáze metabolismu xenobiotik, které se také významnou měrou podílejí na metabolismu léčiv (Falany, 1997). Hlavní rolí těchto enzymů v metabolismu léčiv je tvorba příslušných sulfátů, které jsou vysoce hydrofilní a jsou velmi rychle eliminovány z těla močí (Lindsay a spol., 2008). Již Baumann v roce 1876 identifikoval v moči fenolsulfát po podání fenolu pacientovi (Baumann, 1876). Ačkoliv hlavní role SULT spočívá v detoxifikaci léčiv, existují i případy, kdy SULT přispívají k aktivaci promutagenů, teratogenů a prokarcinogenů (Glatt, 1997; Glatt, 2001). Jsou známy také případy, kdy nově vzniklý sulfát vykazuje vyšší farmakologickou účinnost oproti parentnímu léčivu. Tak je tomu například v případě minoxidilu, který je substrátem SULT (Falany a Kerl, 1990). Minoxidil je lékem indikovaným k léčbě závažné hypertenze a bývá používán i jako prostředek podporující růst vlasů. Minoxidil je ovšem pouze proléčivo, které se ve farmakologicky aktivní formu mění právě působením SULT (Waldon a spol., 1989).

SULT přenáší vysoce polární sulfátovou skupinu z endogenního látky 5'-fosfoadenosinu-3'-fosfosulfátu (PAPS) na příslušné endo- i exogenní substráty (Zhang a spol., 1998).

U savců můžeme rozlišit dvě skupiny SULT. První skupina lokalizovaná v buňkách v Golgiho aparátu se podílí na metabolismu endogenních látek (např. látek steroidní povahy), zatímco druhá skupina SULT lokalizovaných v cytosolu katalyzuje biotransformační reakce nízkomolekulárních endogenních látek (neurotransmitery) a rovněž xenobiotik (Glatt a spol., 2001).

Doposud bylo identifikováno a do různé míry popsáno celkem 13 lidských SULT (Riches a spol., 2009). Mezi sulfotransferasy podílející se u člověka na metabolismu léčiv patří SULT1A1, SULT1A3, SULT1B1, SULT1E1 a SULT2A1. Na Obr. 9 jsou uvedeny grafy znázorňující zastoupení jednotlivých SULT v různých tkáních lidského těla. SULT1A1 je patrně nejvýznamnější jaterní SULT podílející se na metabolismu léčiv u člověka. SULT1A1 tvoří v játrech 50 % z celkového SULT proteinu. Naopak v tenkém střevě je exprese tohoto enzymu snížena na rozdíl od SULT1A3 a SULT1B1, které jsou ve střevní tkáni exprimovány ve zvýšené míře. SULT1A3 lze detekovat v játrech pouze v prenatálním období života, po narození

exprese tohoto enzymu v játrech klesá na 0%. SULT1A3 je zodpovědná za sulfataci biogenních aminů (dopamin, adrenalin, noradrenalin) (Eisenhofer a spol., 1999; Blanchard a spol., 2004). Dále se tento enzym podílí na sulfataci některých léčiv, například salbutamolu a apomorfinu (Morgan a spol., 1986; Thomas a Coughtrie, 2003). Dle Teubnera a spol. (2007) je SULT1A3 hlavní extrahepatickou formou SULT se zvýšenou expresí v tenkém střevě. Díky tomuto faktu je SULT1A3 považována za enzym výrazně ovlivňující biodostupnost některých perorálně podávaných léčiv či biogenních aminů obsažených v potravě. Význam všech SULT predominantně exprimovaných mimo jaterní tkáň pro metabolismus léčiv by měl být proto posouzen u všech nově testovaných terapeutik s perorálním podáním. Příklady substrátů jednotlivých SULT jsou uvedeny v Tab 5.



Obrázek 9. SULT participující v metabolismu xenobiotik a jejich poměrné zastoupení v různých tkáních lidského těla (Riches a spol., 2009)

<b>Enzym</b>	<b>Xenobiotikum/substrát</b>
<b>SULT1A1</b>	paracetamol (Adjei a spol., 2008) sloučeniny cigaretového kouře (Yasuda a spol., 2007) apomorfin (Thomas a Coughtrie, 2003) minoxidil (Hempel a spol., 2007) orální kontraceptiva (Yasuda a spol., 2005)
<b>SULT1A3</b>	paracetamol (Adjei a spol., 2008) sloučeniny cigaretového kouře (Yasuda a spol., 2007) salbutamol (Morgan a spol., 1986) apomorfin (Thomas a Coughtrie, 2003)
<b>SULT1B1</b>	prokarcinogeny (Riches a spol., 2009)
<b>SULT1E1</b>	paracetamol (Adjei a spol., 2008)
<b>SULT2A1</b>	chinolony (Senggunprai a spol., 2009) desipramin (Senggunprai a spol., 2009) metoklopramid (Senggunprai a spol., 2009)

Tabulka 5. Příklady substrátů nejvýznamnějších SULT podílejících se na biotransformaci xenobiotik

### **3.4.Lékové interakce odvozené od metabolismu léčiv**

V předchozích kapitolách byly představeny enzymové systémy, které hrají významnou roli v metabolismu celé řady léčiv a jiných cizorodých látek, jako jsou látky obsažené v potravě, průmyslové chemikálie a podobně. Cílem reakcí katalyzovaných těmito enzymovými systémy je především eliminace cizorodých látek z organismu prostřednictvím tvorby vysoce polárních metabolitů. V některých případech naopak dochází k přeměně proléčiva na farmakologicky aktivní formu. Obecně, léčiva působí v organismu na různých úrovních, interagují s biologickými systémy (především receptory) a vyvolávají odezvu organismu, což vede k požadovanému farmakologickému účinku léčiva. Kromě těchto požadovaných farmakologických účinků mohou být interakce léčiva s organismem také nežádoucí.

Lékové interakce (příčemž na mysli máme samozřejmě nežádoucí interakce léčiv) se dělí na interakce na základě (i) farmaceutických interakcí (tzv. lékové inkompatibility), (ii) farmakodynamického účinku (např. sedativa a alkohol), a (iii) na základě ovlivnění farmakokinetiky léčiv, ať se jedná o snížení absorpce léčiva (např. změnou pH), ovlivnění distribuce (kompetice o vazbu na plazmatické bílkoviny), o vliv metabolismu (např. snížení hladiny léčiva v důsledku extenzivního metabolismu) a o ovlivnění eliminace léčiv (interference na úrovni vylučování léčiv a jejich metabolitů například v ledvinách). Lékové interakce odvozené od metabolismu léčiv se vyskytují velmi často, protože řada látek, ať už jsou to samotná léčiva nebo jiné cizorodé látky, má schopnost určitým způsobem ovlivnit funkci vlastních enzymů metabolizujících léčiva či případně zasáhnout do jejich biosyntézy. Problém často nastává u lidí užívajících současně více léčiv, z nichž některé mají potenciál negativně ovlivňovat aktivitu těchto “postižených“ enzymů a jiné jsou naopak jejich substráty.

#### 3.4.1. Lékové interakce na úrovni CYP

Nejvíce interakcí léčiv pramenících z ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů bylo doposud odhaleno v systému cytochromů P450. Byly popsány jednak interakce léčiv vznikající v důsledku inhibice enzymové aktivity CYP a dále byly identifikovány látky, které vyvolaly tzv. indukci exprese CYP.

##### 3.4.1.1. *Inhibice CYP*

Inhibice CYP cizorodými látkami, resp. léčivy je známa již řadu let. Např. Rendic a spol. (1983) popsali, že cimetidin inhibuje nescificky aktivitu CYP v mikrosomální frakci lidských a prasečích jater. Od té doby byly identifikovány desítky látek, které jsou více či méně selektivními inhibitory jednotlivých CYP. Inhibice CYP představují nejběžnější příčinu závažných lékových interakcí, které měly za následek stažení několika léčiv z trhu (mibefradil, terfenadin, cisaprid). Cisaprid byl často předepisován v USA jako prokinetikum při léčbě různých gastrointestinálních poruch, zejména gastroezofageálního refluxu u dětí a dospělých. V souvislosti s jeho užíváním bylo popsáno přes tři sta případů ventrikulární arytmie,



kteřá v desítkách případů skončila smrtí. Bylo zjištěno, že cisaprid je substrátem CYP3A4 a je-li současně podáván s některým z inhibitorů CYP3A4 (někteřá azolová antimykotika či makrolidová antibiotika), jeho koncentrace v organismu překročí rozsah hladin v terapeutickém rozmezí a mohou se tak projevit toxické účinky tohoto léčiva, tj. vyvolání srdeční arytmie (Michalets a Williams, 2000). Antihistaminikum terfenadin bylo staženo z trhu také díky nežádoucím kardiotoxickým účinkům v důsledku analogické inhibice jeho metabolismu prostřednictvím CYP3A4 (Kivisto a spol., 1994). Mibefradil je antagonist na kalciových kanálech a byl předepisován jako účinný lék při léčbě hypertenze a stabilní anginy pectoris. Mibefradil působí jako potentní inhibitor CYP3A4, a proto byl stažen z trhu pro vysoké riziko vzniku závažných lékových interakcí (Welker a spol., 1998) z důvodu inhibice metabolismu současně užívaných léčiv, které byly zároveň substráty příslušného CYP. Lze uvést, že inhibice CYP může vést ke zvýšení biodostupnosti léčiv, u kterých je typický first-pass efekt, tj. efekt prvního průchodu játry. Nejčastěji však dochází k snížení rychlosti biotransformace léčiva v důsledku inhibice metabolismu dané látky CYP a následně nárůstu plazmatické hladiny daného léčiva a manifestaci jeho nežádoucích a často i toxických účinků.

Inhibitory CYP lze rozdělit (podle zvyklostí z enzymologie) na kompetitivní inhibitory, nekompetitivní inhibitory, akompetitivní inhibitory a smíšené inhibitory. Nejznámějším typem inhibitorů jsou kompetitivní inhibitory. Tyto látky kompetují s dalším substrátem o vazbu do aktivního místa enzymu. Kompetitivní inhibitory bývají zároveň substráty daného enzymu, ale mohou to být i látky, které nejsou daným enzymem metabolizované. Účinek kompetitivního inhibitoru se dá zvrátit zvýšením koncentrace substrátu a vytěsněním inhibitoru z vazebného místa enzymu, proces kompetice přitom závisí také na afinitě substrátu a inhibitoru k danému enzymu. Kompetitivní inhibitor účinkuje tedy velmi rychle, ale jeho působení nevede k destrukci enzymu (Lin a Lu, 1998). V případě nekompetitivní inhibice se inhibitor váže na jiné místo enzymu než je aktivní místo vázající substrát. Akompetitivní inhibitor se váže pouze na komplex enzym-substrát, nikoliv na samotný enzym. V praxi se ale nejčastěji setkáváme se smíšeným typem inhibice, který kombinuje především prvky kompetitivní a nekompetitivní inhibice (Hollenberg, 2002). V praxi se lze často setkat s tzv. ireverzibilními inhibitory. V tomto případě je enzymová inhibice nevratný proces, který lze zvrátit pouze syntézou enzymu de novo. Některé ireverzibilní inhibitory jsou někdy také označovány jako tzv. sebevražedné substráty.

Ireverzibilní inhibitor je přeměňován daným enzymem na metabolit, sebevražedný substrát, který sám způsobí teprve nevratnou enzymovou inhibici daného enzymu. Příkladem ireverzibilního inhibitoru je inhibitor CYP1A2 furafyllin (Sesardic a spol., 1990; Kunze a Trager, 1993) a inhibitor CYP3A4 gestoden (Guengerich, 1990; Back a spol., 1991).

<b>CYP</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>typ inhibice</b>	<b>reference</b>
CYP1A2	ciprofloxacin	kompetitivní	McLellan a spol. (1996)
	furafyllin	ireverzibilní	Sesardic a spol. (1990)
	fluvoxamin	kompetitivní	Rasmussen a spol. (1995)
CYP2A6	tranylcypromin	kompetitivní	Zhang a spol. (2001)
	8-methoxypsoralen	ireverzibilní	Draper a spol. (1997)
CYP2B6	tiklopidin	ireverzibilní	Richter a spol. (2004)
	klopidogrel	ireverzibilní	Richter a spol. (2004)
	17-alfa-ethinylestradiol	ireverzibilní	Kent a spol. (2002)
CYP2C8	montelukast	kompetitivní	Walsky a spol. (2005)
	trimetoprim	kompetitivní	Wen a spol. (2002)
	kvercetin	kompetitivní	Li a spol. (2002)
CYP2C9	sulfafenazol	kompetitivní	Baldwin a spol. (1995)
	flukonazol	smíšená	Kunze a spol. (1996)
	amiodaron	nekompetitivní	Heinmark a spol. (2000)
CYP2C19	omeprazol	kompetitivní	Ko a spol. (1997)
	tiklopidin	ireverzibilní	Turpeinen a spol. (2006)
CYP2D6	quinidin	kompetitivní	Broly a spol. (1989)
	terbinafin	kompetitivní	Vickers a spol. (1999)
	paroxetin	kompetitivní	Schmider a spol. (1997)
	fluoxetin	kompetitivní	Schmider a spol. (1997)
	sertralin	kompetitivní	Schmider a spol. (1997)
CYP2E1	diethyldithiokarbamát	ireverzibilní	Chang a spol. (1994)
	klomethiazol	nekompetitivní	Hu a spol. (1994)
	disulfiram	ireverzibilní	Guengerich a spol. (1991)
CYP3A4	ketokonazol	kompetitivní	Baldwin a spol. (1995)
	itrakonazol	kompetitivní	Niwa a spol. (2005)
	troleandomycin	ireverzibilní	Newton a spol. (1995)
	ritonavir	ireverzibilní	Eagling a spol. (1997)

	nelfinavir	kompetitivní	Ernest a spol. (2005)
--	------------	--------------	-----------------------

Tabulka 6. Příklady různých typů inhibitorů jednotlivých cytochromů P450

V Tabulce 6 jsou uvedeny příklady inhibitorů jednotlivých CYP. Příklady klinicky významných lékových interakcí založených na inhibici CYP jsou uvedeny v Tabulce 7. Výčet těchto interakcí není úplný, uvedené příklady slouží k ilustraci závažnosti inhibice metabolismu léčiv lidskými jaterními CYP v klinické praxi.

Substrát	Inhibitor	Klinický projev	Enzym	Alternativní lék namísto inhibitoru
alprazolam	fluoxetin, fluvoxamin	ospalost, závrať, ataxie	CYP3A4	lorazepam, oxazepam, temazepam
karbamazepin	klaritromycin, erytromycin	manifestace NÚ	CYP3A4	azitromycin
citalopram	inhibitory monoaminoxidas	serotoninový syndrom	CYP3A4 CYP2C19	-----
cyklosporin	amiodaron	toxicity léčiva	CYP3A4	-----
desipramin	cimetidin	toxicita	CYP2D6	famotidin ranitidin
imipramin	fluvoxamin, fluoxetin, paroxetin,sertralin	zmatení, třes, prohloubení anticholinergních NÚ	CYP1A2 CYP2D6	bupropion, venlafaxin
lovastatin	erythromycin	myopatie	CYP3A4	azithromycin
fenytoin	fluoxetin	závažné NÚ	CYP2C9	sertralin, paroxetin
verapamil	grapefruitová šťáva	manifestace NÚ	CYP3A4	jablečný, pomerančový džus a

Substrát	Inhibitor	Klinický projev	Enzym	Alternativní lék namísto inhibitoru
				podobně
R-warfarin	ciprofloxacin, norfloxacin cimetidin, amiodaron	zvýšení INR, krvácivost	CYP1A2  CYP3A4	levofloxacin, lomefloxacin
S-warfarin	amiodaron perorální antidiabetika, NSAIDs	krvácení	CYP2C9	

Tabulka 7. Příklady popsanych klinicky významnych lékovych interakcí v důsledku inhibice CYP (Michalets, 1998)

#### 3.4.1.2. Indukce CYP

Dalším mechanismem, který je příčinou vzniku nežádoucích lékových interakcí na úrovni CYP, je enzymová indukce. V tomto případě dochází účinkem induktoru zpravidla ke zvýšení syntézy daného enzymu. Zvýšená exprese enzymu vede často k urychlení metabolismu látky, která indukci vyvolala, nebo urychlení biotransformace dalších substrátů indukovaného enzymu. Rychlost nástupu enzymové indukce závisí na farmakokinetice enzymového induktoru a na biologickém poločasu jednotlivých CYP. Například indukce CYP fenobarbitalem nastupuje 14 – 22 dní od zahájení podávání fenobarbitalu, což je dáno tím, že fenobarbital dosahuje dostatečně vysokých plazmatických hladin až po delším časovém intervalu. Naopak rifampicin zvyšuje enzymovou aktivitu již během 4 dnů od prvního podání a indukce CYP2E1 ethanolom byla pozorována v řádu několika hodin. Vliv enzymové indukce přetrvává i po vysazení induktoru a jeho eliminaci z organismu, což je primárně dáno rychlostí odbourání příslušného proteinu (u CYP několik týdnů) (Michalets, 1998). Indukce CYP xenobiotiky je zprostředkována převážně skupinou intracelulárních receptorů

ovlivňujících transkripci příslušných genů. Mezi tyto intracelulární receptory, nebo také jinak ligandy vázající transkripční faktory, patří AhR receptor (aryl hydrocarbon receptor), PXR receptor (pregnane X receptor) a CAR receptor (constitutive androstane receptor). Tyto receptory regulují funkci řady enzymů I. i II. fáze metabolismu xenobiotik a ovlivňují tak metabolismus řady exo- i endogenních látek (Pelkonen a spol., 2008).

AhR receptor je lokalizován v řadě lidských tkání, především v játrech, placentě, plicích, a v srdci (Dolwick a spol., 1993). Hlavními ligandy AhR receptoru jsou polychlorované bifenyly, polyaromatické uhlovodíky a dioxiny (Nguyen a Bradfield, 2008). Bylo zjištěno, že tento typ receptoru může být aktivován také složkami potravy a to konkrétně indol-3-karbinolem, obsaženým například v růžičkové kapustě (Bjeldanes a spol., 1991). Vazbou ligandu na cytosolický AhR receptor, dochází ke změně konformace receptoru a ten může následně proniknout do buněčného jádra. V jádře se AhR receptor spojí s AhR jaderným translokátorem (ARNT) a tento vzniklý dimer se následně váže na DNA v místě tzv. XRE-binding elements. Další kroky pak vedou k nastartování transkripce příslušného úseku DNA (Kawajiri a Fujuu – Kuriyama, 2007). AhR receptor převážně reguluje expresi genů v rodině CYP1. Přesto i geny rodiny CYP2 mohou být regulovány prostřednictvím tohoto receptoru (Rivera a spol., 2002; Arpiainen a spol., 2005). Dalším receptorem zprostředkujícím působení některých induktorů je PXR receptor. Mezi jeho ligandy patří celá řada léčiv užívaných v praxi (Chang a Waxman, 2006). Například rifampicin je induktor působící přes vazbu na tento receptor. U lidí je tento receptor převážně exprimován v játrech a v tenkém střevě (Miki a spol., 2005). Nezodpovězená zůstává otázka, zda – li je PXR receptor lokalizován v buněčném jádře anebo v cytosolu podobně jako AhR receptor. V buněčném jádře se PXR receptor pojí s dalším faktorem a to s RXR receptorem. Tento komplex se již může vázat na určitá cílová místa DNA. Působením dalších kofaktorů dojde nakonec ke spuštění transkripce příslušného genu. Hlavním cílovým genem PXR receptoru je gen pro CYP3A4. Cílové geny pro PXR receptor patří do podrodin CYP2A, CYP2B, CYP2C a CYP3A. Především regulace aktivity CYP3A4 cestou aktivace PXR receptoru byla studována ve značném rozsahu (Plant, 2007). CAR receptor je dalším známým receptorem zprostředkujícím působení induktorů na CYP. Exprese tohoto receptoru je omezena převážně na jaterní tkáň a ledviny (Nishimura a spol., 2004). Tento receptor je na rozdíl od dvou předchozích receptorů neustále aktivní a nemusí

být tedy aktivován pouze navázáním ligandu. Po vstupu do buněčného jádra se CAR receptor spojí s RXR receptorem podobně jako je to v případě PXR receptoru. Vzniklý heterodimer se váže na příslušné úseky DNA. Při spouštění transkripce cestou CAR receptoru byla prokázána účast i dalších kofaktorů (Timsit a Negishi, 2007). Klasickým příkladem cíle působení induktorů přes CAR receptor u lidí je CYP2B6 (Sueyoshi a spol., 1999) a dále enzymy ze skupiny CYP2C a CYP3A. U většiny CYP je tedy jejich nadměrná aktivita způsobena zvýšenou transkripcí příslušného genu vyvolanou induktorem. Výjimku představuje CYP2E1, který je regulovaný na postranlační úrovni látkami jako je etanol, aceton, pyrazol a izoniazid (Song a spol., 1989; Carroccio a spol., 1994). Tyto látky zvyšují stabilitu proteinu CYP2E1. Toto zvýšení stability CYP2E1 může být způsobeno inhibicí proteosomální degradace příslušného proteinu (Cederbaum, 2006). V Tab. 8 jsou uvedeny příklady indukce jednotlivých lidských CYP.

<b>Enzym</b>	<b>induktor</b>	<b>receptor</b>	<b>citace</b>
<b>CYP1A2</b>	polyaromatické uhlovodíky	AhR	Backman a spol., 2006
	rifampicin	PXR	Faber a spol., 2005
<b>CYP2A6</b>	fenobarbital	CAR/PXR	Benowitz a spol., 2006
<b>CYP2B6</b>	ritonavir	PXR	Elsherbiny a spol., 2008
	fenytoin	CAR/PXR	Kharasch a spol., 2008
<b>CYP2C8</b>	rifampicin	PXR	Bidstrup a spol., 2004
<b>CYP2C9</b>	rifampicin	PXR	Depre a spol., 2005
	karbamazepin	CAR	Kay a spol., 1985
<b>CYP2C19</b>	fenobarbital	CAR/PXR	Svensson a spol., 1998
	rifampicin	PXR	Asimus a spol., 2007
<b>CYP2E1</b>	ethanol	Stabilizace	Benowitz a spol., 2003
	izoniazid	stabilizace	Chien a spol., 1997

Enzym	induktor	receptor	citace
CYP3A4	rifampicin	PXR	Anglicheau a spol., 2003
	karbamazepin	CAR	Kuypers a spol., 2004
	fenytoin	CAR/PXR	Mouly a spol., 2002

Tabulka 8. Indukce lidských cytochromů P450 *in vivo*; příklady jednotlivých CYP, příklady jejich induktorů a receptorů zprostředkujících účinek induktoru

Stejně jako v případě lékových interakcí vznikajících v důsledku enzymové inhibice se lze v klinické praxi setkat i s případy, kdy induktor urychlí clearance (eliminaci) jiného léčiva z organismu, které je substrátem indukovaného enzymu. Často pak postižené léčivo při běžném dávkování nedosáhne takové plazmatické koncentrace, aby se projevil jeho požadovaný terapeutický účinek. Příklady některých lékových interakcí způsobených indukcí CYP jsou uvedeny v Tabulce 9.

Substrát	Induktor	Klinický projev, případná opatření	Enzym	Alternativní lék
karbamazepin	rifampicin	subterapeutická hladina, TDM	CYP3A4	-----
cyklosporin	carbamezepin fenytoin	subterapeutická hladina, TDM	CYP3A4	gabapentin, lamotrigin, topiramát, valproat
itrakonazol	rifampicin	subterapeutická hladina, zvýšení dávky	CYP3A4	flukonazol
mexiletin	rifampicin	subterapeutická hladina	CYP2D6	-----
propranolol	rifampicin	poddávkování	CYP2D6	jiné betablokátory

Substrát	Induktor	Klinický projev, případná opatření	Enzym	Alternativní lék
		pacienta, monitoring krevního tlaku		
teofylin	rifampicin, kouření	zvýšit dávkování teofylinu, indukce kouřením - měsíce	CYP1A2	-----
S-warfarin	karbamazepin fenobarbital fenytoin	nedostatečné potlačení srážlivosti krve, monitoring INR	CYP2C9	gabapentin lamotrigin topiramát valproát

Tabulka 9. Příklady klinických lékových interakcí založených na indukci CYP (Michalets, 1998)

#### 3.4.1.3. Vliv genetických faktorů na metabolismus léčiv cytochromy P450

Hlavními příčinami inter- a intraindividuální variability v aktivitě jednotlivých CYP jsou již zmíněná působení různých exogenních inhibitorů a induktorů. Enzymovou aktivitu CYP ovlivňuje v různé míře také celá řada endogenních faktorů. Mezi ně patří například vliv hormonů, pohlaví, věk, nemoci a genový polymorfismus. CYP2D6, CYP2C19 a CYP2C9 představují enzymy, u nichž byl genový polymorfismus důkladně studován a byl prokázán vliv různých genových alel daného enzymu na metabolismus léčiv (Zanger a spol., 2008). CYP2D6 je klasickým příkladem enzymu, jehož aktivita je významně ovlivněna genovým polymorfismem. Léčiva debrisochin, dextrometorfan, spartein sloužily ke zjištění fenotypu CYP2D6 sledováním poměru koncentrací parentní látky a jejího metabolitu vyloučených močí. Pacienti byli děleni do tří skupin: pomalí metabolizátoři, rychlí metabolizátoři a ultrarychlí metabolizátoři. Později bylo zjištěno, že pomalí metabolizátoři mají defektní obě alely genu pro CYP2D6, zatímco ultrarychlí metabolizátoři mají vyšší počet funkčních alel daného genu (Ingelman-Sundberg, 2005). Léčivo, podané pomalému metabolizátoru s defektními alelami genu pro daný enzym, je pomaleji



odbouráváno na neúčinné metabolity, což může vést k projevu nežádoucích, toxických účinků léčiva. Naopak v případě rychlých metabolizátorů, kdy je vlivem genového polymorfismu zvýšená aktivita daného genu, je léčivo velmi rychle inaktivováno na neúčinný metabolit, a v organismu tak dosahuje subterapeutických koncentrací. V případě kodeinu, který je pomocí CYP2D6 přeměňován na aktivní metabolit, se často setkáváme u ultrarychlých metabolizátorů se zvýrazněným farmakologickým účinkem. Dalšími příklady léčiv, jejichž metabolismus může být ovlivněn genovým polymorfismem, jsou nesteroidní antirevmatika (CYP2C9), inhibitory protonové pumpy či klopidogrel (CYP2C19), betablokátory, kodein, některá antidepresiva a antipsychotika (CYP2D6) (Zanger, 2008).

### 3.4.2. Lékové interakce na úrovni konjugačních enzymů

Lékové interakce na úrovni především UGT mohou představovat další potenciální zdroj komplikací při kombinovaném užívání více léčiv. Ve srovnání s CYP nebyly však doposud UGT a SULT z hlediska enzymové inhibice či indukce tak důkladně studovány. Existuje řada *in vitro* případně *in vivo* experimentů sledujících vliv různých látek na glukuronidaci léčiv (Kiang a spol., 2005), avšak klinicky významné lékové interakce v důsledku inhibice příslušných UGT byly popsány zatím jen u několika látek (např. paracetamolu, kodeinu, karbamazepinu či propafenonu) (Kiang a spol., 2005).

Experimenty s lidskými hepatocyty a jinými buněčnými liniemi prokázaly, že některé z UGT podléhají enzymové indukci podobně jako CYP. Mezi inducibilní UGT patří UGT1A1 (Sugatani a spol., 2004), UGT1A3 (Sabolovic a spol., 2000), UGT1A6 (Munzel a spol., 1999) a UGT2B7 (Munzel a spol., 1999). Mezi induktory zvyšující expresi UGT enzymů patří rifampicin, fenobarbital, fenytoin a karbamazepin (Soars a spol., 2004). Tyto induktory také ovlivňují expresi dalších enzymů podílejících se na metabolismu léků, především CYP. Bylo zjištěno, že jmenované látky působí indukci různých enzymů (včetně UGT1A1) prostřednictvím interakcí se jednou rodinou transkripčních faktorů (CAR, PXR) (Sugatani a spol., 2004).

Některé UGT vykazují podobně jako CYP genetický polymorfismus. Avšak i zde doposud chybí dostatek kvalitních studií, které by se zabývaly vlivem

genetického polymorfismu UGT na metabolismus léčiv. Mezi geneticky polymorfni UGT patří UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT2A1, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 (Guillemette, 2003). Příkladem klinického významu genetického polymorfismu UGT je alela UGT1A1 \* 28, která je spojována se sníženou eliminací aktivního metabolitu irinotekanu a tím se zvýšeným výskytem jeho toxicity (Ando a spol., 2000, Iyer a spol., 2002). Dalším příkladem je genetický polymorfismus UGT1A3. Výskyt alely UGT1A3 \* 2 je spojen se zvýšenou laktonizací atorvastatinu. Lakton zmíněného léčiva je dále modifikován pomocí CYP3A4 a vzniklý metabolit je pro člověka značně toxický (myopatie, hepatotoxicita) (Riedmaier a spol., 2010).

V případě SULT také nebylo provedeno doposud velké množství experimentů sledujících vliv cizorodých látek na enzymovou aktivitu (inhibice, indukce) ve srovnání s enzymy I. fáze metabolismu léčiv. Yasuda a spol. (2007) sledovali vliv vybraných toxických látek cigaretového kouře na aktivitu lidských cytosolických SULT: SULT1A1, SULT1A2 a SULT1A3 se podílely na metabolismu těchto látek. King a spol. (2006) sledovali vliv různých nesteroidních antirevmatik na aktivitu nejvýznamnějších lidských SULT. Nimesulid a acetylsalicylová kyselina významně inhibovaly aktivitu SULT1A1 v klinicky relevantních koncentracích. Léčiva sulindac a ibuprofen inhibovala aktivitu SULT1E1. Orální kontraceptiva jsou také substráty SULT a mohou narušovat vnitřní rovnováhu metabolismu endogenních estrogenů (Yasuda a spol., 2005). Aktivita sulfotransferas stejně jako dalších enzymů metabolismu xenobiotik může být znásobena zvýšenou expresí příslušného enzymu. Exprese je i v případě sulfotransferas ovlivněna interakcemi induktorů se skupinou transkripčních faktorů jako jsou Ah receptor, glukokortikoidní receptor (Runge-Morris, 2005; Bian, 2007). Mezi inhibitory SULT se řadí i přírodní látky flavonoidy, nejmocnějším inhibitorem se zdá být kvercetin (Ghazali a Waring, 1999). Podobně jako UGT nebo CYP i SULT vykazují genový polymorfismus. Nagar a spol. (2006) zjistili, že genové varianty SULT1A1 \* 1, SULT1A1 \* 2, a také SULT1A1 \* 3 mohou ovlivnit enzymovou aktivitu SULT1A1.

V případě enzymů II. fáze metabolismu léčiv byly tedy popsány látky, které vykazují inhibiční účinek na aktivitu některých UGT či SULT. Taktéž byla prokázána účast určitých transkripčních faktorů na regulaci enzymové aktivity UGT a SULT. U některých UGT a SULT byl nalezen genový polymorfismus, který by mohl mít význam v klinické praxi.

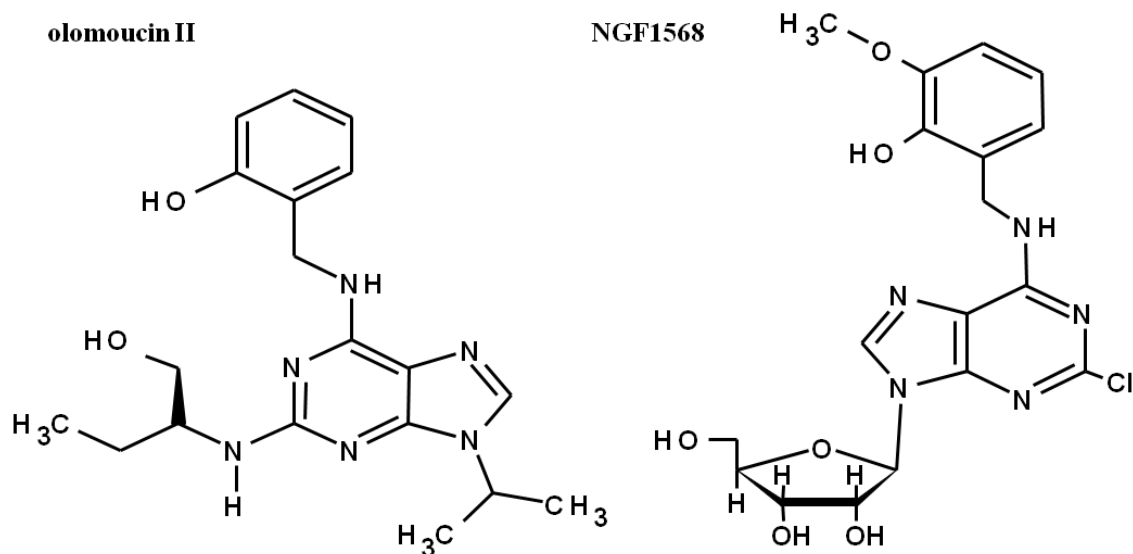
## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

### 4.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

#### 4.1.1. Chemikálie

Cytokininové deriváty, olomoucín II a NGF1568 (Obr. 10), byly syntetizovány a dodány Laboratoří růstových regulátorů (Přírodovědecká fakulta UP), olomoucín II byl navíc ještě zakoupen u firmy Sigma Aldrich (Praha, ČR). Standardy potenciálních metabolitů olomoucínu II; 2, 4 - dihydroxyroskovitinu a 2, 5 - dihydroxyroskovitinu pocházely také z Laboratoře růstových regulátorů.



Obrázek 10. Strukturní vzorce testovaných cytokininových derivátů, olomoucínu II a NGF1568

Chlorzoxazon, 6-hydroxychlorzoxazon, diklofenak, 4'-hydroxydiklofenak, bufuralol, 1'-hydroxybufuralol a 6 $\beta$ -hydroxytestosteron byly zakoupeny u firmy SAFC Corp. (Salford, Velká Británie).

P450-Glo luminiscenční substrát pro stanovení aktivity CYP2C8 byl pořízen od firmy Promega (Madison, Wiskonsin, USA) přes distribuční firmu East Port (Praha, Česká republika).

7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin byl získány od firmy Fluka, Buchs (Švýcarsko). Testosteron, 7-ethoxyresorufin, kumarin, *S*-mefenytin, 4'-hydroxymefenytin, furafylin, sulfafenazol, ketokonazol, diethyldithiokarbamát, guanidin, 8-methoxypsoralen, 7-pentoxyresorufin, kvercetin, síran hořečnatý, chlorid hořečnatý, DL-isocitrát, isocitrátdehydrogenasa, NADP (nikotinamidadenindinukleotidfosfát), Trizma Base pufr, trisodná sůl kyseliny uridin 5'-difosfoglukuronové; 1,4-lakton D-sacharové kyseliny a mravenčan amonný byly dodány firmou Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

*S*-benzylnirvanol byl zakoupen u firmy BD Gentest (Woburn, MA, USA).

Firmou Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) byly dodány dimethylsulfoxid, kyselina mravenčí, kyselina chloristá, kyselina fosforečná, dichlormethan, dihydrogenfosforečnan draselný a chlorid sodný.

Acetonitril a methanol pro kapalinovou chromatografii a hmotnostně spektrometrickou analýzu byly zakoupeny u firmy (Merck, Česká republika). Dusík a oxid uhelnatý byly dodány firmou Linde Technoplyn (Česká republika).

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší, tak aby mohly být použity pro enzymová stanovení a následnou LC/MS (liquid chromatography/ mass spectrometry).

#### 4.1.2. Přístrojové vybavení

analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

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

analytické váhy Sartorius 4503 MP 6E (Göttingen, Německo)

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie)

centrifuga Eppendorf mini spin, Eppendorf (Hamburg, Německo)

centrifuga chlazená Z 323 K, Biotech (Praha, Česká republika)

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

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

minitřepačka IKA MS 3 basic, MERCI ( Brno, Česká republika)  
pH metr Schott CG 843, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)  
sonikátor, Dynatech (Farmingdale, NY, USA)  
UV-VIS spektrofotometr/spektrofluorometr/luminometr TECAN Infinite M200,  
Schoeller Instruments (Praha, Česká republika)  
suchá lázeň MD-MP01-D, Biotech (Praha, Česká republika)  
ultrazvuk K 10, Kraitex (Podhájska, Slovensko)  
vodní lázeň WB 14, Memmert (Schwabach, Německo)  
vortex Heidolph Reax Top, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)  
patrony pro přípravu ultračisté vody Watrex Ultrapur, Watrex (Praha, Česká  
republika)

#### HPLC systémy:

A) Pro stanovení aktivity vybraných CYP byla využita HPLC sestava firmy Shimadzu (Kyoto, Japan) složená z následujících částí: pumpa LC-10AT, řídicí jednotka SCL-10AVP, UV-VIS detektor SPD-10AVP, kolonový termostat CTO-10AC, autosampler SIL-10ADVP, degasér mobilních fází DGU-20A5 a software CLASS-VP.

B) Pro detekci potenciálních metabolitů testovaných látek byla využita modulová sestava LC-20A Prominence firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) tvořená řídicí jednotkou CBM-20A, pumpou s degasérem LC-20AT, autosamplérem SIL-20AC, termostatem kolony CTO-20AC, UV/VIS detektorem SPD-20A a fluorescenčním detektorem RF-20.

#### Hmotnostní spektrometr:

Pro detekci a identifikaci potenciálních metabolitů testovaných látek byl použit hmotnostní spektrofotometr s iontovou pastí LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vybavený sondou pro ionizaci vzorku elektrosprejem (ESI) a sondou pro chemickou ionizaci vzorku za atmosférického tlaku (APCI). Teoretická fragmentační spektra analyzovaných látek byla tvořena pomocí softwaru Mass Frontier 5.0, HighChem (Bratislava, Slovenská republika).

#### 4.1.3. Původ enzymů

##### A) Lidská jaterní mikrosomální frakce

Směsné lidské jaterní mikrosomální frakce nebo-li jaterní mikrosomy, obsahující především CYP ale také UGT byly dodány firmami Advancell (Barcelona, Španělsko) a Biopredic (Rennes, Francie). Tyto enzymové preparáty byly připraveny v souladu s etickými pravidly země původu. Jejich specifikace (množství celkového proteinu a koncentrace funkčních CYP (P450)) je následující:

##### **směsné lidské mikrosomy firmy Advancell:**

$$c_{\text{proteinu}} = 38,4 \text{ mg/ml}; c_{\text{P450}} = 8 \text{ } \mu\text{mol/l}$$

##### **směsné lidské mikrosomy firmy Biopredic:**

$$c_{\text{proteinu}} = 25 \text{ mg/ml}; c_{\text{P450}} = 15,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$$

##### B) Lidská jaterní cytosolární frakce

Cytosolární frakce lidských jater obsahující především SULT byla zakoupena u firmy Biopredic (Rennes, Francie). I v tomto případě byl preparát připraven se souhlasem etické komise dané země. Koncentrace proteinu byla 21 mg/ml.

##### C) Rekombinantní enzymy

Baktosomy (bakteriální membránové preparáty z *Escherichia coli*) obsahující rekombinantní lidské cytochromy P450 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a 3A4) a lidskou NADPH-cytochrom P450 reduktasu, byly dodány firmou Cypex, (Dundee, Velká Británie).

Supersomy (hmyzí buňky infikované bakulovirem, exprimující lidské UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 a 2B17) od firmy BD Biosciences byly zakoupeny prostřednictvím firmy Intertact (Praha, Česká republika).

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Stanovení aktivity lidských jaterních mikrosomálních CYP

Pro stanovení enzymové aktivity jednotlivých CYP obsažených v mikrosomální frakci lidských jater byly použity v praxi běžně používané metody. Tyto metody využívají markerových substrátů, na jejichž biotransformaci se podílí některý z CYP. Vzorky obsahující vzestupnou koncentraci prototypického substrátu daného CYP byly inkubovány s lidskými jaterními mikrosomy a NADPH-generujícím systémem. Po zastavení reakce, deproteinaci reakční směsi a případné extrakci organickým rozpouštědlem byla stanovena koncentrace vzniklého metabolitu markerového substrátu pomocí HPLC s UV/VIS či fluorescenční detekcí nebo měřením luminiscence či fluorescence vzniklého produktu. Z výsledků měření byly určeny parametry popisující reakční kinetiku enzymových reakcí katalyzovaných CYP v použité lidské jaterní mikrosomální frakci (Michaelisova konstanta,  $K_m$ ; maximální rychlost reakce,  $V_{max}$ ). Získané parametry pak sloužily k určení vhodné koncentrace substrátů pro následné inhibiční experimenty. V předložené dizertační práci bylo sledováno ovlivnění enzymové aktivity celkem devíti CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4). Tab. 10 shrnuje markerové substráty jednotlivých CYP, prototypické reakce markerových substrátů katalyzované CYP a experimentálně stanovenou  $K_m$  pro daný enzym a jeho markerový substrát.

<b>CYP</b>	<b>Prototypický substrát</b>	<b>Reakce katalyzovaná CYP</b>	<b>Michaelisova konstanta (<math>K_m</math>)</b>
<b>1A2</b>	7-ethoxyresorufin	<i>O</i> -deethylace	2,4 $\mu\text{mol/l}$
<b>2A6</b>	kumarin	7-hydroxylace	8,2 $\mu\text{mol/l}$
<b>2B6</b>	7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (EFC)	<i>O</i> -deethylace	14,1 $\mu\text{mol/l}$
<b>2C8</b>	luciferin-ME (luciferin 6'-methylether)	6'-demethylace	nestanoveno
<b>2C9</b>	diklofenak	4'-hydroxylace	15,9 $\mu\text{mol/l}$
<b>2C19</b>	<i>S</i> -mefenytoin	4'-hydroxylace	81 $\mu\text{mol/l}$
<b>2D6</b>	bufuralol	1'-hydroxylace	25,3 $\mu\text{mol/l}$
<b>2E1</b>	<i>p</i> -nitrofenol	<i>p</i> -hydroxylace	21,8 $\mu\text{mol/l}$
<b>3A4</b>	testosteron	6 $\beta$ -hydroxylace	77,5 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 10. Jednotlivé CYP, jejich markerové substráty, reakce markerových substrátů katalyzované CYP a experimentálně stanovené hodnoty Michaelisovy konstanty ( $K_m$ )

#### 4.2.2. Sledování inhibičního vlivu olomoucínu II a NGF1568 na enzymovou aktivitu CYP *in vitro*

Inhibiční vliv olomoucínu II a NGF1568 na prototypickou enzymovou aktivitu jednotlivých CYP byl sledován na šesti koncentračních úrovních testovaných látek (10, 50, 100, 150, 200 a 400  $\mu\text{M}$ ). Široký rozsah koncentrací potenciálních inhibitorů byl volen tak, aby byl co nejdůkladněji charakterizován průběh případného inhibičního účinku testované látky, případně aby mohla být stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$  udávající koncentraci inhibitoru, při níž je za daných experimentálních podmínek inhibována aktivita daného CYP z 50%. Vzorky, které neobsahovaly přídavek testované látky k reakční směsi, byly použity ke stanovení kontrolní 100 % aktivity jednotlivých CYP. Dále byly připraveny tzv. srovnávací, slangově blankové vzorky, ve kterých byly obsaženy všechny složky reakční směsi, ale lidská jaterní mikrosomální frakce byla přidána až po zastavení reakce příslušným činidlem. Tyto vzorky sloužily ke zjištění, zda některá ze složek reakční směsi, především testovaná látka, neinterferuje se stanovením koncentrace příslušného markerového metabolitu (stejně retenční časy testované látky a cílového analytu). Jak olomoucín II tak i NGF1568 jsou látky ve vyšších koncentracích ve vodě nerozpustné, proto byly připraveny jejich zásobní roztoky o koncentraci 25 mM ve 100 % dimethylsulfoxidu. Z nich byly následně postupným ředěním vodou připraveny roztoky o vhodné koncentraci, které byly pipetovány do reakčních směsí. Organická rozpouštědla mohou i v relativně nízkých koncentracích inhibovat enzymovou aktivitu některých CYP a jejich koncentrace v reakční směsi by tak neměla překročit 1 % (v/v) (Chauret a spol., 1998; Busby a spol., 1999). Na základě tohoto faktu byly v rámci stanovení aktivit všech CYP připraveny kontrolní vzorky obsahující organické rozpouštědlo (dimethylsulfoxid) v koncentracích 0,8 % (v/v) a 1,2% (v/v) (dle výsledné koncentrace organického rozpouštědla v jednotlivých reakčních směsích). Vzorky byly zpracovány za identických podmínek jako vzorky obsahující testované cytokininové deriváty. Případný nežádoucí inhibiční efekt dimethylsulfoxidu na aktivitu CYP byl v konečných výpočtech odečten tak, aby nezatížil chybou výsledky



inhibičního vlivu testovaných látek na aktivity CYP. Koncentrace markerových substrátů pro stanovení enzymových aktivit jednotlivých CYP byly zvoleny na základě experimentálně zjištěných hodnot  $K_m$ , které jsou uvedeny v Tabulce 10. Inhibiční efekt olomoucínu II a NGF1568 na aktivitu enzymů byl pak vyhodnocen graficky, kdy v grafu byly vyneseny hodnoty aktivity CYP (osa y) vyjádřené v nmolech produktu/ min/ nmol P450 při různé koncentraci testovaných látek v  $\mu\text{mol/l}$  (osa x). Dále byla také aktivita jednotlivých CYP vyjádřena v % a byla vztažena k aktivitě CYP v kontrolních vzorcích bez přídavku testovaných cytokininových derivátů (100%). Vzorky na všech koncentračních úrovních olomoucínu II a NGF1568 byly připraveny v duplikátech a výsledky pro dvojici duplikátů se nesměly lišit o více než 15 %. V případě výrazné inhibice aktivity některého CYP testovanou látkou byla stanovena hodnota inhibiční konstanty,  $K_i$ , pomocí konstrukce Dixonova výnosu. Pro tvorbu Dixonových výnosů byl použit grafický software Sigma Plot 8.0.2 (SPSS, Chicago, USA). Data pro sestavení Dixonova výnosu byla získána ze stanovení inhibičního účinku potenciálního inhibitoru (opět na šesti koncentračních úrovních) na markerovou aktivitu daného CYP při třech koncentracích markerového substrátu odpovídajících  $\frac{1}{2} K_m$ ,  $K_m$  a  $2 K_m$ . V následujícím textu jsou uvedeny experimentální podmínky pro stanovení markerových aktivit jednotlivých CYP.

## CYP1A2

**Objem reakční směsi:** 100  $\mu\text{l}$

**Pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 35 pmol cytochromu P450

**Prototypický substrát:** 2,5 $\mu\text{M}$  7-ethoxyresorufin

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu\text{M}$  olomoucín II nebo NGF1568

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**NADPH - generující systém:** 0,8mM  $\text{NADP}^+$ ; 5,8mM isocitrát; 8mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;

isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Inkubace:** 15 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 200  $\mu\text{l}$  metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min 5 min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)]

pipetování do mikrotitrační destičky a následná fluorescenční detekce produktu

(excitace při  $\lambda = 535$  nm a emise při  $\lambda = 585$  nm) na

přístroji Tecan Infinite M200

**Metoda dle:** Chang a Waxman (1998)

#### CYP2A6

**Objem reakční směsi:** 100  $\mu$ l

**Pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 35 pmol cytochromu P450

**Prototypický substrát:** 10 $\mu$ M kumarin

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu$ M olomoucín II nebo NGF1568

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**NADPH - generující systém:** 0,8mM  $\text{NADP}^+$ ; 5,8mM isocitrát; 8mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Inkubace:** 15 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 200  $\mu$ l metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min 5 min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire,  
Francie; rotor AB.214)]

pipetování do mikrotitrační destičky a následná fluorescenční detekce produktu  
(excitace při  $\lambda = 360$  nm a emise při  $\lambda = 465$  nm) na přístroji Tecan Infinite M200

**Metoda dle:** Waxman a Chang (1998)

#### CYP2B6

**Objem reakční směsi:** 100  $\mu$ l

**Pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 34 pmol cytochromu P450

**Prototypický substrát:** 15 $\mu$ M 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (EFC)

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400  $\mu$ M olomoucín II nebo NGF1568

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**NADPH - generující systém:** 0,8mM  $\text{NADP}^+$ ; 5,8mM isocitrát; 8mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Inkubace:** 15 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 200  $\mu$ l metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min 5min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)]

pipetování do mikrotitrační destičky a následná fluorescenční detekce produktu (excitace při  $\lambda = 410$  nm a emise při  $\lambda = 510$  nm) na přístroji Tecan Infinite M200

**Metoda dle:** Donato a spol., 2004

## CYP2C8

**Objem reakční směsi:** 50  $\mu$ l

**Pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 60 pmol cytochromu P450

**Prototypický substrát:** 150 $\mu$ M luciferin ME

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu$ M olomoucín II nebo NGF1568

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**NADPH - generující systém:** 0,8mM  $\text{NADP}^+$ ; 5,8mM isocitrát; 8mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Inkubace:** 30 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 50  $\mu$ l detekčního činidla

Luminiscenční detekce produktu na přístroji Tecan Infinite M200

**Metoda:** komerční souprava firmy Promega

<http://www.promega.com/applications/cellularanalysis/admetox.htm>

## CYP2C9

**Objem reakční směsi:** 200  $\mu$ l

**Pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 35 pmol cytochromu P450

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu$ M olomoucín II nebo NGF1568

**NADPH - generující systém:** 0,8mM  $\text{NADP}^+$ ; 5,8mM isocitrát; 8mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**Prototypický substrát:** 16 $\mu$ M diklofenak

**Inkubace:** 30 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 50 µl směsi acetonitril /kyselina octová (94:6 (v/v)), vzorky na ledu

Centrifugace 4 min při 4000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)]

150 µl supernatantu přepipetováno do vialek, HPLC analýza s UV detekcí při  $\lambda = 280$  nm

**Metoda dle:** Crespi a spol. (1998a)

## CYP2C19

**Objem reakční směsi:** 200 µl

**Pufr:** 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 50 pmol cytochromu P450

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM olomoucín II nebo NGF1568

**NADPH - generující systém:** 0,8mM NADP<sup>+</sup>; 5,8mM isocitrát; 8mM Mg<sup>2+</sup>; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**Prototypický substrát:** 80µM *S*-mefenytoin

**Inkubace:** 30 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 20 µl 1 M HCl

Přídavek 2 ml dichlormethanu, následná vířivá extrakce po dobu 15s, centrifugace 5 min při 3000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)] 1,5 ml spodní fáze odpařeno v atmosféře dusíku, odparek rozpuštěn ve 150 µl mobilní fáze (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,0 : acetonitril, 71:29) a podroben HPLC analýze s UV detekcí při  $\lambda = 200$  nm

**Metoda dle:** [http:// www.cypex.co.uk/intro.htm](http://www.cypex.co.uk/intro.htm)

## CYP2D6

**Objem reakční směsi:** 200 µl

**Pufr:** 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 67, 3 pmol cytochromu P450

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM olomoucín II nebo NGF1568

**Prototypický substrát:** 25 µM bufuralol

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**NADPH - generující systém:** 0,8mM NADP<sup>+</sup>; 5,8mM isocitrát; 8mM Mg<sup>2+</sup>;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Inkubace:** 20 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 20 µl 70% kyseliny chloristé (HClO<sub>4</sub>)

Centrifugace 5 min při 3000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie;  
rotor AB.214)]

150 µl supernatantu přepipetováno do vialek a podrobena HPLC analýze. Produkt byl  
detekován fluorimetricky ( excitace při λ = 252 nm a emise při λ = 302 nm).

**Metoda dle:** Crespi a spol. (1998b)

### CYP2E1

**Objem reakční směsi:** 400 µl

**Pufr:** 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 160 pmol cytochromu P450

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM olomoucín II nebo NGF1568

**NADPH - generující systém:** NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7mM; Mg<sup>2+</sup> 8mM;  
isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**Prototypický substrát:** 25µM *p*-nitrofenol

**Inkubace:** 30 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 100 µl 20% kyseliny chloristé

Centrifugace 15 min při 2600 ot/min, pipetování supernatantu do malých zkumavek  
typu eppendorf a centrifugace 10 min při 7000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint  
Nazaire, Francie; rotor AB.214)]

supernatant použit k HPLC analýze, detekce produktu při 295 nm

**Metoda dle:** Tassaneeyakul a spol. (1993)

### CYP3A4

**Objem reakční směsi:** 200 µl

**Pufr:** 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (fosfátový pufr)

**Lidská jaterní mikrosomální frakce:** 100 pmol cytochromu P450

**Inhibitor:** 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400µM olomoucín II nebo NGF1568

**NADPH - generující systém:** NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7mM; Mg<sup>2+</sup> 5mM;  
isocitrátdehydrogenasa 0,5 U/ml

**Preinkubace:** 30 min při 37 °C

**Prototypický substrát:** 100μM testosteron

**Inkubace:** 30 min při 37 °C

**Zastavení reakce:** 100 μl směsi 1 M uhličitanu sodného (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 2 M chloridu sodného (NaCl)

Přídavek 2 ml dichlormethanu, vířivá extrakce 15 s, centrifugace 5 min při 3000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)]

1 ml spodní fáze odpařen v atmosféře dusíku, odparek rekonstituován ve 200 μl mobilní fáze (64% metanol) a podroben HPLC analýze. UV detekce produktu při λ = 254 nm.

**Metoda dle:** Guengerich a spol. (1986)

#### 4.2.3. Sledování vzniku potenciálních metabolitů testovaných látek a potvrzení účasti CYP na tvorbě metabolitů

Pro zjištění, zda-li inkubace testovaných látek s lidskou jaterní mikrosomální frakcí v přítomnosti NADPH-generujícího systému vede k produkci metabolitů I. fáze, byly provedeny patřičné experimenty. Ve 1,5 ml zkumavkách typu Eppendorf bylo v prostředí 100mM fosfátového pufru (pH 7,4) preinkubováno 250 pmol mikrosomálního CYP společně s NADPH-generujícím systémem (NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7mM; Mg<sup>2+</sup> 5mM; isocitrátdehydrogenasa 0,5 U/ml) po dobu 10 min při 37 °C. Následně byl přidán roztok olomoucínu II nebo NGF1568 tak, aby koncentrace olomoucínu II a NGF1568 v reakční směsi byla 100μM. Finální objem reakční směsi byl 1 ml. Pro každou testovanou látku byly připraveny triplikáty vzorků. Reakční směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přídavkem 20 μl 70% kyseliny chloristé. Vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány 6 min při 5000 ot/min [centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)]. 200 μl supernatantu bylo pipetováno do vialek a podrobeno HPLC analýze. V triplikátech byly připraveny i kontrolní vzorky sloužící k vyloučení interferujících píků v záznamu chromatogramu, které by mohly být nesprávně

považovány za píky náležící nově vzniklým metabolitům. Kontrolní vzorky obsahovaly všechny složky reakční směsi včetně testované látky, ale nebyly inkubovány.

Podmínky HPLC analýzy pro sledování vzniku potenciálních metabolitů I. fáze olomoucínu II byly následující:

HPLC analýza byla provedena pomocí HPLC systému A (viz kapitola Přístrojové vybavení). Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART 250-4 s reverzní fází LiChrospher 100 RP-18 od firmy Merck (Praha, Česká republika). Olomoucín II a případné metabolity I. fáze byly eluovány mobilní fází acetonitril / 7,35mM fosfátový pufr (pH 2,2) (v poměru 29:71 (v/v)). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Detekce parentní látky a metabolitů probíhala spektrofotometricky při vlnové délce  $\lambda=289$  nm.

V případě detekce metabolitů I. fáze látky NGF1568 byla využita následující metoda:

HPLC analýza byla provedena na HPLC systému B (viz Přístrojové vybavení). Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Gemini C18 110A s velikostí částic 5  $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, USA). NGF1568 a metabolity byly eluovány izokraticky mobilní fází o složení: 100mM mravenčan amonný (pH 2,1; upraveno kyselinou mravenčí) a methanol v poměru 70:30 (v/v). Detekce NGF1568 a jeho metabolitů probíhala při vlnové délce  $\lambda=250$  nm.

Na základě vyhodnocení chromatogramů z HPLC analýz jednotlivých vzorků byla detekována či vyloučena přítomnost metabolitů testovaných látek v inkubovaných vzorcích vzniklých působením enzymů I. fáze metabolismu.

Pro potvrzení účasti CYP na tvorbě předpokládaných metabolitů testované látky byl proveden inhibiční experiment s oxidem uhelnatým. Oxid uhelnatý je univerzální inhibitor všech CYP. Je-li testovaná látka metabolizována některými z CYP, pak po nescifické inhibici všech CYP oxidem uhelnatým bude tvorba metabolitu výrazně omezena. Ve zkumavkách typu Eppendorf bylo v prostředí 100mM fosfátového pufru (pH 7,4) preinkubováno 250 pmol mikrosomálního CYP společně s NADPH-generujícím systémem (NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7mM;

Mg<sup>2+</sup> 5mM; isocitrátdehydrogenasa 0,5 U/ml) po dobu 10 min při 37 °C. Po preinkubaci byl vzorek jemně prosycen proudem oxidu uhelnatého po dobu 1 min. Následně byl přidán roztok olomoucínu II nebo NGF1568 o takové koncentraci, aby koncentrace olomoucínu II a NGF1568 v reakční směsi byla 100µM. Finální objem reakční směsi byl 1 ml. Pro každou testovanou látku byly připraveny triplikáty vzorků. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C bez přístupu vzduchu. Dále byly vzorky zpracovány a následně analyzovány jako vzorky obsahující potenciální metabolity testovaných látek.

#### 4.2.4. Sledování účinku specifických inhibitorů CYP na vznik metabolitů testovaných látek

Cílem další série experimentů bylo odhalit, které jednotlivé CYP se podílely na tvorbě potenciálních metabolitů testovaných látek. Složení reakčních směsí bylo shodné se složením reakčních směsí, které byly použity ke sledování vzniku potenciálních metabolitů testovaných látek (viz kapitola 4.2.3). V těchto experimentech byly však reakční směsi preinkubovány 30 min při 37 °C se specifickými inhibitory jednotlivých CYP a až následně po tomto kroku byl ke vzorkům přidán olomoucín II nebo NGF1568. Po inkubaci byly vzorky zpracovány a analyzovány stejným postupem, který je uveden v kapitole 4.2.3. Podílí-li se daný CYP na metabolismu některé z testovaných látek, pak po specifické inhibici tohoto enzymu, musí nutně dojít ke snížení tvorby příslušného metabolitu. V Tab. 11 jsou uvedeny testované CYP, použité specifické inhibitory jednotlivých CYP a jejich výsledná koncentrace v reakčních směsích (Goldstein a spol., 1994; Baldwin a spol., 1995; Newton a spol., 1995; Dierks a spol., 2001 a Suzuki a spol., 2002).



<b>CYP</b>	<b>Specifický inhibitor</b>	<b>Koncentrace v reakční směsi (μM)</b>
<b>1A2</b>	furafylin	22,5
<b>2A6</b>	8-methoxypsoralen	1
<b>2B6</b>	7-pentoxyresorufin	2
<b>2C8</b>	kvercetin	70
<b>2C9</b>	sulfafenazol	3
<b>2C19</b>	S-benzylnirvanol	1
<b>2D6</b>	chinidin	0,3
<b>2E1</b>	dietyldithiokarbamát	75
<b>3A4</b>	ketokonazol	2

Tabulka 11. Specifické inhibitory jednotlivých CYP a jejich koncentrace v reakční směsi

#### 4.2.5. Identifikace forem CYP podílejících se na metabolismu testovaných látek

Použitím specifických inhibitorů a sledováním úbytku vzniklého metabolitu v inkubované reakční směsi lze nepřímo určit, která konkrétní forma CYP se podílí na produkci tohoto metabolitu. Pro potvrzení participace jednotlivých CYP na metabolismu testované látky byly dále provedeny experimenty s baktosomy. Baktosomy jsou bakteriální membránové preparáty z *Escherichia coli* obsahující rekombinantní lidské CYP (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a 3A4) koexprimované s lidskou NADPH-cytochrom P450 reduktasou. Inkubace byly provedeny v 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,4), v reakční směsi o objemu 200 μl bylo obsaženo 5 pmol příslušného CYP (společně s reduktasou), dále 5mM chlorid hořečnatý, NADPH-generující systém (NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7mM; Mg<sup>2+</sup> 5mM; isocitrátdehydrogenasa 0,5 U/ml) a 50μM testovaná látka. Inkubace probíhala 30 min při 37 °C a byla ukončena přidávkem 20 μl 70% kyseliny chloristé. Vzorky byly dále

centrifugovány 5 min při 6000 ot/min [centrifuga BR4i, Juan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214] a 200 µl supernatantu bylo analyzováno pomocí HPLC za podmínek uvedených v kapitole 4.2.3.

#### 4.2.6. Příspěvek UGT k metabolismu testovaných látek *in vitro*

##### A) Sledování glukuronidace olomoucínu II a NGF1568 lidskými jaterními mikrosomy

Olomoucín II a NGF1568 mají ve své struktuře polární funkční skupiny, zejména hydroxylové skupiny (-OH), které by mohly být cílem působení enzymů II. fáze biotransformace. Metoda pro sledování potenciální glukuronidace testovaných látek lidskými jaterními mikrosomy byla upravena dle Hanioky a spol. (2008). Reakční směs (v triplicátech) byla složena ze 100mM fosfátového pufru (pH 7,4), 5mM chloridu hořečnatého, 10mM 1,4-laktonu D-sacharové kyseliny (Gaiser a spol., 2003), 350µM mikrosomálního proteinu a 50 µM olomoucínu II nebo NGF1568. Lidské jaterní mikrosomy byly před použitím aktivovány (deliberace UGT enzymů z lumenální strany membrán endoplazmatického retikula) sonikací na ledu pomocí sonikátoru firmy Dynatech (Farmingdale, NY, USA) po dobu 5 krát 5 s. Reakční směs byla preinkubována 5 min při 37° C a následně byl přidán 100mM zásobní roztok UDP-glukuronové kyseliny tak, aby finální koncentrace UDP-glukuronové kyseliny v reakční směsi byla 3mM. Celkový objem reakční směsi byl 250 µl. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C ve vodní lázni. Reakce byla zastavena přidáním 20 µl 70% kyseliny chloristé a následně centrifugovány po dobu 6 min při 5000 ot/min [centrifuga BR4i, Juan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214] a teplotě 4 °C. 150 µl supernatantu bylo použito k HPLC analýze. Pro analýzu očekávaných glukuronidů olomoucínu II i NGF1568 byl použit HPLC systém B (viz Přístrojové vybavení). Jako stacionární fáze byla použita kolona Gemini s reverzní fází C18 5u 110A (Phenomenex, Torrance, USA). Potenciální glukuronidy olomoucínu II byly eluovány izokraticky mobilní fází skládající se z 100mM mravenčanu amonného (pH 2,1; upraveno kyselinou mravenčí) a 100% acetonitrilu v poměru 76:24 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 400 µl/min. Pro analýzu potenciálních glukuronidů NGF1568 byla použita mobilní fáze složená ze 100mM mravenčanu amonného (pH 2,1, upraveno

kyselinou mravenčí) a 100% methanolu v poměru 70:30 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 400  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Detekce všech potenciálních metabolitů testovaných látek probíhala při vlnové délce  $\lambda=250\text{ nm}$ .

#### B) Identifikace jednotlivých forem UGT podílejících se na metabolismu testovaných látek

Pro zjištění, které individuální UGT katalyzují glukuronidaci olomoucinu II a NGF1568, byly provedeny experimenty se supersomy. Supersomy jsou hmyzí buňky infikované bakulovirem, exprimující rekombinantní lidské enzymy. Celkem byl testován podíl 12 UGT (jaterních i extrahepatálních) na metabolismus testovaných cytokininových derivátů. Reakční směsi byly složeny ze 100mM fosfátového pufru (pH 7,4), 5mM chloridu hořečnatého, 10mM 1,4-laktonu kyseliny sacharové a 50 $\mu\text{M}$  testované látky. Koncentrace rekombinantních UGT v jednotlivých reakčních směsích byly zvoleny dle doporučení v příbalových letáčích od dodavatele (BD Biosciences, Belgie) a byly následující (vyjádřeno jako mg rekombinantního UGT proteinu na ml reakční směsi): 1 mg/ml pro UGT2B7; 0,5 mg/ml pro UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A10, 2B17; 0,25 mg/ml pro UGT1A4, 1A8, 2B4, 2B15 a 0,1 mg/ml pro UGT1A7 a UGT1A9. Reakční směsi byly preinkubovány 5 min při 37 °C. Glukuronidace byla startována přidavkem 100mM UDP-glukuronové kyseliny tak, aby její koncentrace v reakčních směsích byla 3mM. Celkový objem vzorku byl 150  $\mu\text{l}$ . Reakční směsi byly poté inkubovány 60 min při 37 °C. Přidavkem 20  $\mu\text{l}$  70% kyseliny chloristé byl proces glukuronidace ukončen. Následně byly vzorky centrifugovány pod dobu 6 min při 5000 ot/min [centrifuga BR4i, Juan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)] a teplotě 4 °C. 100  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo podrobena HPLC. Podmínky analýzy pro sledování glukuronidů olomoucinu II a NGF1568 jsou popsány v kapitole 4.2.6 a).

#### 4.2.7. Příspěvek SULT lidské jaterní cytosolární frakce k metabolismu testovaných látek in vitro

SULT jsou další skupinou enzymů II. fáze metabolismu léčiv, které by se mohly podílet na biotransformaci testovaných cytokininových derivátů. Možnost takových interakcí vyplývá ze skutečnosti, že se ve struktuře obou testovaných

látek vyskytují vhodné funkční skupiny, přes které by se mohl na dané látky vázat sulfát. Inkubace olomoucínu II či NGF1568 probíhala ve 100mM fosfátovém pufru (pH 7,4) v přítomnosti 75 µg cytosolárního proteinu a 60µM 3'-fosfoadenosinu-5'-fosfosulfátu (PAPS) (Wang a James, 2006). Koncentrace olomoucínu II a NGF1568 byla 50 µM v celkovém objemu reakční směsi 160 µl. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C. Reakce byla ukončena přidavkem 15 µl 70 % kyseliny chloristé. Následně byly vzorky centrifugovány 5 min při 5000 ot/min [centrifuga BR4i, Juan (Saint nazaire, Francie; rotor AB.214)] a supernatant použit k analýze. HPLC metody pro analýzu očekávaných sulfátů olomoucínu II a NGF1568 by shodné s metodami použitými pro analýzu vzorků obsahujících potenciální glukuronidy příslušných látek.

#### 4.2.8. Identifikace metabolitů testovaných látek pomocí hmotnostní spektrometrie

##### A) Identifikace metabolitů I. fáze olomoucínu II

Na HPLC chromatogramu vzorků (v triplikátech), ve kterých byl inkubován olomoucín II s lidskými jaterními mikrosomy a systémem generujícím NADPH byl detekován nový pík, který patřil s největší pravděpodobností nově vzniklému metabolitu olomoucínu II. Pro identifikaci tohoto metabolitu byly provedeny experimenty s využitím hmotnostní spektrometrie. Olomoucín II byl inkubován s lidským jaterním mikrosomálním preparátem v triplikátech. Reakční směs byla složena z Tris-HCl pufru (pH 7,4), systému generujícího NADPH (NADP<sup>+</sup> 0,5mM; isocitrát 3,7 mM; Mg<sup>2+</sup> 5mM; isocitrátdehydrogenasa 0,5 U/ml), 5mM chloridu hořečnatého a 250 pmol mikrosomálního CYP. Po 10 min preinkubace při 37 °C byl do reakční směsi přidán olomoucín II tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla 50 µM. Vzorek byl inkubován 30 min při 37 °C a následně byla reakce ukončena přidavkem 20 µl 70% kyseliny chloristé. Po centrifugaci po dobu 6 min při 5000 ot/min [centrifuga BR4i, Juan (Saint nazaire, Francie; rotor AB.214)] bylo 200 µl supernatantu použito pro izolaci metabolitu olomoucínu II. Frakce obsahující metabolit olomoucínu II byl izolovány na HPLC systému A (viz Přístrojové vybavení). Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART 250-4 s reverzní fází LiChrospher 100 RP-18 od firmy Merck (Praha, Česká republika).

Metabolit olomoucínu II byl eluován mobilní fází obsahující acetonitril/7,35mM fosfátový pufr (pH 2,2) (29:71 (v/v)). Jednotlivé frakce obsahující metabolit olomoucínu II byly koncentrovány v atmosféře dusíku na ½ původního objemu, sloučeny a injikovány do hmotnostního spektrometru s iontovou pastí LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analýza probíhala v (+)ESI-MS/MS módu za předem optimalizovaných podmínek (napětí na sondě elektrospreje 5 kV, teplota kapiláry 300 °C, proud zmlžujícího spreje dusíku 60 a.u. (arbitrární jednotky) (sheath gas flow rate), pomocný sprej dusíku 15 a.u. (auxiliary gas flow rate) a 8 a.u. (sweep gas flow rate)). Pro vytvoření teoretických fragmentačních spekter parentní látky a předpokládaných metabolitů byl použit software Mass Frontier 5.0 (HighChem, Bratislava, Slovenská republika). K dispozici byly také standardy dvou možných metabolitů olomoucínu II a to 2,4-dihydroxyroskovitin a 2,5-dihydroxyroskovitin, které byly také podrobeny (+)-ESI-MS/MS experimentům. Navíc byly tyto standardy analyzovány pomocí HPLC pro zjištění retenčních časů.

#### B) Identifikace metabolitů II. fáze olomoucínu II a NGF1568 pomocí LC/MS analýzy

Vzorky obsahující předpokládané glukuronidy a sulfáty olomoucínu II a NGF1568 byly analyzovány pomocí LC/MS. K analýze bylo použito HPLC systému A v kombinaci s hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet. Vzorky pro LC/MS analýzy byly připraveny inkubací testovaných látek s lidskou jaterní mikrosomální frakcí (UGT), případně s lidskou jaterní cytosolární frakcí (SULT), tak jak je popsáno v příslušných kapitolách (4.2.6 a) a 4.2.7). Chromatografické podmínky, při kterých probíhaly jednotlivé analýzy pro detekci a identifikaci glukuronidů jsou uvedeny v kapitole 4.2.6 A) a pro detekci a identifikaci sulfátů v kapitole 4.2.7. Optimalizované podmínky MS analýzy jsou uvedeny v kapitole 4.2.8 A).

## 5. VÝSLEDKY

---

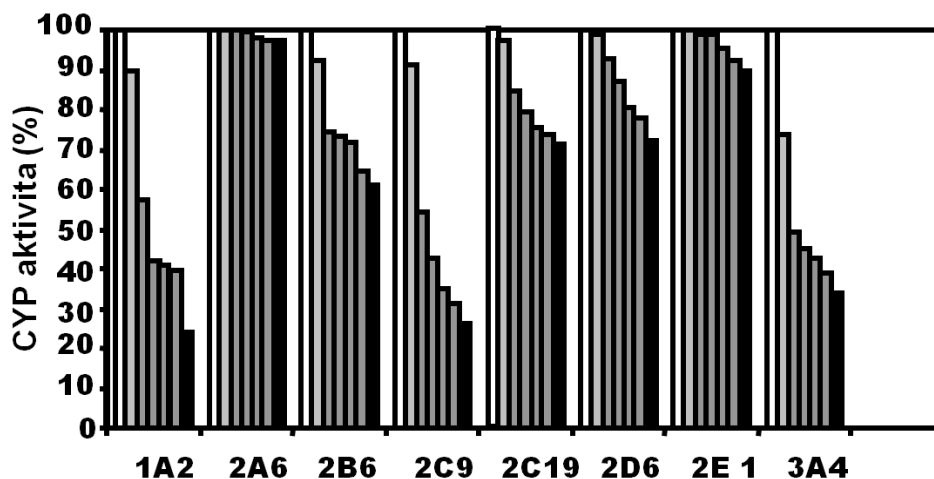
### 5.1. Interakce testovaných látek s lidskými mikrosomálními jaterními CYP

#### 5.1.1. Inhibice markerové aktivity CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci

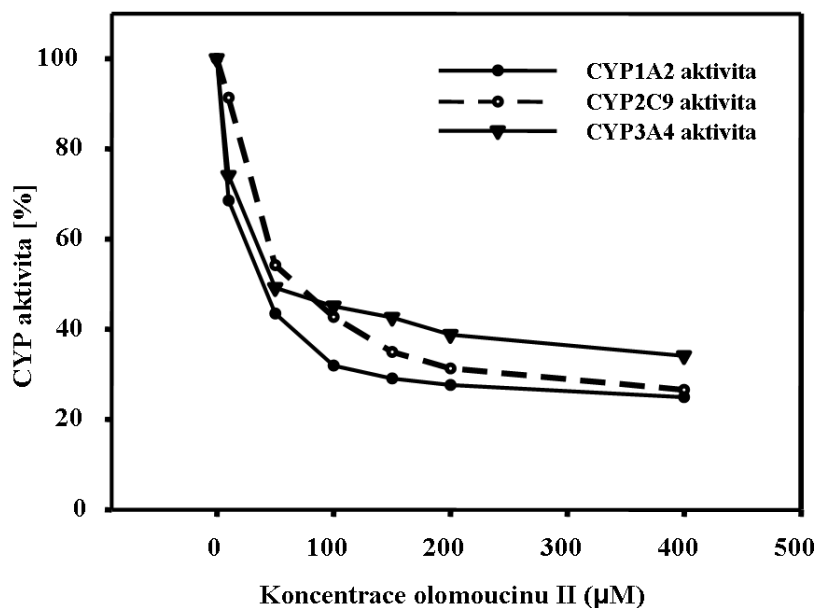
##### Olomoucín II

Olomoucín II byl testován z hlediska možného inhibičního vlivu na enzymovou aktivitu devíti form CYP přítomných v lidských jaterních mikrosomech. Inhibiční vliv olomoucínu II na jednotlivé CYP byl studován na 6 koncentračních úrovních daného CDK inhibitoru, aby byl dostatečně zachycen průběh změny enzymové aktivity se zvyšující se koncentrací potenciálního inhibitoru. Olomoucín II neměl významný vliv na enzymovou aktivitu CYP2A6 a CYP2E1. Testovaná látka dále pouze slabě interagovala s CYP2B6, CYP2C19 a CYP2D6. U těchto CYP nebyla signifikantně snížena enzymová aktivita ani v přítomnosti vysokých koncentrací olomoucínu II ( $\geq 200 \mu\text{M}$ ). Naopak, olomoucín II výrazně inhiboval markerovou aktivitu CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 (i v koncentracích  $\leq 50 \mu\text{M}$ ).

Shrnutí výsledků inhibičního vlivu olomoucínu II na specifickou enzymovou aktivitu testovaných CYP je graficky znázorněno na Obr. 11. Obr. 12 detailněji znázorňuje výraznou inhibici enzymové aktivity CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 olomoucínem II. Při nejvyšší koncentraci olomoucínu II došlo k poklesu enzymové aktivity CYP1A2 na 24 %, CYP2C9 na 26 % a CYP3A4 na 35 % z původní 100 % enzymové aktivity v kontrolních vzorcích (tj. reakčních směsích bez přídavku olomoucínu II). Takový rozsah inhibice potvrzuje, že olomoucín II interaguje s těmito třemi CYP poměrně specificky.



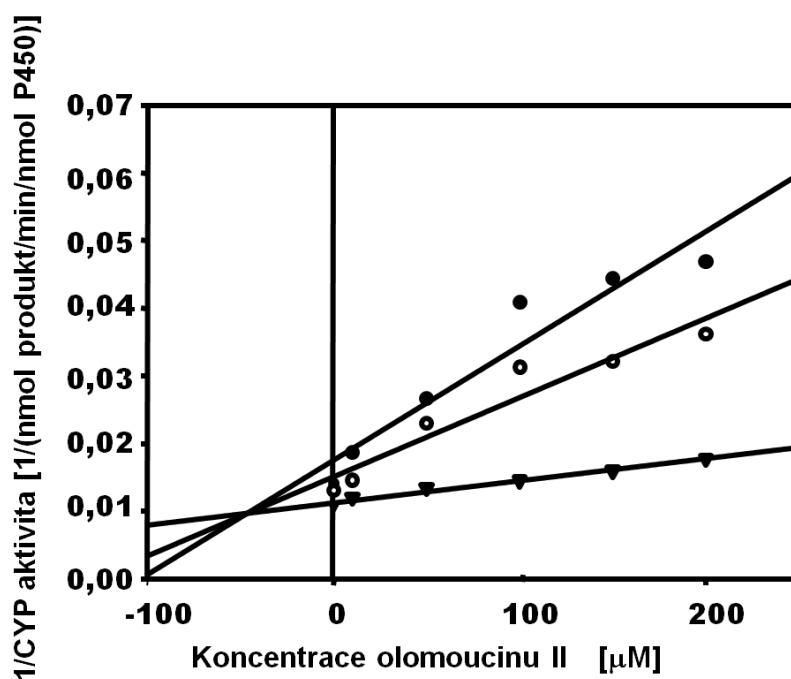
Obrázek 11. Ovlivnění enzymové aktivity vybraných CYP olomoucinem II v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400  $\mu\text{M}$  (čím tmavší barva sloupců, tím vyšší koncentrace testované látky, tj. rostoucí koncentrace olomoucinu II zleva doprava)



Obrázek 12. Detailnější pohled na ovlivnění enzymové aktivity CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 olomoucinem II

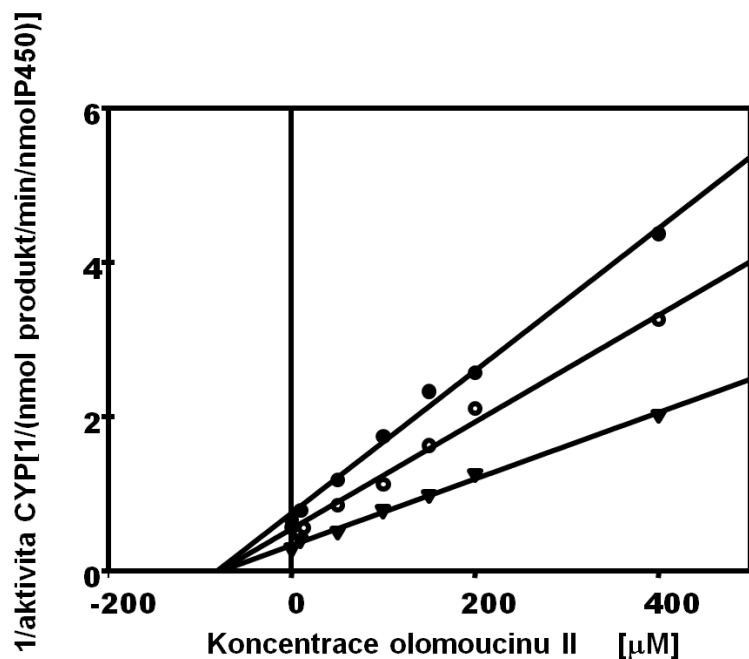
Pro kvantitativní popis inhibicí těchto tří enzymů olomoucinem II byly také stanoveny hodnoty  $IC_{50}$ : pro CYP1A2  $IC_{50} = 17 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ; pro CYP2C9  $IC_{50} = 39,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$  a pro CYP3A4  $IC_{50} = 18,0 \pm 3,7 \mu\text{M}$ .

Pro zjištění o jaký typ enzymové inhibice olomoucinem II se v případě CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 jedná, byly provedeny experimenty umožňující konstrukci Dixonových výnosů (Segel, 1975). Byl sledován inhibiční vliv olomoucínu II na markerové aktivity příslušných CYP na třech koncentračních úrovních substrátů ( $1/2 K_m$ ,  $K_m$  a  $2 K_m$ ). Podle průběhu Dixonova výnosu interagoval olomoucín II s CYP1A2 jako inhibitor smíšeného typu s inhibiční konstantou  $K_i = 50 \mu\text{M}$  (Obr. 13). V případě CYP2C9 olomoucín II inhiboval enzymovou aktivitu nekompetitivně s inhibiční konstantou  $K_i = 75 \mu\text{M}$  (Obr. 14). Pro inhibici CYP3A4 z průběhu Dixonova výnosu vyplývá, že se olomoucín II pravděpodobně chová vůči CYP3A4 jako parciálně nekompetitivní inhibitor (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 15). Hodnota  $K_i$  pro inhibici CYP3A4 olomoucínem II se pohybovala v desítkách  $\mu\text{mol/l}$ .

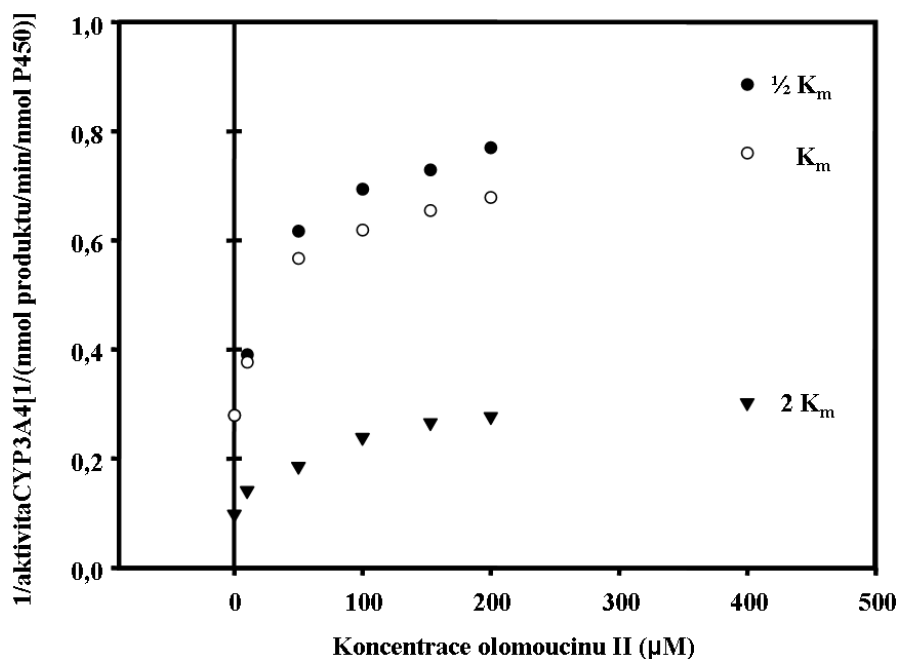


Obrázek 13. Dixonův výnos pro inhibici CYP1A2 olomoucínem II (plné puntíky pro koncentraci substrátu  $1/2 K_m$ , prázdná kolečka pro koncentraci substrátu rovnající se  $K_m$ , trojúhelníky pro koncentraci substrátu  $2 K_m$ )





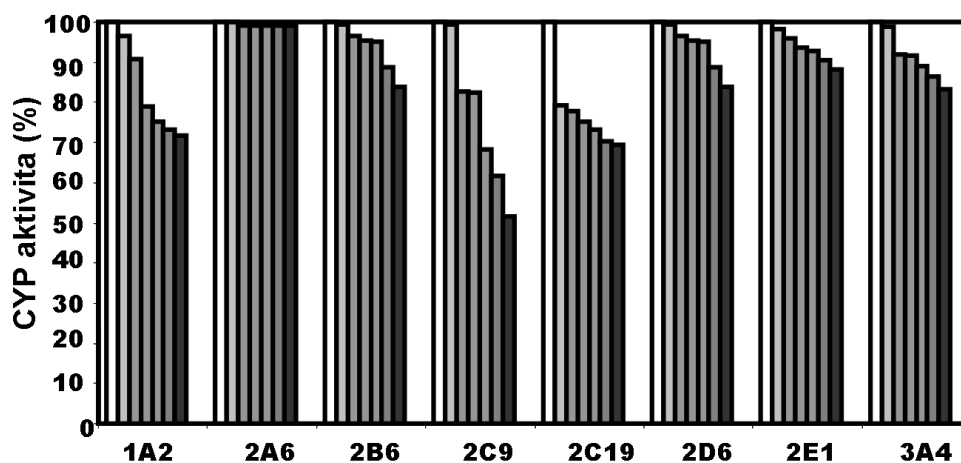
Obrázek 14. Dixonův výnos pro inhibici CYP2C9 olomoucinem II (plné puntíky pro koncentraci substrátu  $\frac{1}{2} K_m$ , prázdná kolečka pro koncentraci substrátu rovnající se hodnotě  $K_m$ , trojúhelníky pro koncentraci substrátu  $2 K_m$ )



Obrázek 15. Dixonův výnos pro inhibici CYP3A4 olomoucinem II (plné puntíky pro koncentraci substrátu  $\frac{1}{2} K_m$ , prázdná kolečka pro koncentraci substrátu rovnající se hodnotě  $K_m$ , trojúhelníky pro koncentraci substrátu  $2 K_m$ )

## NGF1568

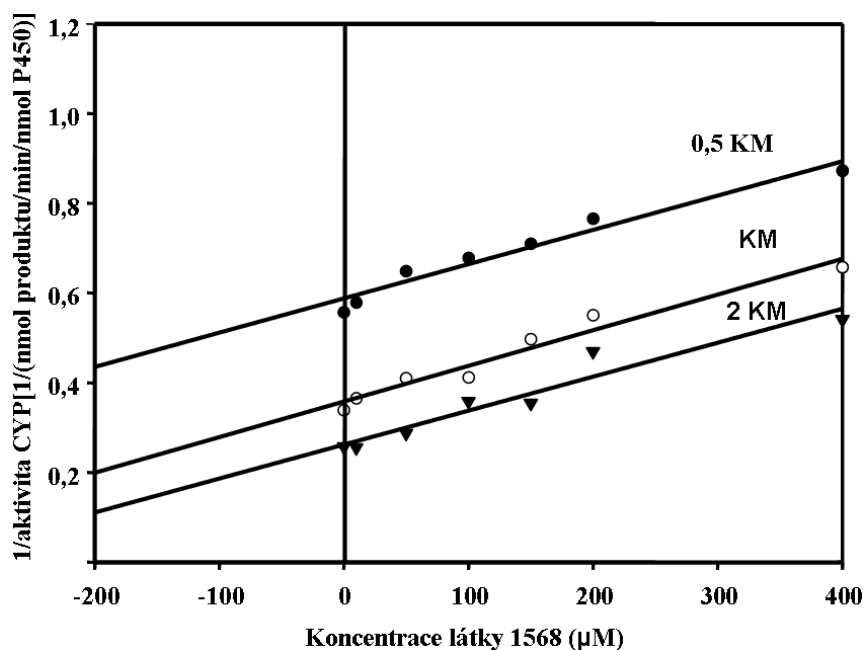
Stejně jako v případě olomoucínu II i u tohoto cytokininového derivátu byl sledován jeho potenciální inhibiční účinek na aktivitu devíti vybraných lidských jaterních mikrosomálních CYP. NGF1568 neměl výrazný inhibiční efekt na enzymové aktivity CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4. Rozsah inhibice markerové aktivity těchto enzymů rostl se zvyšující se koncentrací testované látky, avšak inhibice enzymové aktivity příslušných enzymů neklesla ani v jednom případě pod 80 % z původní 100 % aktivity v kontrolních vzorcích (tj. ve vzorcích bez přítomnosti NGF1568). Ve větším rozsahu byly látkou NGF1568 inhibovány aktivity CYP1A2 a CYP2C19. Největší inhibiční efekt testované látky na enzymovou aktivitu byl pozorován u CYP2C9. V přítomnosti nejvyšší koncentrace testované látky v reakční směsi (tj. 400  $\mu$ M) došlo k poklesu enzymové aktivity CYP2C9 přibližně na 50 % z původní hodnoty v kontrolních vzorcích. Obr. 16 shrnuje inhibiční efekt NGF1568 na markerovou aktivitu osmi testovaných CYP.



Obrázek 16. Ovlivnění enzymové aktivity vybraných forem CYP látkou NGF1568 v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu$ M (čím tmavší barva sloupců, tím vyšší koncentrace testované látky, tj. rostoucí koncentrace NGF1568 zleva doprava)

Pokles enzymové aktivity CYP2C9 na přibližně 50 % původní kontrolní hodnoty vlivem přítomnosti nejvyšší koncentrace NGF1568 v inkubované vzorky

signalizuje, že interakce NGF1568 s CYP2C9 je významná. Na základě tohoto faktu byly provedeny experimenty umožňující zkonstruování Dixonova výnosu a určení typu inhibice aktivity CYP2C9 testovanou látkou a určení hodnoty inhibiční konstanty  $K_i$ . Průběh Dixonova výnosu ukázal, že se látka NGF1568 chovala vůči CYP2C9 jako akompetitivní inhibitor s inhibiční konstantou  $K_i = 349 \mu\text{M}$  (Obr. 17).



Obrázek 17. Dixonův výnos pro inhibici CYP2C9 látkou NGF1568

### 5.1.2. Role lidských jaterních mikrosomálních CYP v metabolismu testovaných látek

#### Inkubace cytokininových derivátů s lidskými jaterními mikrosomy a NADPH-generujícím systémem

V inhibičních experimentech bylo prokázáno, že jak olomoucín II tak NGF1568 do určité míry interagují s lidskými jaterními mikrosomálními CYP ve smyslu inhibice jejich enzymových aktivit. V dalším kroku bylo třeba zjistit, zda interakce testovaných látek s CYP nevedou ke vzniku metabolitů. Olomoucín II a NGF1568 byly tedy inkubovány s mikrosomální frakcí lidských jater v přítomnosti systému generujícího NADPH. Vzorčky obsahující přepokládané metabolity byly analyzovány pomocí HPLC, tak jak je popsáno v příslušných kapitolách.

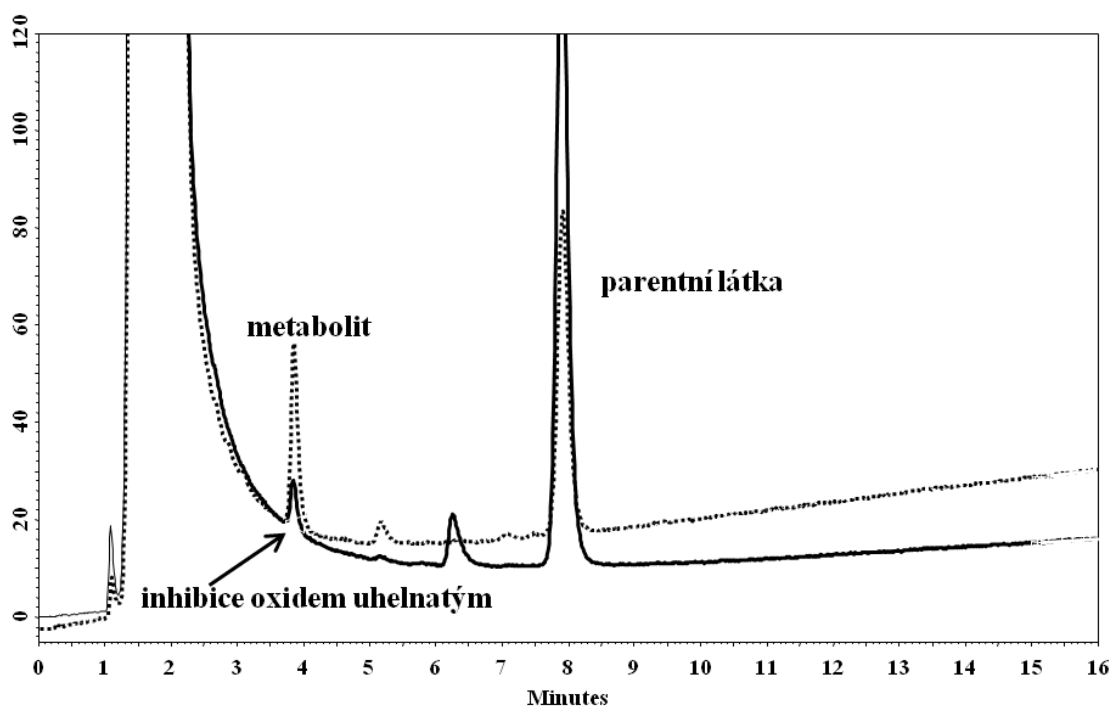
V případě NGF1568 nebyl detekován na HPLC chromatogramu nový pík, který by mohl odpovídat přítomnosti metabolitu I. fáze testované látky v příslušném inkubovaném vzorku. Nebyl zaznamenán ani pokles plochy píku parentní látky u daného vzorku, který by mohl signalizovat vznik možného metabolitu, pro jehož detekci však použitá metoda nebyla vhodná.

Jinak tomu bylo však v případě olomoucínu II. Na chromatografickém záznamu analýzy vzorků, ve kterých byl za stejných podmínek inkubován s mikrosomální frakcí olomoucínu II, byl identifikován nový pík náležící zřejmě metabolitu .

#### Vliv oxidu uhelnatého a specifických inhibitorů aktivit jednotlivých forem CYP na tvorbu metabolitu olomoucínu II v mikrosomální frakci

Účast CYP na metabolismu olomoucínu II byla potvrzena experimentem, ve kterém byl sledován vliv oxidu uhelnatého, univerzálního inhibitoru všech forem CYP, na vznik metabolitu olomoucínu II. Přítomnost oxidu uhelnatého vedla ke snížení množství vzniklého metabolitu na přibližně 15 % původní hodnoty (v kontrolních vzorcích, které nebyly podrobeny inhibici oxidem uhelnatým). Přítomnost určitého množství předpokládaného metabolitu ve vzorcích vystavených působení oxidu uhelnatého mohla být způsobena nedostatečnou technickou propracovaností experimentu (neúplné odstranění kyslíku z reakční směsi) nebo příspěvkem jiných enzymů metabolismu I. fáze k tvorbě příslušného metabolitu. Obr. 18 ilustruje inhibiční vliv oxidu uhelnatého na tvorbu metabolitu olomoucínu II.

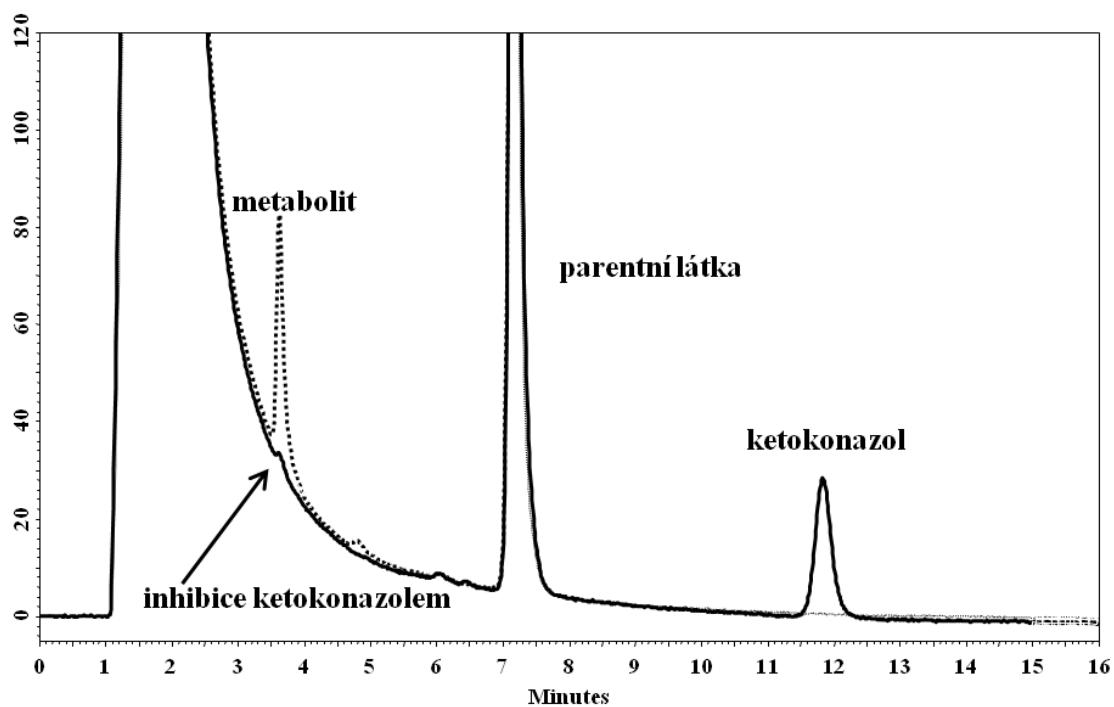
V dalším kroku byly provedeny experimenty se specifickými inhibitory aktivit jednotlivých forem CYP. Cílem bylo zjistit, který specifický inhibitor CYP je schopen inhibovat tvorbu metabolitu olomoucínu II, a tak nepřímo identifikovat příslušný CYP podílející se na metabolismu testované látky. Jako nejúčinnější inhibitor biotransformace olomoucínu II lidskými jaterními mikrosomálními CYP byl identifikován ketokonazol. Ketokonazol je specifický inhibitor enzymové aktivity CYP3A4. Na základě získaných výsledků lze shrnout, že CYP3A4 má nejdůležitější roli v metabolismu olomoucínu II. Obr. 19 ilustruje inhibici tvorby metabolitu olomoucínu II ketokonazolem; v přítomnosti ketokonazolu bylo množství vzniklého metabolitu olomoucínu II sníženo pouze na 1 % v porovnání s množstvím metabolitu vzniklého v kontrolních vzorcích (tj. bez ketokonazolu).



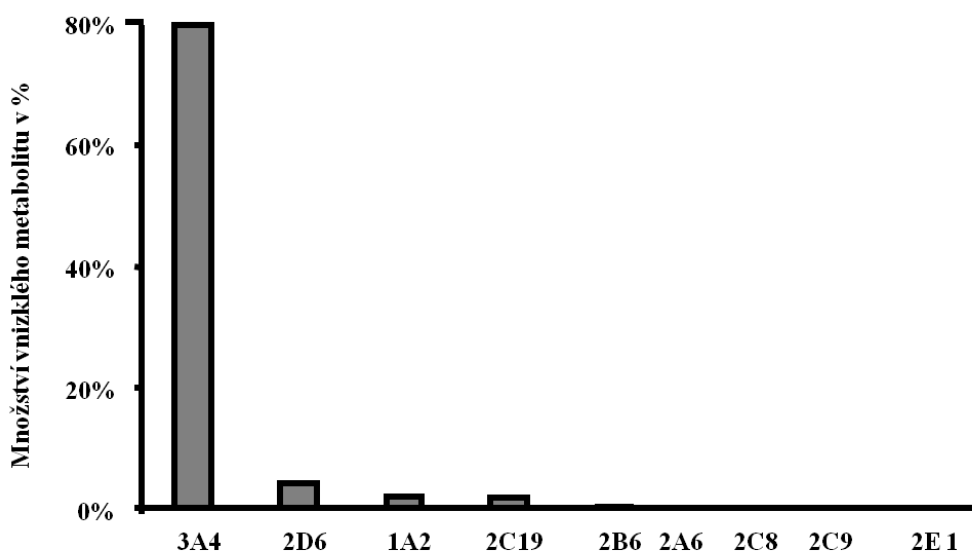
Obrázek 18. Porovnání chromatogramu kontrolního vzorku (olomoucine II inkubovaný s jaterními mikrosomy a systémem generujícím NADPH) s chromatogramem vzorku, ve kterém byly lidské jaterní mikrosomální CYP vystaveny účinku oxidu uhelnatého před přidavkem olomoucine II

#### Inkubace olomoucine II s rekombinantními CYP

Experimenty se specifickými inhibitory CYP nepřímo ukázaly, že CYP3A4 je právě tím enzymem, který velkou měrou přispívá k metabolismu olomoucine II *in vitro*. Pro potvrzení tohoto faktu byl olomoucine II ještě dále inkubován s baktosomy a systémem generujícím NADPH. Baktosomy jsou bakteriální membránové preparáty z *Escherichia coli*, obsahující jednotlivé rekombinantní CYP společně s příslušnou reduktasou. I v případě experimentů s baktosomy bylo potvrzeno, že tvorba metabolitu olomoucine II je katalyzována především CYP3A4. Na Obr. 20 je uveden graf znázorňující relativní příspěvek jednotlivých rekombinantních CYP k metabolismu olomoucine II *in vitro*.



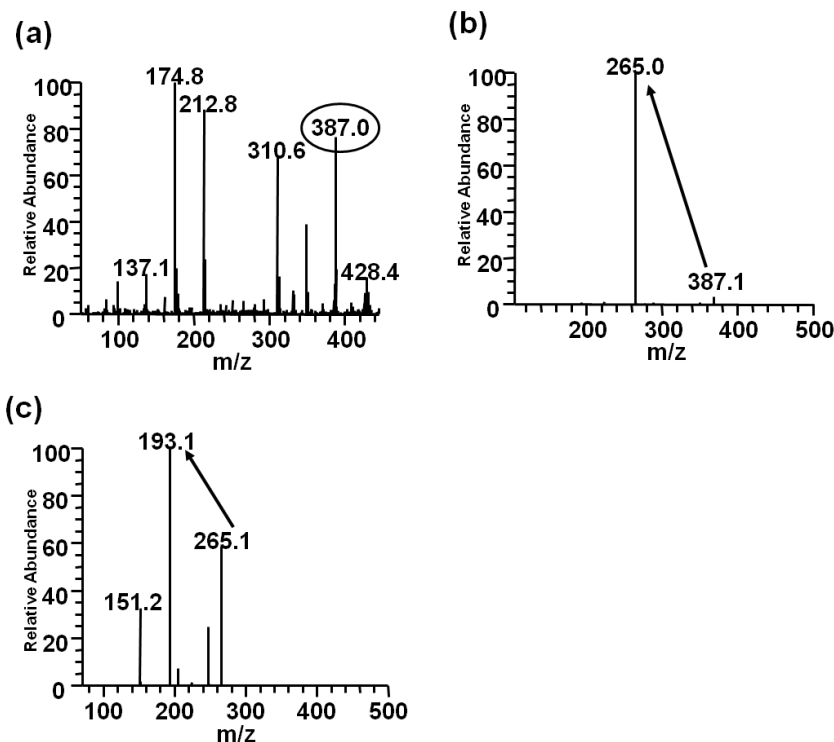
Obrázek 19. Porovnání chromatogramu kontrolního vzorku (olomoucine II inkubovaný s jaterními mikrosomy a systémem generujícím NADPH) s chromatogramem vzorku, ve kterém byl navíc přítomen specifický inhibitor CYP3A4, ketokonazol.



Obrázek 20. Relativní příspěvek rekombinantních CYP k tvorbě metabolitu olomoucine II

## Identifikace metabolitu olomoucínu II vzniklého v I. fázi metabolismu pomocí HPLC a MS

Na základě provedených experimentů s lidskou jaterní mikrosomální frakcí a baktosomy lze tvrdit, že olomoucín II je substrátem některých lidských jaterních mikrosomálních CYP; především CYP3A4 hraje důležitou roli v metabolismu olomoucínu II. Dále bylo třeba však zjistit, jaký metabolit olomoucínu II vlastně vzniká. Proto tedy byly frakce obsahující předpokládaný metabolit podrobeny analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Vzorky obsahující olomoucín II inkubovaný s lidskou jaterní mikrosomální frakcí a NADPH-generujícím systémem byly analyzovány pomocí HPLC (viz kapitola 4.2.8 a ). Frakce s pravděpodobným metabolitem olomoucínu II byly sbírány v oblasti retenčního času, ve kterém byl z chromatografické kolony eluován daný metabolit. Po zakoncentrování byly jednotlivé frakce kombinovány a injikovány do hmotnostního spektrometru. (+)ESI-MS chromatogramy odhalily intenzivní signál o  $m/z$  387 odpovídající kvasimolekulárnímu iontu hydroxylované molekuly olomoucínu II. Metabolit olomoucínu II byl identifikován jako 2,5-dihydroxyrozkovitin na základě porovnání retenčních časů a hmotnostních spekter s těmi, které byly získány při analýze standardů 2,4-dihydroxyrozkovitinu a 2,5-dihydroxyrozkovitinu. Hmotnostní spektrum vzorku obsahujícího autentický 2,5-dihydroxyrozkovitin ( $m/z$  387) a hmotnostní spektra ilustrující fragmentaci kvasimolekulárního iontu 2,5-dihydroxyrozkovitinu jsou uvedena na Obr. 21.



Obrázek 21. (a) Hmotnostní spektrum formovaného 2,5-dihydroxyroskovitinu (m/z 387), (b) a (c) fragmentace kvasimolekulárního iontu 2,5-dihydroxyroskovitinu (m/z 387) s dominujícími fragmentačními ionty (m/z 265 a m/z 193)

## 5.2. Příspěvek enzymů II. fáze metabolismu léčiv k biotransformaci testovaných látek

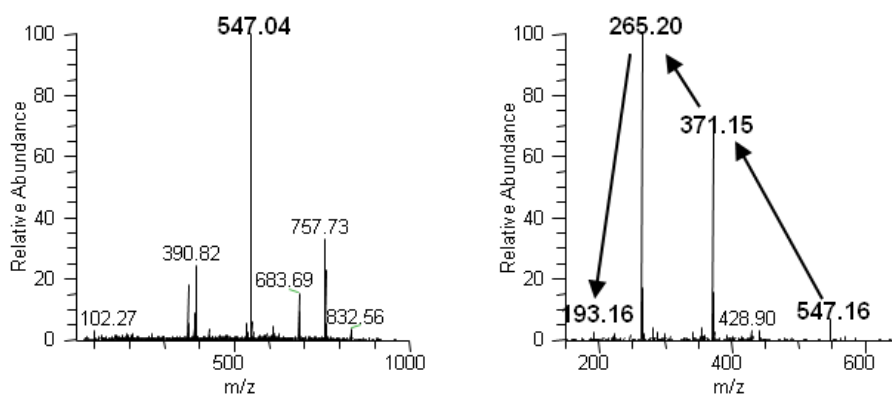
Studovaná potenciální léčiva, olomoucín II i NGF1568, mohou kromě interakcí s enzymy I. fáze metabolismu léčiv interagovat i s kojugačními enzymy neboli enzymy II. fáze metabolismu léčiv, především s UGT a SULT. Možnost těchto interakcí vyplývá z faktu, že oba cytokininové deriváty obsahují ve své struktuře funkční skupiny (především hydroxylové skupiny –OH), přes které mohou být tyto látky konjugovány s endogenní kyselinou glukuronovou či sulfátem.

### 5.2.1. Metabolismus olomoucínu II a NGF1568 lidskými UGT

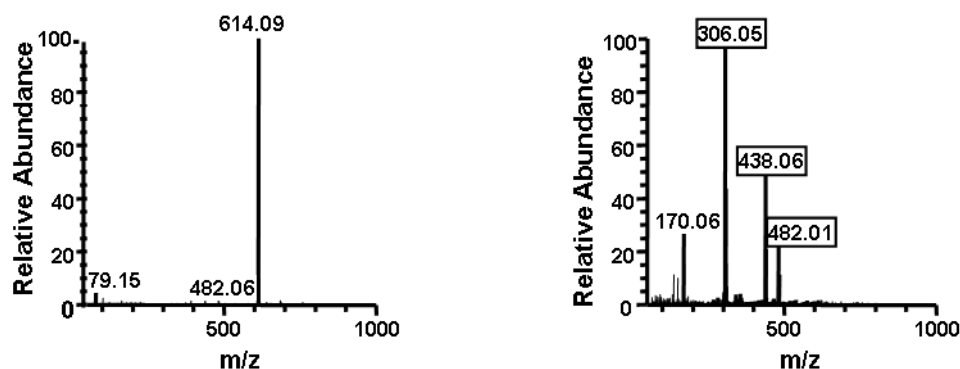
Inkubace olomoucínu II a NGF1568 lidskými jaterními mikrosomy a UDP-glukuronovou kyselinou



Olomoucín II i NGF1568 byly inkubovány s lidskou jaterní mikrosomální frakcí, obsahující kromě enzymů I. fáze metabolismu léčiv i UGT, a UDP-glukuronovou kyselinou. Příprava vzorků i podmínky analýzy jsou popsány v příslušné kapitole (4.2.6). V obou případech byl na chromatogramu příslušných vzorků detekován nový pík patřící předpokládanému glukuronidu olomoucínu II respektive NGF1568. Pro potvrzení přítomnosti vzniklých glukuronidů testovaných látek v reakčních směsích byly příslušné vzorky analyzovány pomocí LC/MS. 2,5-dihydroxyroskovitin, metabolit I. fáze metabolismu olomoucínu II, byl inkubován stejně jako parentní látka, olomoucín II s UDP-glukuronovou kyselinou a lidskými jaterními mikrosomy, ale přítomnost glukuronidu této látky nebyla v inkubované směsi potvrzena. Naopak, v případě olomoucínu II a NGF1568 LC/MS analýza potvrdila přítomnost glukuronidů těchto látek v inkubovaných směsích (Obr. 22 a 23).



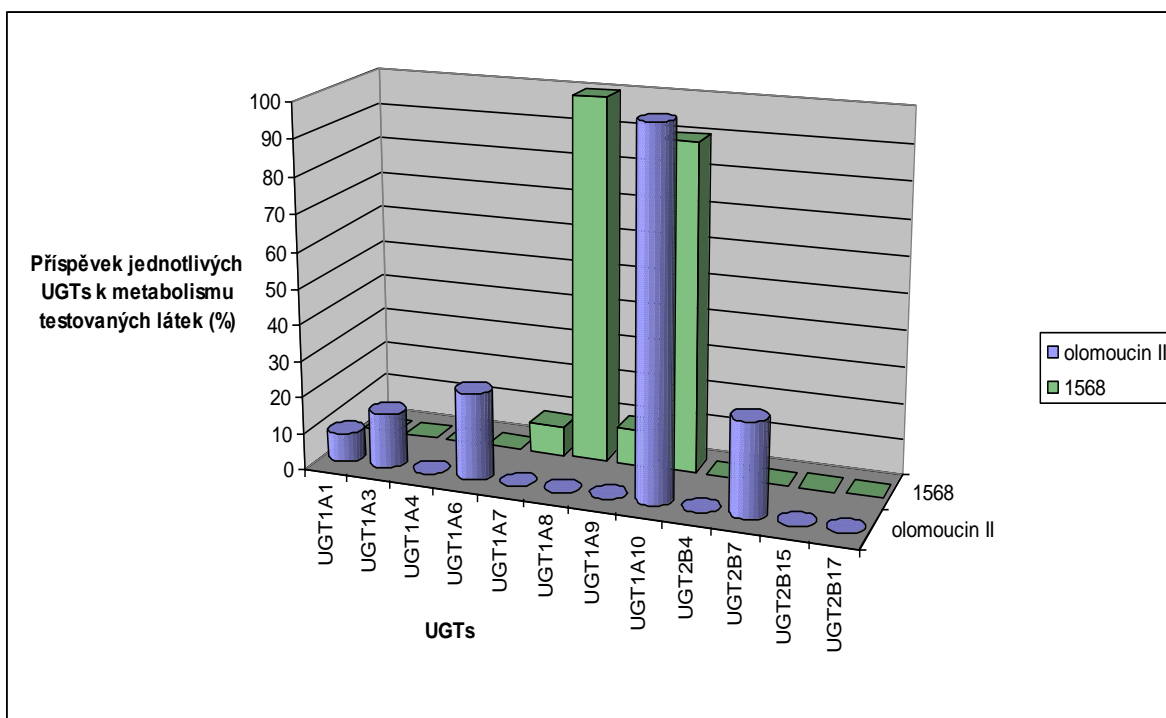
Obrázek 22. Hmotnostní spektrum glukuronidu olomoucínu II (kvazimolekulární ion m/z 547) a fragmentace kvazimolekulárního iontu m/z 547 na fragmenty m/z 371 (kvazimolekulární ion olomoucínu II), m/z 265 a m/z 193



Obrázek 23. Hmotnostní spektrum glukuronidu NGF1568 (kvazimolekulární ion  $m/z$  614) a fragmentační spektrum kvazimolekulárního iontu ( $m/z$  614  $\rightarrow$   $m/z$  482,  $m/z$  438,  $m/z$  306)

#### Příspěvek rekombinantních UGT ke glukuronidaci olomoucínu II a NGF1568

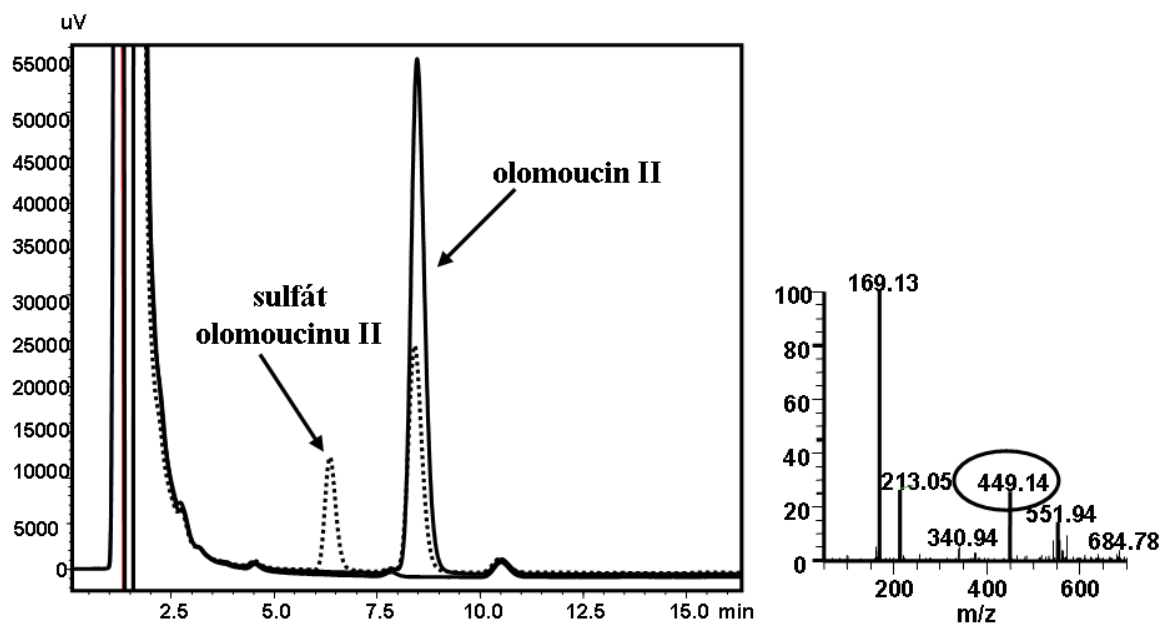
Na základě výsledků z příslušných analýz bylo potvrzeno, že obě testované látky jsou glukuronidovány lidskými jaterními mikrosomálními UGT. V dalším kroku byly identifikovány jednotlivé UGT podílející se na metabolismu olomoucínu II a NFG1568. Kromě UGT, jejichž orgánová lokalizace je především v játrech, byly ve studii testovány i UGT s predominantní expresí v extrahepatálních tkáních (zejména ve střevech). Na glukuronidaci olomoucínu II se podílely UGT1A10, UGT1A6, UGT1A3 a UGT1A1. V porovnání s olomoucínem II byla látka NGF1568 signifikantně glukuronidována extrahepatálními UGT1A8, UGT1A10 a UGT1A7. Pouze UGT1A9 jako jediná jaterní mikrosomální UGT se podílela na glukuronidaci látky NGF1568. Obr. 24 zachycuje příspěvek jednotlivých UGT k metabolismu testovaných látek.



Obrázek 24. Podíl rekombinantních UGT na glukuronidaci olomoucínu II a NGF1568

### 5.2.2. Interakce olomoucínu II a NGF1568 s lidskými jaterními cytosolárními SULT *in vitro*

Na základě zjištění, že jsou obě testované látky významně metabolizovány některými UGT bylo vhodné dále sledovat i možnost podílu jiných enzymů II. fáze metabolismu léčiv na biotransformaci těchto látek. Po inkubaci NGF1568 s lidskou jaterní cytosolární frakcí obsahující SULT a příslušným kosubstrátem, 3-fosfoadenosin 5-fosfosulfátem (PAPS, tzv. aktivní sulfát), nebyl HPLC ani LC/MS analýzou v reakční směsi detekován žádný nově vzniklý metabolit této látky. V případě olomoucínu II separace látek z reakční směsi pomocí HPLC a následná LC/MS analýza odhalily v příslušném inkubovaném vzorku nový metabolit, sulfát olomoucínu II. Na Obr. 25 je uveden HPLC chromatogram kontrolního vzorku a vzorku obsahujícího metabolit olomoucínu II - sulfát. Na Obr. 25 uvedeno MS spektrum sulfátu olomoucínu II ( $m/z$  449).



Obrázek 25. HPLC chromatogram kontrolního vzorku olomoucínu II a vzorku olomoucínu II inkubovaného s lidským jaterním cytosolem a PAPS; MS záznam inkubovaného vzorku obsahujícího nově vzniklý sulfát olomoucínu II ( $m/z$  449)

## 6. DISKUZE

---

Olomoucín II a substance NGF1568 patří mezi experimentální látky odvozené od rostlinných cytokininů obsahující 6-benzylaminopurinovou strukturu, které by v budoucnosti mohly být úspěšně využity při terapii různých onemocnění. Olomoucín II se řadí mezi CDK inhibitory, které inhibicí cyklin-dependentních kinas působí zastavení buněčného cyklu v živočišných buňkách, a proto by tato látka mohla najít v budoucnosti uplatnění v terapii onkologických onemocnění (Krystof a spol., 2002; Krystof a spol., 2005, Weiserska-Gadek a Schmid, 2006). Nedávno syntetizovaná látka NGF1568 vykazuje schopnost ovlivnit růst a funkci neutrofilů a má tak určitý potenciál být v budoucnosti indikována v léčbě zánětlivých procesů.

Cílem této disertační práce bylo sledovat interakce zmíněných látek s lidskými enzymovými systémy zodpovědnými za metabolismus léčiv a pokusit se zhodnotit riziko vzniku možných nežádoucích lékových interakcí na úrovni metabolismu při současném podávání těchto látek s dalšími léčivy.

Interakce cytokininových derivátů se zmíněnými enzymovými systémy (jedná se zejména o systém cytochromů P450) byly doposud testovány poměrně zřídka. Rypka a kol. (2002) se zabývali *in vitro* biotransformací 6-benzylamino-2-(3-hydroxypropylamino)-9-isopropylpurinu (boheminu) myšími jaterními mikrosomy. Bylo prokázáno, že bohemín je metabolizován enzymy z podrodiny CYP2C a CYP3A za vzniku dealkylovaných či hydroxylovaných metabolitů, z nichž některé byly dále transformovány na příslušné karboxylové kyseliny. Dále byla potvrzena i glykosylace boheminu a jeho metabolitů v přítomnosti příslušných cukernatých endogenních látek. U dalších aromatických cytokininů (orto-topolin ribosid, 6-benzylaminopurin ribosid a 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid byla prokázána interakce s lidskými jaterními mikrosomálními CYP na základě měření specifických vazebných spekter (Anzenbacherová a spol., 2005). Z hlediska interakcí s lidskými enzymovými systémy metabolizujícími léčiva (konkrétně s CYP a UGT) byl doposud nejdůkladněji studován roskovitin (seliciclib) (McClue a Stuart, 2008). Bylo proto zajímavé srovnání, jak rozdílně nebo shodně ve vztahu ke strukturně podobnému roskovitinu interagují olomoucín II a NGF1568 s výše uvedenými enzymy.

Na základě výsledků získaných z experimentů provedených v rámci předložené dizertační práce obě testované látky interagovaly s lidskými jaterními CYP poměrně odlišně. Olomoucín II inhiboval významně *in vitro* enzymovou aktivitu CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4. Výraznější inhibice uvedených CYP se projevila již při koncentracích olomoucínu II v rozsahu 10 - 50  $\mu\text{M}$ , přičemž enzymová aktivita uvedených CYP poklesla až na 50 % z původní kontrolní enzymové aktivity. Tento fakt svědčí o relativně specifické interakci daného CDK inhibitoru s výše uvedenými enzymy. Dle průběhu Dixonových výnosů olomoucín II inhiboval aktivitu jednotlivých CYP různým mechanismem. Vůči CYP2C9 se choval jako smíšený inhibitor, v případě CYP1A2 a CYP3A4 se jednalo o nekompetitivní mechanismus inhibice. Hodnoty  $K_i$  se pohybovaly řádově v desítkách  $\mu\text{mol/l}$ . Ačkoliv je olomoucín II na základě výsledků získaných v *in vitro* studii poměrně specifický inhibitor enzymových aktivit minimálně tří isoform CYP, nelze s jistotou tvrdit, že se inhibice CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 projeví v takovém rozsahu i na modelu experimentálních zvířat či případně u člověka. Doposud totiž neexistují spolehlivé studie, které by se zabývaly farmakokinetikou olomoucínu II alespoň u experimentálních zvířat. Vezmeme-li v úvahu možnou aplikaci olomoucínu II pacientům, musí být samozřejmě známy důležité farmakokinetické parametry, jako je například distribuční objem, vazba na plazmatické bílkoviny, tj. koncentrace volného léčiva v organismu, a doba, za jakou lze dosáhnout ustálené koncentrace olomoucínu II v plazmě či v okolí nádorové tkáně. Aby se u člověka projevil dostatečně silný inhibiční efekt olomoucínu II na enzymovou aktivitu příslušných CYP, musely by se jeho rovnovážné plazmatické hladiny pohybovat minimálně v rozsahu koncentrací, při kterých došlo *in vitro* ke specifické inhibici příslušných enzymů.

Ve srovnání s olomoucínem II interagovala druhá testovaná látka, tj. NGF1568, s lidskými jaterními mikrosomálními CYP převážně nespecificky. Inhibice jednotlivých CYP látkou NGF1568 byla patrná pouze při vyšších koncentracích testované látky a navíc aktivita daných CYP neklesla pod 80 % původní kontrolní hodnoty. Výjimku představovala pouze inhibice CYP2C9, jehož enzymová aktivita poklesla zhruba na 50 % kontrolní hodnoty v přítomnosti nejvyšší koncentrace testované látky, tj. 400  $\mu\text{M}$ .  $K_i$  se pohybovala řádově ve stovkách  $\mu\text{mol/l}$ . Z porovnání výsledků týkajících se inhibice CYP olomoucínem II a látkou NGF1568 s výsledky získanými v podobné studii zabývající se metabolismem purinového derivátu roskovitinu (seliciclib) (Stuart a McClue, 2008), je patrné, že tyto (ač

strukturně blízké látky) interagují s danými enzymy rozdílně. Roskovitin inhiboval extenzivně enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP3A4 ( $K_i$  pro CYP2C9 3,8  $\mu\text{M}$ , pro CYP3A4  $K_i$  3,2  $\mu\text{M}$ ), sice podobně jako olomoucín II, avšak v řádově nižších koncentracích. V práci Stuarda a McClue je dále uvedeno, že roskovitin inhiboval enzymovou aktivitu příslušných CYP v takových koncentracích, kterých bylo dosaženo u člověka ve fázi klinického zkoušení léčiva. Kdyby olomoucín II a NGF1568 na základě podobných fyzikálně-chemických vlastností s roskovitem dosahovaly u člověka stejných plazmatických hladin, jako je tomu v případě roskovitinu, pak by tyto dvě látky nebyly *in vivo* pravděpodobně tak potentními inhibitory příslušných CYP, jako je roskovitin. Přesto nelze vyloučit riziko vzniku lékových interakcí při možném užívání zejména olomoucínu II současně se substráty CYP3A4, CYP2C9 či CYP1A2 v klinické praxi (nebo při klinických studiích). Naopak riziko vzniku lékových interakcí na úrovni CYP se v případě látky NGF1568 zdá být spíše nízké.

Metabolismus látky je velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje terapeutickou koncentraci léčiva v plazmě, resp. v cílové tkáni. V další fázi experimentů bylo zjištěno, že olomoucín II podléhá *in vitro* 5'-hydroxylaci, při níž vzniká metabolit 2,5-dihydroxyrosvovitin. Experimenty se specifickými inhibitory CYP a baktosomy potvrdily majoritní roli CYP3A4 v katalýze této biotransformační reakce. CYP2D6 a CYP1A2 přispěly sice také k tvorbě příslušného metabolitu, avšak nepatrně. Na rozdíl od olomoucínu II není látka NGF1568 metabolizována lidskými jaterními mikrosomálními CYP. CYP3A4 se spolu s CYP2B6 významnou měrou podílí i na metabolismu roskovitinu (McClue a Stuart, 2008). Na rozdíl od olomoucínu II je však tato látka především karboxylována. Dalšími minoritními metabolity jsou struktury s nově vzniklou hydroxylovou skupinou na aromatickém jádře (podobně jako u olomoucínu II) a metabolit s karbonylovou skupinou. Nově vzniklé metabolity roskovitinu mají nižší farmakologickou účinnost ve srovnání s parentní látkou. Data pro srovnání farmakologické účinnosti olomoucínu II a jeho metabolitu 2,5-dihydroxyrosvovitinu se doposud nepodařilo shromáždit, proto lze jen spekulovat, vede-li daná hydroxylační cesta i u olomoucínu II k inaktivaci jeho farmakologické aktivity a k následné eliminaci látky z organismu. Fakt, že olomoucín II je inhibitelem CYP3A4 a navíc je i substrátem daného enzymu, přivádí experimentálního farmakologa k tvrzení, že by riziko vzniku potenciálních lékových interakcí olomoucínu II a dalších současně užívaných léčiv na úrovni CYP mělo být

přeci jen důkladně zváženo. K tomuto tvrzení přispívá i to, že řada protinádorových léčiv je metabolizována právě CYP3A4. Některé z těchto látek jsou aplikovány pacientům ve formě proléčiv, které jsou až v organismu působením různých CYP přeměněny na vlastní farmakologicky účinné formy. Například cyklofosamid je aktivován na farmakologicky účinný metabolit působením CYP2B6, naopak CYP3A4 katalyzuje reakci vedoucí ke vzniku jeho inaktivního metabolitu. V případě fosforamidu se naopak CYP3A4 významně podílí na bioaktivaci této látky (Chang a spol., 1993). Při současném podání olomoucínu II a jiných protinádorových léčiv, které jsou zároveň substráty CYP3A4, by se tedy mohl objevit zvýšený výskyt toxických účinků léčiv, u nichž je v důsledku inhibice CYP3A4 olomoucínem II snížena metabolická inaktivace. Naopak látky, které jsou bioaktivovány prostřednictvím CYP3A4, by mohly dosahovat v místě působení nedostatečných, subterapeutických hladin. Navíc je CYP3A4 exprimován v některých nádorových tkáních, např. v nádorech prsu (Murray a spol., 1993), z čehož vyplývá, že by olomoucín II mohl interferovat s bioaktivací některých protinádorových léčiv přímo v místě nádoru.

Stuart a McClue (2008) ve své práci také uvádějí, že u roskovitinu byla v předběžných testech potvrzena schopnost indukovat expresi některých UGT a CYP (nepublikované výsledky). Předložená dizertační práce se zabývá studiem metabolických přeměn uvedených dvou látek, avšak vliv olomoucínu II ani NGF1568 na expresi enzymů metabolizujících léčiva prozatím studován nebyl. Při prokázání schopnosti olomoucínu II či NGF1568 vyvolat enzymovou indukci by bylo samozřejmě znásobeno riziko možného výskytu nežádoucích lékových interakcí na úrovni metabolismu při zavedení těchto látek v klinické praxi.

V další fázi experimentů týkajících se dizertační práce bylo zjišťováno, jsou-li testované látky také substráty enzymů II. fáze metabolismu léčiv (konkrétně UGT a SULT). Zájem o možné interakce studovaných látek s UGT a SULT vyplývá především z faktu, že obě látky mají ve své chemické struktuře vhodné funkční skupiny (hydroxyl a dusíkový atom s volným elektronovým párem), které by mohly být cílem ataku zmíněných enzymů. *In vitro* studie prokázala, že jak olomoucín II, tak látka NGF1568 podléhají glukuronidaci v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů a UDP-glukuronové kyseliny. Místo konjugace glukuronové kyseliny k těmto látkám se nepodařilo zatím přesně určit. K dispozici nebyly ani standardy potenciálních glukuronidů pro porovnání jejich HPLC a MS vlastností s těmi, které



byly získány u glukuronidů vzniklých inkubací testovaných látek. U NGF1568 vzniká pravděpodobně *O*-glukuronid, což je způsobeno vhodnými sterickými podmínkami umístění hydroxylové skupiny na aromatickém jádře ve struktuře NGF1568 (umístění OH-skupiny *ortho* poloze benzylového zbytku navázaného v N<sub>6</sub> poloze 2-chloroadenosinu). V případě olomoucínu II může docházet k *O*-glukuronidaci na aromatickém jádře nebo postranním řetězci. Pro zjištění, které individuální UGT enzymy se podílejí na metabolismu olomoucínu II a NGF1568, byly testované látky inkubovány s rekombinantními enzymy exprimovanými v tzv. supersomech. Výsledky těchto experimentů ukazují na významné rozdíly ve spektru UGT přispívajících k metabolismu testovaných látek. NGF1568 je predominantně glukuronidována extrahepatickými UGT, konkrétně UGT1A7, UGT1A8 a UGT1A10. Jako jediný zástupce jaterních UGT se glukuronidace NGF1568 účastní enzym UGT1A9, avšak ve srovnání s extrahepatálními UGT je jeho role v *in vitro* metabolismu příslušného cytokininového ribosidu spíše minoritní. Na rozdíl od NGF1568 se v případě olomoucínu II podílí na jeho glukuronidaci naopak spíše jaterní UGT. Konkrétně se jedná o UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6 a UGT2B7. Avšak signifikantně je olomoucín II metabolizován i střevní UGT1A10. Dle studie Stuarta a McClue (2008) je roskovitin glukuronidován *in vitro* především lidskými jaterními UGT enzymy (UGT1A3, UGT1A9 a UGT2B7). Ve studii sledující metabolismus roskovitinu *in vivo* u potkanů byly detekovány ve žluči právě glukuronidy roskovitinu a jeho oxidačních metabolitů jako majoritní metabolity II. fáze (Stuart a McClue, 2008). Glukuronidace jaterními UGT by tedy mohla představovat i v případě olomoucínu II významnou metabolickou cestu vedoucí k inaktivaci léčiva a jeho následné eliminaci z organismu. V rámci dizertační práce nebyla míra inhibice jednotlivých jaterních mikrosomálních UGT olomoucínem II sledována, protože neexistují dostatečně specifické substráty pro jednotlivé UGT a také na našem pracovišti prozatím nejsou zavedeny metody pro sledování markerové aktivity UGT. Přesto lze tvrdit, že by olomoucín II mohl hrát určitou roli kompetitivního inhibitoru těch UGT, pro které je sám substrátem. V tomto případě by mohl být ovlivněn metabolismus jiných léčiv, které jsou substráty UGT zapojených v metabolismu olomoucínu II (tj. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6 a UGT2B7). Význam metabolismu olomoucínu II jaterními UGT pro vznik lékových interakcí však lze jen stěží odhadnout, protože UGT patří mezi enzymy s nízkou substrátovou specificitou - jinými slovy, jedna látka je často metabolizována více formami UGT a v případě

kompetice o vazebné místo na jednom enzymu je tak druhé léčivo jednoduše glukuronidováno jiným UGT enzymem.

V případě NGF1568 lze též pouze spekulovat o významu glukuronidace této látky střevními UGT. Bude-li tato látka vylučována ve žluči, mohla by být vystavena glukuronidaci střevními UGT. Glukuronidace NGF1568 střevními enzymy by mohla teoreticky ovlivnit metabolismus léčiv (kompetice o vazebné místo na enzym), které se vstřebávají v tenkém střevě a zároveň jsou potenciálními substráty příslušných střevních UGT. Metabolismu střevními UGT podléhají například kyselina mykofenolová nebo naloxon či na naltrexon (Bernard a Guillemette, 2004; Cheng a spol., 1999). Teoreticky by tak mohly obě látky, NGF1568 i olomoucín II, přispět ke zvýšení biodostupnosti těch léčiv, která jsou vstřebávána právě v dolních částech gastrointestinálního traktu. Význam metabolismu olomoucínu II jaterními UGT pro vznik lékových interakcí lze jen těžko odhadnout, protože jak již bylo uvedeno, UGT jsou enzymy s nízkou substrátovou specifitou, jinými slovy jedna látka je často metabolizována více UGT a může být glukuronidována jiným UGT enzymem. Inhibice UGT olomoucínem II a NGF1568 nebyly v rámci dizertační práce testovány, protože neexistují dostatečně specifické substráty jednotlivých UGT.

V poslední fázi experimentu bylo zjišťováno, zda testované cytokininové deriváty podléhají *in vitro* také sulfataci. V případě olomoucínu II byl LC/MS analýzou potvrzen vznik sulfátu po inkubaci testované látky s lidským jaterním cytosolem a PAPS. Naopak u substance NGF1568 se vznik sulfatovaného metabolitu nepotvrdil. Místo konjugace sulfátu k olomoucínu II ani příslušná SULT zodpovědná za biotransformaci olomoucínu II prozatím určeny nebyly.

Z celkového pohledu na výsledky experimentální práce vyplývá, že testované cytokininové deriváty mají potenciál interagovat s významnými biotransformačními enzymy, avšak poněkud rozdílně. Olomoucín II působí *in vitro* jako enzymový inhibitor minimálně tří forem CYP (CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4) v rozsahu desítkových mikromolárních koncentrací a zároveň je výrazně metabolizován i formou CYP3A4. Látka NGF1568 inhibuje signifikantně pouze enzymovou aktivitu CYP2C9, avšak v koncentracích pohybujících se v řádech stovek  $\mu\text{mol/l}$ . Navíc tato látka nepodléhá biotransformaci enzymy I. fáze metabolismu léčiv. Obě látky jsou také glukuronidovány *in vitro*. Olomoucín II vykazuje vyšší substrátovou afinitu k jaterním UGT, zatímco NGF1568 je především metabolizována střevními UGT. Mimo to se na metabolických přeměnách olomoucínu II *in vitro* podílí i SULT.

Odlišný způsob interakcí olomoucínu II a NGF1568 s výše uvedenými enzymovými systémy je zřejmě způsoben vazbou různých typů substituentů na základní purinový skelet testovaných cytokininových derivátů. Olomoucín II je strukturně velmi podobný roskovitinu (disponuje oproti roskovitinu navíc hydroxylovou skupinou na aromatickém zbytku), což odráží skutečnost, že obě látky interagují podobně především s CYP. Výsledky *in vitro* studie naznačují, že by použití zejména olomoucínu II v klinické praxi mohlo být spojeno s rizikem vzniku lékových interakcí na úrovni metabolismu léčiv.

## 7. ZÁVĚR

---

V této práci byly sledovány interakce potenciálních léčiv olomoucínu II a NGF1568 s významnými biotransformačními enzymy jak I., tak II. fáze metabolismu léčiv s cílem posoudit možný vliv těchto látek na metabolismus dalších léčiv a zhodnotit riziko vzniku lékových interakcí při zavedení těchto testovaných látek do klinické praxe. Zvolenými enzymy byly jak CYP (nejdůležitější enzymy biotransformace léčiv vůbec), tak UGT a SULT (nejvýznamnější enzymy II. fáze metabolismu léčiv)

Byly provedeny *in vitro* testy s preparáty lidských jaterních mikrosomů a rekombinantními enzymy exprimovanými v *E. coli* nebo hmyzích buňkách. Inhibiční vliv cytokininových derivátů na markerové aktivity jednotlivých CYP byl testován pomocí zavedených metod (s využitím chromatografické a spektrofotometrické detekce). V dalším kroku byl sledován metabolismus testovaných potenciálních léčiv jaterními mikrosomálními CYP, jaterními a střevními UGT a SULT.

Z výsledků jednotlivých experimentů vyplývají následující poznatky:

- Olomoucín II a NGF1568 vykazují potenciál interagovat s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450 ve smyslu inhibice jejich markerových aktivit.
- Olomoucín II inhibuje aktivitu CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 v relativně nízkých koncentracích ( $K_i$  50  $\mu$ M pro inhibici CYP1A2,  $K_i$  75  $\mu$ M pro inhibici CYP2C9 a  $K_i$  pohybující se v desítkách  $\mu$ mol/l pro inhibici CYP3A4), což indikuje relativně specifickou interakci této látky s uvedenými CYP. V případě ovlivnění enzymové aktivity CYP1A2 se olomoucín II chová jako inhibitor smíšeného typu, enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP3A4 inhibuje tato látka nekompetitivně.
- NGF1568 inhibuje významně pouze markerovou aktivitu CYP2C9 s  $K_i$  349  $\mu$ M a vystupuje vůči danému enzymu jako akompetitivní inhibitor.

- Olomoucín II je substrátem lidského jaterního mikrosomálního CYP3A4, který katalyzuje jeho 5'-hydroxylaci.
- Enzymy II. fáze biotransformace přispívají k metabolismu testovaných látek; jaterní UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6 a UGT2B7 a střevní UGT1A10 jsou odpovědné za glukuronidaci olomoucínu II; střevní UGT1A7, UGT1A8, UGT1A10 a jaterní UGT1A9 metabolizují NGF1568; olomoucín II je navíc substrátem jaterních cytosolických SULT.

Výsledky v předkládané dizertační práci naznačují, že obě látky reagují poměrně specificky s některými významnými enzymy metabolismu léčiv *in vitro*. Především v případě olomoucínu II by mělo být zvaženo možné riziko výskytu lékových interakcí na úrovni CYP a jaterních UGT při zavedení olomoucínu II do klinické praxe. Následně by měly být provedeny další zejména *in vivo* studie na modelech experimentálních zvířat studující podrobně metabolický profil a další farmakokinetické parametry příslušných cytokininových derivátů. Vhodné by bylo i sledování indukčního vlivu těchto látek na expresi nejdůležitějších enzymů participujících v metabolismu léčiv.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

---

CDK cyklin dependentní kinasy  
DNA deoxyribonukleová kyselina  
CYP cytochromy P450  
NGF neutrophil growth factor (růstový faktor neutrofilů)  
OH- hydroxylová funkční skupina  
NH<sub>2</sub>- aminoskupina  
SH- thiolová funkční skupina  
COOH- karboxylová funkční skupina  
UGT UDP-glukuronosyltransferasy  
SULT sulfottransferasy  
PAPS 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát  
UV-VIS záření v ultrafialové a viditelné oblasti  
NADPH nikotinamiadenindinukleotid fosfát redukovaný  
FAD flavinadenindinukleotid  
FMN flavinmononukleotid  
AhR receptor pro aromatické uhlovodíky  
PXR pregnanový X receptor  
CAR konstitutivní androstanový receptor  
TDM terapeutické monitorování léčiv  
INR international normalized ratio, vyjádření výsledku Quickova testu  
HPLC (high performance liquid chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) tandemové spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem  
MS (mass spectrometer) hmotnostní spektrometr  
ESI ionizace elektrosprejem  
NADP nikotinamidadenindinukleotid  
IC<sub>50</sub> Koncentrace inhibitoru, která vyvolá 50% inhibici aktivity daného enzymu  
K<sub>i</sub> Inhibiční konstanta

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

---

Obrázek 1. Bioaktivace cyklofosfamidů; hydroxylovaný metabolit se rozkládá na účinný fosforamid

Obrázek 2. Biotransformace diazepamů systémem cytochromu P450; vznikající metabolity jsou více či méně farmakologicky účinné jako parentní léčivo diazepam

Obrázek 3. Nejvýznamnější eliminační cesty běžně předepisovaných léčiv v USA (Zanger a spol., 2008)

Obrázek 4. Struktura hemu v CYP; pátým ligandem, který se váže na hemové železo je síra pocházející z cysteinu v aktivním místě enzymu.

Obrázek 5. Klasické schéma katalytického cyklu cytochromu P450 (překresleno dle [http://www.reactome.org/figures/p450\\_cat\\_cycle.JPG](http://www.reactome.org/figures/p450_cat_cycle.JPG))

Obrázek 6. Příklady biotransformačních reakcí léčiv katalyzovaných lidskými mikrosomálními jaterními CYP: a) epoxidace karbamazepinu, b) hydroxylace kumarinu, c) S-oxygenace omeprazolu, c) N-dealkylace kofeinu

Obrázek 7. Podíl jednotlivých CYP na metabolismu léčiv z hlediska kvantity přeměňovaných léčiv (Evans a Relling, 1999)

Obrázek 8. Podíl jednotlivých konjugačních enzymů na metabolismu léčiv z hlediska počtu přeměňovaných látek (UGT, UDP-glukuronosyltransferasy; ST, sulfotransferasy;

NAT, *N*-acetyltransferasy; GST, glutathion-*S*-transferasy; HMT, histamin-*N*-methyltransferasa; COMT, katech-ol-*O*-methyltransferasa; TPMT, thiopurinmethyltransferasa a) (Evans a Relling, 1999)

Obrázek 9. SULT participující v metabolismu xenobiotik a jejich poměrné zastoupení v různých tkáních lidského těla (Riches a spol., 2009)

Obrázek 10. Strukturní vzorce testovaných cytokininových derivátů, olomoucínu II a NGF1568

Obrázek 11. Ovlivnění enzymové aktivity vybraných CYP olomoucínem II v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400  $\mu\text{M}$  (čím tmavší barva sloupců, tím vyšší koncentrace testované látky, tj. rostoucí koncentrace olomoucínu II zleva doprava)

Obrázek 12. Detailnější pohled na ovlivnění enzymové aktivity CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 olomoucínem II

Obrázek 13. Dixonův výnos pro inhibici CYP1A2 olomoucínem II

Obrázek 14. Dixonův výnos pro inhibici CYP2C9 olomoucínem II

Obrázek 15. Dixonův výnos pro inhibici CYP3A4 olomoucínem II

Obrázek 16. Ovlivnění enzymové aktivity vybraných forem CYP látkou NGF1568 v koncentracích 0, 10, 50, 100, 150, 200, 400  $\mu\text{M}$  (čím tmavší barva sloupců, tím vyšší koncentrace testované látky, tj. rostoucí koncentrace NGF1568 zleva doprava)

Obrázek 17. Dixonův výnos pro inhibici CYP2C9 látkou NGF1568

Obrázek 18. Porovnání chromatogramu kontrolního vzorku (olomoucín II inkubovaný s jaterními mikrosomy a systémem generujícím NADPH) s chromatogramem vzorku, ve kterém byly lidské jaterní mikrosomální CYP vystaveny účinku oxidu uhelnatého před přidáním olomoucínu II

Obrázek 19. Porovnání chromatogramu kontrolního vzorku (olomoucín II inkubovaný s jaterními mikrosomy a systémem generujícím NADPH) s



chromatogramem vzorku, ve kterém byl navíc přítomen specifický inhibitor CYP3A4, ketokonazol.

Obrázek 20. Relativní příspěvek rekombinantních CYP k tvorbě metabolitu olomoucínu II

Obrázek 21. (a) Hmotnostní spektrum formovaného 2,5-dihydroxyroskovitínu ( $m/z$  387), (b) a (c) fragmentace kvasimolekulárního iontu 2,5-dihydroxyroskovitínu ( $m/z$  387) s dominujícími fragmentačními ionty ( $m/z$  265 a  $m/z$  193)

Obrázek 22. Hmotnostní spektrum glukuronidu olomoucínu II (kvasimolekulární ion  $m/z$  547) a fragmentace kvasimolekulárního iontu  $m/z$  547 na fragmenty  $m/z$  371 (kvasimolekulární ion olomoucínu II),  $m/z$  265 a  $m/z$  193

Obrázek 23. Hmotnostní spektrum glukuronidu NGF1568 (kvasimolekulární ion  $m/z$  614) a fragmentační spektrum kvasimolekulárního iontu ( $m/z$  614  $\rightarrow$   $m/z$  482,  $m/z$  438,  $m/z$  306)

Obrázek 24. Podíl rekombinantních UGT na glukuronidaci olomoucínu II a NGF1568

Obrázek 25. HPLC chromatogram kontrolního vzorku olomoucínu II a vzorku olomoucínu II inkubovaného s lidským jaterním cytosolem a PAPS; MS záznam inkubovaného vzorku obsahujícího nově vzniklý sulfát olomoucínu II ( $m/z$  449)

Tabulka 1. Rozdělení lidských cytochromů P450 dle typu jejich substrátů (Guengerich, 1995)

Tabulka 2. Množství celkového CYP ve vybraných lidských tkáních, jaterní tkáň obsahuje majoritní množství CYP (Hrycay a Bandiera, 2008)

Tabulka 3. Nejdůležitější CYP metabolizující léčiva, jejich tkáňová lokalizace a příklady substrátů jednotlivých CYP (podle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Ingelman-Sundberg, 2004; <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>, 2010)

Tabulka 4. UGT podílející se na biotransformaci léčiv, jejich hlavní tkáňová lokalizace a nejvýznamnější substráty (Tukey a Strassbourg, 2000; Fisher a spol., 2001; Cheng a spol., 1998 and Kiang a spol., 2005)

Tabulka 5. Příklady substrátů nejvýznamnějších SULT podílejících se na biotransformaci xenobiotik

Tabulka 6. Příklady různých typů inhibitorů jednotlivých cytochromů P450

Tabulka 7. Příklady popsaných klinicky významných lékových interakcí v důsledku inhibice CYP (Michalets, 1998)

Tabulka 8. Indukce lidských cytochromů P450 in vivo; příklady jednotlivých CYP, příklady jejich induktorů a receptorů zprostředkujících účinek induktoru

Tabulka 9. Příklady klinických lékových interakcí založených na indukci CYP (Michalets, 1998)

Tabulka 10. Jednotlivé CYP, jejich markerové substráty, reakce markerových substrátů katalyzované CYP a experimentálně stanovené hodnoty Michaelisovy konstanty ( $K_m$ )

Tabulka 11. Specifické inhibitory jednotlivých CYP a jejich koncentrace v reakční směsi

## 10. LITERATURA

---

Adjei AA, Gaedigk A, Simon SD, Weinshilboum RM, Leeder JS. (2008) Interindividual variability in acetaminophen sulfation by human fetal liver: implications for pharmacogenetic investigations of drug-induced birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82(3):155-65.

Anderson GD, Miller JW. (2002) Benzodiazepines: chemistry, biotransformation, and pharmacokinetics. V: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Peracca E, editors. *Antiepileptic drugs*, 5. vydání, Philadelphia, PA :Lippincott Williams& Wilkins, 187-205.

Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H. (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetics analysis. *Cancer Res* 60: 6921-6926.

Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH. (2003) Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 18:2409–2414.

Anzenbacher P, Anzenbacherová E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58:737-747.

Anzenbacherová E, Janalík J, Popa I, Strnad M, Anzenbacher P. (2005) Interaction of aromatic cytokinins with human liver microsomal cytochromes P450. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 49:349-51.

Arpiainen S, Raffalli-Mathieu F, Lang MA. (2005) Regulation of the Cyp2a5 gene involves an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway. *Mol Pharmacol* 67:1325–1333.

Asimus S, Elsherbiny D, Hai TN. (2007) Artemisinin antimalarials moderately affect cytochrome P450 enzyme activity in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol* 21:307–316.

Back DJ, Houlgrave R, Tjia JF. (1991) Effect of progestogens, gestodene, 3-keto desogestrel, levonorgestrel, norethisterone and norgestimate on the oxidation of ethinyloestradiol and other substrates by human liver microsomes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38: 219-225.

Backman JT, Granfors MT, Neuvonen PJ. (2006a) Rifampicin is only a weak inducer of CYP1A2-mediated presystemic and systemic metabolism: studies with tizanidine and caffeine. *Eur J Clin Pharmacol* 62:451–461.

Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE and Chenery RJ. (1995) Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* 25:261-270.

Baumann E. (1876) Ueber sulfosauren in harn. *Ber Dtsch Chem Ges* p. 54

Benowitz NL, Lesov-Schlaggar CN, Swan GE. (2006) Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 79:480–488.

Bernard O, Guillemette C. (2004) The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 32:775-778.

Bertz RJ, Granneman GR. (1997) Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 32:210-258.

Bian HS, Ngo SY, Tan W, Wong CH, Boelsterli UA, Tan TM. (2007) Induction of human sulfotransferase 1A3 (SULT1A3) by glucocorticoids. *Life Sci* 81: 1659-1657.

Bidstrup TB, Stilling N, Damkier P. (2004) Rifampicin seems to act as both an inducer and an inhibitor of the metabolism of repaglinide. *Eur J Clin Pharmacol* 60:109–114.

Benowitz NL, Peng M, Jacob P. (2003) Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 74:468–474.

Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR. (1991) Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9543–9547.

Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM, Coughtrie MW. (2004) A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 14:199–211.

Broly F, Libersa C, Lhermitte M. (1989) Effect of quinidine on the dextromethorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br J Clin Pharmacol* 28: 29-36.

Burchell B, Coughtrie MW. (1989) UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther.* 43(2):261-89.

Busby WF, Ackermann JM, Crespi CL. (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27: 246 -249.

Carroccio A, Wu D, Cederbaum AI. (1994) Ethanol increases content and activity of human cytochrome P4502E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 203:727–733.

Cederbaum AI. (2006) CYP2E1—biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* 73:657–672.

Cottam HB, Wasson DB, Shih HC, Raychaudhuri A, Di Pasquale G, Carson DA. (1993) New adenosine kinase inhibitors with oral antiinflammatory activity: synthesis and biological evaluation. *J Med Chem* 36:3424-30.

Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ. (1998a) Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. V: Phillips IR, Shepard EA, editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa NJ: Humana: 129-133.

Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ. (1998b) CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high performance liquid

chromatography with fluorescence detection. V: Phillips IR, Shepard EA, editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, NJ: Humana: 141-146.

Danielson P.B. (2002) The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Curr Drug Metab* 37: 561-597.

Depre M, Van Hecken A, Oeyen M. (2005) Effect of aprepitant on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. *Eur J Clin Pharmacol* 61:341–346.

Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE. (2001) A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 29(1):23-9.

Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA. (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44:911–917.

Donato MT, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. (2004) Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 32:699-706.

Draper AJ, Madan A, Parkinson A. (1997) Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 341: 47-61.

Eagling VA, Black DJ, Barry MG. (1997) Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol* 44: 190-194.

Eisenhofer G, Coughtrie MWH, Goldstein DS. (1999) Dopamine sulphate: an enigma resolved. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:S41–S53.

Elsherbiny DA, Asimus SA, Karlsson MO. (2008) A model based assessment of the CYP2B6 and CYP2C19 inductive properties by artemisinin antimalarials: implications for combination regimens. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 35(2):203-17.

Ernest CS, Hall SD, Jones DR. (2005) Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 583-591.

- Evans WE, Relling MV. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286:487-491.
- Faber MS, Jetter A, Fuhr U. (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97:125–134.
- Falany CN, Kerl EA. (1990) Sulfation of minoxidil by human liver phenol sulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 40: 1027-1032.
- Falany CHF. (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB Journal* 11:206-216.
- Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA. (2001) The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 33:273-297.
- Gaiser BK, Lockley DJ, Staines AG, Baarnhielm C, Burchell B. (2003) Alkylant glucuronidation in human liver and kidney microsomes: evidence for the involvement of UGT1A9 and 2B7. *Xenobiotica* 33: 1073-83.
- Ghazali RA, Waring RH. (1999) The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention. *Life Sci* 65: 1625-1632.
- Glatt H. (1997) Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *The FASEB Journal* 11: 314-321.
- Glatt HR, Boeing H, Engelke CHEH, Ma L, Kuhlow A, Pabel U, Pomplun D, Teubner W, Meinel W. (2001) Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Research* 482: 27-40.
- Glatt HR. (2001) Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129: 141-170.
- Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan S, Raucy JL, Lasker JM, Ghanayem BI. (1994) Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry*. 33(7):1743-52.

- Guillemette C. (2003) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics* 3: 136-158.
- Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation. *J Biol Chem* 261:5051-5060.
- Guengerich FP. (1990) Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. *Chem Res Toxicol* 3: 363-371.
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. (1991) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 4: 168-179.
- Guengerich FP. (1995) Human cytochrome P450 enzymes. V: *Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry*, 473–535, Ortiz de Montellano PR (ed.), Plenum, New York.
- Guengerich FP. (1995) Cytochrome P450 proteins and potential utilization in biodegradation. *Environ Health Perspect* 103: 25–28.
- Guengerich FP, Johnson WW. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* 36:14741–14750.
- Hanioka N, Hayashi K, Shimizudani T, Nagaoka K, Koeda A, Naito S, Narimatsu S. (2008) Stereoselective glucuronidation of propranolol in human and cynomolgus monkey liver microsomes: role of human hepatic UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A9, UGT2B4 and UGT2B7. *Pharmacology* 82: 293-303.
- Heinmark LD, Wienkers LL, Kunze K. (1992) The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 51: 398-407.
- Hempel N, Gamage N, Martin JL, McManus ME. (2007) Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *Int J Biochem Cell Biol* 39(4):685-9.
- Hollenberg PF. (2002) Characteristics and common properties of inhibitors, inducers and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* 34: 17-35.



Hrycay EG, Bandiera SM. (2008) Cytochrome P450 Enzymes. V: *Preclinical development handbook. ADME and biopharmaceutical properties*, Gad SC (ed) Wiley, New York.

Hu Y, Mishin V, Johansson I. (1994) Chlromethiazole as an efficient inhibitor of cytochrome P450 2E1 expression in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1286-1291.

Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. (1993) Differential activation of cyclophosphamide and ifosphamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 53(23):5629-37.

Chang TK, Gonzales FJ, Waxman DJ. (1994) Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* 311: 437-442.

Chang TKH, Waxman DJ. (1998) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as a substrate. V: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, NJ: Humana: 103-122.

Chang TK, Waxman DJ. (2006) Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab Rev* 38:51-73.

Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA. (1998) Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26: 1-4.

Cheng Z, Radominska-Pandya A, Tephly TR. (1998) Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys* 356: 301-305.

Cheng Z, Radominska-Pandya A, Tephly TR. (1999) Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos* 27, 1165-1170.

- Chien JY, Peter RM, Nolan CM. (1997) Influence of polymorphic N-acetyltransferase phenotype on the inhibition and induction of acetaminophen bioactivation with long-term isoniazid. *Clin Pharmacol Ther* 61:24–34.
- Ingelman-Sundberg M. (2004) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:89-104.
- Ingelman-Sundberg M. (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics* 5:6-13.
- Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T. (2002) UGT1A1\* 28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics* 2: 43-47.
- Kay L, Kampmann JP, Svendsen TL. (1985) Influence of rifampicin and isoniazid on the kinetics of phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 20:323–326.
- Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys* 464:207–212.
- Kharasch ED, Mitchell D, Coles R. (2008) Rapid clinical induction of hepatic cytochrome P4502B6 (CYP2B6) activity by ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 52(5):1663-9.
- Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106(1):97-132.
- King RS, Ghosh AA, Wu J. (2006) Inhibition of human phenol and estrogen sulfotransferase by certain non-steroidal anti-inflammatory agents. *Curr Drug Metab* 7:745-753.
- Kivistö KT, Neuvonen PJ, Klotz U. (1994) Inhibition of terfenadine metabolism. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Clin Pharmacokinet* 27(1):1-5.

- Ko JW, Sukhova N, Thacker D. (1997) Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 25: 853-862.
- Kohno Y, Sei Y, Koshiha M, Kim HO, Jacobson KA. (1996) Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 219:904-10.
- Kotyk A, Horák J. (1977) Enzymová kinetika. 1. vydání, Praha, Academia.
- Krystof V, Lenobel R, Havlicek L, Kuzma M a Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett* 12:3283-3286.
- Krystof V, McNae IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Müller P, Vojtesek B, Orság M, Havlíček L, Strnad M. (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* 62:1763-71.
- Kunze KL, Trager WF. (1993) Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem Res Toxicol* 6: 649-656.
- Kunze KL, Wienkers LC, Thummel KE. (1996) Warfarin – fluconazole. I. Inhibition of the human cytochrome P450 – dependent metabolism of warfarin by fluconazole: in vitro studies. *Drug Metab Dispos* 24: 414 – 421.
- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P. (2004) Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 43:741–762.
- Kwon CHH. (1999) Metabolism – based anticancer drug design. *Arch Pharm Res* 22:533-541.
- Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB. (2002) Amidoquine clearance and its metabolism to N-desethylamidoquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme – specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 399-407.
- Lin JH, Lu AY. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 35: 361-390.

- Lin JH, Wong BK. (2002) Complexities of glucuronidation affecting in vitro-in vivo extrapolation. *Curr Drug Metab* 3: 623-646.
- Lindsay J, Wang LL, Li Y, Zhou SF. (2008) Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab* 9(2):99-105.
- McClue SJ, Stuart I. (2008) Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine) in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* 36:561-70.
- Michalets EL. (1998) Update: clinically significant cytochromes P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 18: 84 – 112.
- Michalets EL, Williams CR. (2000) Drug interactions with cisapride: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 39(1):49-75.
- Miki Y, Suzuki T, Tazawa C. (2005) Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol* 231:75–85.
- Miners JO, Mackenzie PI. (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 51(3):347-69.
- Mouly S, Lown KS, Kornhauser D. (2002) Hepatic but not intestinal CYP3A4 displays dose-dependent induction by efavirenz in humans. *Clin Pharmacol Ther* 72:1–9.
- Munzel PA, Schmohl S, Heel H, Kalberer K, Bock-Hennig BS, Bock KW. (1999) Induction of human UDP-glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9 and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 27: 569-573.
- Murray GI, McKay JA, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. (1993) Cytochrome P450 expression is a common molecular event in soft tissue sarcomas. *J Pathol* 171(1):49-52.

- Nagar S, Walther S, Blanchard RL. (2006) Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphic variants \*1, \*2, and \*3 are associated with altered enzymatic activity, cellular phenotype, and protein degradation. *Mol Pharmacol* 69: 2084-2092.
- Nekvindová J, Mašek V, Veinlichová A, Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Zídek Z, Holý A. (2006) Inhibition of human liver microsomal cytochrome P450 activities by adefovir and tenofovir. *Xenobiotica* 36:1165-1177.
- Newton DJ, Wang RW, Lu AY. (1995) Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 23:154-8.
- Nguyen LP, Bradfield CA. (2008) The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21:102–116.
- Nishimura M, Naito S, Yokoi T. (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:135–149.
- Niwa T, Shiraga T, Takagi A. (2005) Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19 and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull* 28: 1805-1808.
- Parkinson A. (2005) Chapter 6. Biotransformation – Metabolism of Xenobiotics, V: *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*, 2. vydání, (ed) Ming-Ho Yu, CRC Press.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82:667-715.
- Plant N. (2007) The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. *Biochim Biophys Acta* 1770:478–488.
- Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI. (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 31(4):817-99.

- Rendić S, Ruf HH, Weber P, Kajfez F. (1984) Cimetidine and ranitidine: their interaction with human and pig liver microsomes and with purified cytochrome P-450. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 9(3):195-200.
- Riedmaier S, Klein K, Hofmann U, Keskitalo JE, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M, Zanger UM . (2010) UDP-glucuronosyltransferase (UGT) polymorfism affect atorvastatin lactonization in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 87: 65-73.
- Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, Coughtrie MWH. (2009) Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT “Pie“. *Methods Mol Biol* 640:309-26.
- Ritter JK. (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129(1-2):171-93.
- Rivera SP, Saarikoski ST, Hankinson O. (2002) Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 61:255–259.
- Runge-Morris M, Kocarek TA. (2005) Regulation of sulfotransferases by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab* 6: 299-307.
- Rypka M, Veselý J, Chmela Z, Riegrová D, Cervenková K, Havlíček L, Lemr K, Hanus J, Cerný B, Lukes J, Michalíková K. (2002) In vitro biotransformation of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemin by mouse liver microsomes. *Xenobiotica*. 32(11):1017-31.
- Sabolovic N, Magdalou J, Netter P, Abid A. (2000) Nonsteroidal anti – inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6, UGT1A3 and 2B7. *Life Sci* 67: 185-196.
- Segel IH. (1975) Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley Classics Library Edition, USA.
- Senggunprai L, Yoshinari K, Yamazoe Y. (2009) Selective role of sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) in the N-sulfoconjugation of quinolone drugs in humans. *Drug Metab Dispos* 37(8):1711-7.

- Sesardic D, Pasanen M, Pelkonen O. (1990) Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis* 11: 1183-1188.
- Schmider J, Greenblatt DJ, Fogelman SM. (1997) Metabolism of dextromethorphan in vitro: involvement of cytochromes P450 2D6 and 3A3/4, with a possible role of 2E1. *Biopharm Drug Dispos* 1: 227-240.
- Soars MG, Petullo DM, Eckstein JA, Kasper SC, Wrighton SA. (2004) An assessment of UDP-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 32: 140-148.
- Song BJ, Veech RL, Park SS. (1989) Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem* 264:3568-3572.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I. (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274:6043-6046.
- Sugatani J, Yamakawa K, Tonda E, Nishitani S, Yoshinari K, Degawa M. (2004) The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 67: 989-1000.
- Suzuki H, Kneller BK, Haining RL, Trager WF, and Rettie AE. (2002) (+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19. *Drug Metab Dispos* 30: 235-239.
- Svensson US, Ashton M, Trinh NH. (1998) Artemisinin induces omeprazole metabolism in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 64:160-167.
- Tassaneeyakul W, Veronese ME, Birkett DJ, Miners JO. (1993) High-performance liquid chromatographic assay for 4-nitrophenol hydroxylation, putative cytochrome P450 2E1 activity, in human liver microsomes. *J Chromatogr* 616(1):73-78.

Teubner W, Meinel W, Florian S, Kretzschmar M, Glatt H. (2007) Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem J* 404(2):207-15.

Thomas NL and Coughtrie MW. (2003) Sulfation of apomorphine by human sulfotransferases: evidence of a major role for the polymorphic phenol sulfotransferase, SULT1A1. *Xenobiotica* 33:1139–1148.

Timsit YE, Negishi M. (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72:231–246.

Tukey RH, Strassburg CP. (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:581-616.

Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O. (2006) The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr Drug Metab* 7: 705-714.

Veinlichova A, Jancova P, Siller M, Anzenbacher P, Kuca K, Jun D, Fusek J, Anzenbacherova E. (2009) Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K-48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 in vitro. *Chem Biol Interact* 180(3):449-53.

Vickers AE, Sinclair JR, Zollinger M. (1999) Multiple cytochrome P-450s involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 27: 1029-1038.

Waldon DJ, Buhl AE, Baker CA, Johnson GA. (1989) Is minoxidil sulfate the active metabolite for hair growth? *J Invest Dermatol* 992:538-545.

Wang LQ, James MO. (2006) Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr Drug Metab* 7: 83-104.

Waxman DJ, Chang TKH. (1998) Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. V: Phillips IR, Shepard EA, editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, NJ: Humana: 111-116.



Wesierska-Gadek J, Schmid G. (2006) Dual action of the inhibitors of cyclin-dependent kinases: targeting of the cell-cycle progression and activation of wild-type p53 protein. *Expert Opin Investig Drugs* 2006 15(1):23-38.

Welker HA, Wiltshire H, Bullingham R. (1998) Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet* 35(6):405-23.

Wen X, Wang JS, Backman JT. (2002) Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metab Dispos* 30: 631-635.

Yasuda S, Suiko M, Liu MC. (2005) Oral contraceptives as substrates and inhibitors for human cytosolic SULTs. *J Biochem* 137(3):401-6.

Yasuda S, Idell S, Fu J, Carter G, Snow R, Liu MC. (2007) Cigarette smoke toxicants as substrates and inhibitors for human cytosolic SULTs. *Toxicol Appl Pharmacol* 221(1):13-20.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392: 1093-1108.

Zhang H, Varlamova O, Vargas FM, Falany CN, Leyh TS. (1998) Sulfuryltransfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase. *J Biol Chem* 273: 10888-10892.

<http://www.medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/> červen 2010

[http://www.reactome.org/figures/p450\\_cat\\_cycle.JPG](http://www.reactome.org/figures/p450_cat_cycle.JPG) , červen 2010

<http://www.cypex.co.uk/intro.htm>, duben 2008

<http://www.promega.com/applications/cellularanalysis/admetox.htm>

## 11. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

---

1)Práce související s disertační prací

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uvěřejněné v časopisech s IF

Šiller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Doležal K, Popa I, Strnad M. (2009) Interactions of olomoucine II with human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 37(6):1198-1202. IF = 3.743

Šiller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Doležal K, Popa I, Strnad M. In vitro interaction of a novel neutrophil growth factor with human liver microsomal cytochromes P450 and contribution of UDP-glucuronosyltransferases to its metabolism. (odesláno)

Publikovaná abstrakta

Šiller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Strnad M. (2008) Interaction of selected inhibitors of cyclin dependent kinases with human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Reviews* 40, supplement 1: 71-72.

Šiller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E a Strnad M (2008) Interaction of inhibitors of cyclin dependent kinases with human liver microsomal cytochromes P450. *Interdisciplinary toxicology* 1(1):110-111.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Popa I, Strnad M (2009) Interactions of olomoucine II with main drug-metabolizing enzymes of human liver microsomal fraction. *Toxicology Letters* 189S:108.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Strnad M. (2010) Evaluation of clinical relevance of drug interactions based on metabolism: Comparison of two CDK inhibitors tested. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology* 107, supplement 1: 580.

Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Strnad M. (2007) Interactions of inhibitors of cyclin dependent kinases with cytochromes P450. *Seminář záměru (MŠM 6198959216)*, Karlov pod Pradědem, květen 2007.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Strnad M. (2008) Interaction of selected inhibitors of cyclin dependent kinases with human liver microsomal cytochromes P450. *10th ISSX European Regional Meeting*, Vídeň, 18.5.2008-21.5.2008.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E a Strnad M (2008) Interaction of inhibitors of cyclin dependent kinases with human liver microsomal cytochromes P450. *13th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2008)*, Trenčianské Teplice, 27.5.2008-30.5.2008.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E a Strnad M (2008) Interaction of olomoucine II with human liver microsomal cytochromes P450. *Seminář záměru (MŠM 6198959216)*, Karlov pod Pradědem, 22.5.-24.5.2008.

Siller M, Anzenbacher A, Anzenbacherova E, Dolezal K, Popa I, Strnad M. (2009) Interactions of olomoucine II and “1568“ with human liver drug-metabolizing enzymes. *Seminář záměru (MŠM 6198959216)*, Hustopeče u Brna, 24.-26.5.2009.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Popa, I Strnad M. (2009) Interakce olomoucínu II s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450. *Konference vědeckých prací studentů DSP*. 8.-9. září 2009, Olomouc, LF UP.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Popa I, Strnad M (2009) Interactions of olomoucine II with main drug-metabolizing enzymes of human liver microsomal fraction. *Eurotox 2009*, Dresden, Německo, 13.-16.9.2010.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Popa I, Strnad M. (2009) In vitro study on interactions of CDK inhibitor “1568“with human liver drug-metabolizing enzymes. *XXV. Xenobiochemické symposium*, Mikulov, 22.-25.9.2009.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Popa I, Strnad M. (2010) Interactions of olomoucine II and “1568“ with human liver drug-metabolizing enzymes. *Seminář záměru (MŠM 6198959216)*, Vılanec u Jihlavy, 24.-26.5.2010.

Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Dolezal K, Strnad M. (2010) Evaluation of clinical relevance of drug interactions based on metabolism: Comparison of two CDK inhibitors tested. *WorldPharma 2010*, Copenhagen, Dánsko, 17.-23.7.2010.

Publikace týkající se metabolismu léčiv (cytochromy P450 a UDP-glukuronosyltransferasy)

a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uvěřněné v časopisech s IF

Matal J, Jancova P, Siller M, Masek V, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. (2008) Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. *Neuro Endocrinol Lett* 29(5):738-43. IF = 1,047

Matal J, Tunková A, Siller M, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. (2009) Isolation of two cytochrome P450 forms, CYP2A19 and CYP1A, from pig liver microsomes. *J Vet Pharmacol Ther* 32(5):470-6. IF=1,408

Veinlichova A, Jancova P, Siller M, Anzenbacher P, Kuca K, Jun D, Fusek J, Anzenbacherova E. (2009) Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K-48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 in vitro. *Chem Biol Interact* 180(3):449-53. IF=2,457

Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Křen V, Anzenbacher A, Šimánek V. (2010) Evidence for differences in regioselective and stereoselective glucuronidation of silybin diastereomers from milk thistle (*Silybum marianum*) by human UDP glucuronosyltransferases. (v recenzním řízení, *Ethnopharmacology*)

#### Ostatní publikace

Šiller M, Lipš M, Urbánek K. (2010) Stanovení plazmatických koncentrací imipenemu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. *Klin Farmakol Farm* 24(3) říjen 2010.