

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vliv potenciálních antimikrobiálních léčiv na enzymovou  
aktivitu jaterního mikrosomálního systému  
cytochromů P450**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Zuzana Horáčková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Alena Špičáková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Zuzana Horáčková
Název práce	Vliv potenciálních antimikrobiálních léčiv na enzymovou aktivitu jaterního mikrosomálního systému cytochromů P450
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Alena Špičáková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Diplomová práce se věnuje studiu inhibičního vlivu dvou potenciálních léčiv s antimikrobiálním účinkem (dvoujaderné koordinační sloučeniny mědi s dikarboxylovými kyselinami a <i>N</i> donorovými ligandy) na aktivitu nejvýznamnějších cytochromů P450 v metabolismu léčiv. Studium inhibice aktivity cytochromů P450 je prováděno v rámci preklinického testování léčiv za účelem odhalení hrozících lékových interakcí. <i>In vitro</i> experimenty byly prováděny na prasečích i lidských jaterních mikrosomech pomocí metod založených na enzymových esejích a HPLC s fluorescenční a UV-VIS detekcí. U obou studovaných komplexů byl prokázán inhibiční účinek na lidské enzymy CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5 (a jejich prasečí orthology CYP1A2, CYP2D25 a CYP3A29/39). Podle provedených experimentů není prasečí CYP2C33 vhodným modelem pro studium lidského CYP2C9. Inhibiční vliv testovaných komplexů na aktivitu těchto enzymů může znamenat riziko vážných lékových interakcí při systémovém podání s jinými léčivy metabolizovanými těmito cytochromy. Na základě výsledků se domníváme, že by testované komplexy mohly sloužit spíše k lokálnímu ošetření.</p>
Klíčová slova	Cytochromy P450, enzymová aktivita, inhibice, lékové interakce, antimikrobiální léčiva, koordinační sloučeniny mědi
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Zuzana Horáčková
Title of thesis	Effect of potential antimicrobial drugs on enzyme activity of liver microsomal system of cytochromes P450
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Alena Špičáková, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>The diploma thesis is focused on the study of the inhibitory effect of two potential drugs with an antimicrobial effect (dinuclear copper coordination compounds with dicarboxylic acids and <i>N</i> donor ligands) on the activity of the most important cytochromes P450 in drug metabolism. The study of inhibition of cytochrome P450 activity is carried out as part of preclinical drug testing in order to detect potential drug interactions. <i>In vitro</i> experiments were performed on porcine and human liver microsomes using methods based on enzyme assays and HPLC with fluorescence and UV-VIS detection. An inhibitory effect on human CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4/5 enzymes (and their porcine orthologs CYP1A2, CYP2D25 and CYP3A29/39) was established for both studied complexes. According to the performed experiments, porcine CYP2C33 is not a suitable model for studying human CYP2C9. The inhibitory effect of the tested complexes on the activity of these enzymes may mean the risk of serious drug interactions during systemic administration with other drugs metabolized by these cytochromes. Based on the results, we believe that the tested complexes could be used more for local treatment.</p>
Keywords	Cytochromes P450, enzyme activity, inhibition, drug interactions, antimicrobial drugs, copper coordination compounds
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Aleny Špičákové, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

### **Poděkování**

Mé poděkování patří Mgr. Aleně Špičákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a milý a vstřícný přístup, se kterým mě provázela při řešení i konečném zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi DrSc. za odborné konzultace a rady, které mi trpělivě věnoval a celému kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě děkuji prof. RNDr. Pavlu Kopelovi, Ph.D. z Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí látek ke studiu (komplexů K5 a K6).

## OBSAH

Seznam zkratk a symbolů.....	7
<b>1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Cytochromy P450.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Struktura cytochromu P450.....	10
2.1.2 Cytochromy P450 v metabolismu xenobiotik.....	11
2.1.2.1 Katalytický cyklus.....	14
2.1.3 Rodiny cytochromů P450.....	15
2.1.3.1 Rodina CYP1.....	17
2.1.3.2 Rodina CYP2.....	18
2.1.3.3 Rodina CYP3.....	21
2.1.4 Studium enzymové aktivity cytochromů P450.....	23
2.1.4.1 HPLC.....	23
2.1.4.2 Prase jako experimentální model pro studium CYP.....	24
<b>2.2 Lékové interakce.....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Indukce.....	27
2.2.2 Inhibice.....	28
2.2.2.1 Časově závislá inhibice a inhibice založená na mechanismu.....	30
<b>2.3 Antimikrobiální léčiva.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Komplexní sloučeniny mědi.....	32
2.3.2 Interakce antimikrobiálních léčiv a mědi s cytochromy P450.....	34
<b>3 MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Chemikálie.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Přístrojové vybavení.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Experimentální metody.....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Izolace mikrosomální frakce z prasečích jater.....	39
3.3.2 Stanovení koncentrace cytochromů P450 v izolované mikrosomální frakci.....	39
3.3.3 Stanovení celkové koncentrace proteinů v izolované mikrosomální frakci.....	40
3.3.4 Stanovení aktivity izolované mikrosomální frakce ( $K_m$ , $v_{max}$ ).....	40
3.3.5 Měření vazebného spektra komplexů K5 a K6.....	41
3.3.6 Vliv testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu cytochromů P450.....	41
<b>4 VÝSLEDKY.....</b>	<b>47</b>
4.1 Izolace a charakterizace prasečí mikrosomální frakce.....	47
4.2 Vliv testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu cytochromů P450.....	50
4.3 Ověření specifity použitých prasečích mikrosomů.....	59
<b>5 DISKUZE.....</b>	<b>61</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>65</b>
Seznam obrázků.....	67
Seznam tabulek.....	69
Seznam literatury.....	70

## Seznam zkratk a symbolů

AhR	Aryl hydrokarbonový receptor
AMR	Antimikrobiální rezistence
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
$c_{P450}$	Koncentrace cytochromu P450
$c_{prot}$	Koncentrace proteinů
CYP, P450	Cytochrom P450
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z anglického Food and Drug Administration)
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC <sub>50</sub>	Poloviční maximální inhibiční koncentrace
IDH	Isocitrátdehydrogenáza
ISO	Isocitrát
K5	Studovaný komplex $[Cu_2(pmdien)_2(H_2O)_2(\mu-fu)](ClO_4)_2$
K6	Studovaný komplex $[Cu_2(pmdien)_2(H_2O)_2(\mu-dtdp)](ClO_4)_2$
K <sub>d</sub>	Vazebná konstanta
K <sub>i</sub>	Inhibiční konstanta
K <sub>m</sub>	Michaelisova konstanta
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová RNA
NADP	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát
PPAR	Receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
PXR	Pregnanový X receptor
ROS	Reaktivní formy kyslíku
S–H	Substrát
S–OH	Hydroxylovaný substrát
TDI	Časově závislá inhibice (z anglického time dependent inhibition)
$v_{max}$	Maximální rychlost reakce

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Současným světovým alarmujícím problémem pro zdravotnictví je snižování účinnosti antibiotik při léčbě bakteriálních infekcí. Stále častěji dochází k rozvoji rezistentních bakteriálních kmenů, které způsobují vážné život ohrožující infekce. Vývoj nových antibiotik je velmi finančně i časově náročný, často se brzy od zahájení užívání objeví rezistence, a proto je dnes téměř zastaven. Část vědeckého světa se vydala cestou vývoje možných alternativních léčiv (například léčiva na bázi mědi), které by mohly podpořit, či v některých případech nahradit, dosud nezastupitelnou roli antibiotik.

Jednou z možných cest se ukázaly komplexní koordinační sloučeniny mědi, u kterých byly zjištěny četné biologické účinky včetně antimikrobiální aktivity. V rámci této diplomové práce byly testovány dvě koordinační sloučeniny mědi s dikarboxylovými kyselinami a *N* donorovými ligandy. Konkrétně se jednalo o komplexy K5, kde je můstkovým ligandem anion kyseliny fumarové; a komplex K6, u kterého je přítomen anion kyseliny dithiodipropionové, u kterých byla prokázána antimikrobiální aktivita vůči bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* a s nižší účinností pak i u *Escherichia coli*.

Každé nově vyvinuté potenciální léčivo musí v rámci preklinických studií projít celou řadou farmakologických a toxikologických testů. Jedním z nich je testování farmakokinetiky, včetně vlivu potenciálního léčiva na aktivitu jaterních cytochromů P450 (CYP). CYP jsou jaterní enzymy zapojené do první fáze metabolismu xenobiotik. Pokud xenobiotikum způsobuje inhibici některého z CYP, může dojít až ke zvýšení hladiny léčiva, kdy hrozí nežádoucí až toxické účinky dané látky a selhání terapie.

Cílem předložené diplomové práce bylo 1) sepsat literární rešerši shrnující dosavadní znalosti v řešené problematice – cytochromy P450, lékové interakce a antimikrobiální léčiva a 2) v experimentální části diplomové práce se zaměřit na izolaci a charakterizaci směsné prasečí jaterní mikrosomální frakce a studovat inhibiční vliv testovaných komplexů K5 a K6 na vybrané nejdůležitější cytochromy P450 účastníci se metabolismu léčiv. Konkrétní experimentální postupy byly orientovány na *in vitro* studium vlivu testovaných komplexů na enzymovou aktivitu CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5 (orthologické CYP1A2, CYP2C33, CYP2D25, CYP3A29/39 u námi využívaného prasečího modelu) v jaterních mikrosomech. Experimenty byly provedeny s cílem stanovení hodnot  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , typu inhibice a časové závislosti testovaných komplexů K5 a K6 u studovaných prasečích CYP pomocí metod založených na HPLC s UV-VIS a fluorescenční detekcí. Dále bylo cílem 3) provést ověření inhibice na lidských mikrosomech a ověření specifity použitého experimentálního modelu – prasečích mikrosomů – pomocí specifických inhibitorů lidských forem enzymů.



# **Teoretická část**

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Cytochromy P450

Cytochrom P450 (CYP) je označení pro superrodinu hemoproteinových enzymů. Z biologického hlediska se jedná o enzymy proteinové povahy vázané v membráně endoplazmatického retikula, kde se účastní detoxifikace organismu, buněčného metabolismu a udržování stálého vnitřního prostředí organismu, tedy homeostázy (Ortiz de Montellano, 2015).

Enzymy CYP se vyskytují u živočichů, rostlin, hub i bakterií. U živočichů, zejména u savců, se CYP vyskytují hlavně v játrech a tenkém střevě. V nižších koncentracích je lze nalézt mj. i v kůře nadledvin, mozku, varlatech, vaječnicích, placentě a prsní tkáni. Ve všech těchto tkáních a orgánech se CYP podílejí, kromě detoxifikace xenobiotik, také na metabolismu vitaminů, oxidaci nenasycených mastných kyselin nebo například biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin (Omara, 1999, Hasler *et al.*, 1999).

Superrodina enzymů CYP má svůj vlastní klasifikační systém a názvosloví. Samotné enzymy jsou členěny podle podobnosti primární struktury do rodin a podrodin. Rodiny enzymů se značí arabskými číslicemi (CYP1, CYP2, CYP3...). Podrodiny jsou značeny písmenem (CYP1A...) a poslední arabská číslice v označení enzymu pak určuje samotný protein (CYP1A1) (Nelson *et al.*, 1996). V současné době bylo u lidí popsáno 18 rodin a 44 podrodin. Enzymy ve stejné rodině vykazují 40% homologii ve složení aminokyselinového řetězce, zatímco cytochromy P450 patřící do stejné podrodiny dokonce 55% podobnost ve složení aminokyselin (Guengerich, 2008, Zanger *et Schwab*, 2013).

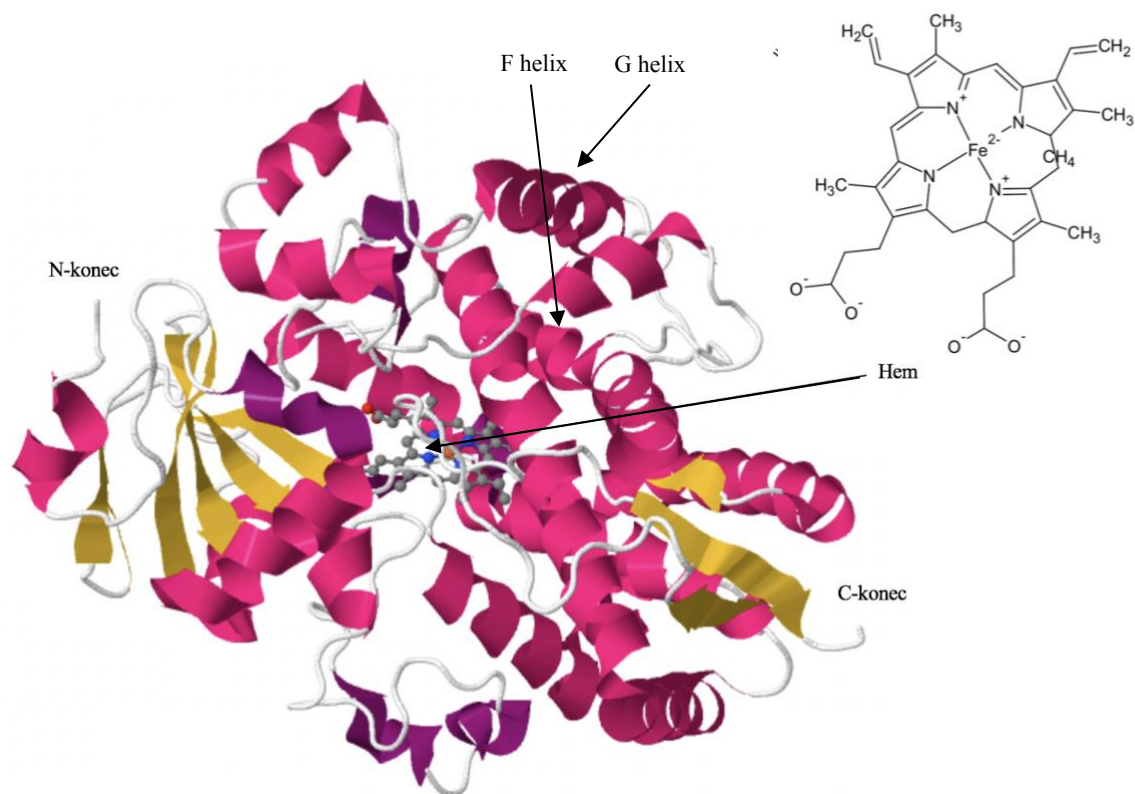
#### 2.1.1 Struktura cytochromu P450

Cytochromy P450 obsahují ve své struktuře asi 400–500 aminokyselin a hemovou prostetickou skupinu vytvářející aktivní místo enzymu (Hill *et al.*, 1970). V současné době je známo 104 různých strukturních motivů CYP (Nelson *et al.*, 1996). Označení P450 si CYP vysloužily díky svým spektrálním schopnostem, kdy hemové železo v redukovaném stavu po předchozí vazbě oxidu uhelnatého, vykazuje absorpční maximum právě při vlnové délce 450 nm (Omura, 1999; Robert *et. al.*, 2010).

Hem tvoří prostetickou skupinu v aktivním místě všech enzymů CYP. Železo (centrální atom hemu) je vázáno v charakteristické sekvenci aminokyselinového řetězce odpovídající peptidu FxxGx(H/R)xCxG. Terciální struktura CYP zahrnuje dvanáct alfa-šroubovic a čtyři beta-struktury. Peptidy v blízkosti hemu vykazují nejvyšší stupeň konzervovanosti. Nejvíce konzervované jsou zejména helixy I a L, které jsou navázány přímo na hem (Cryle *et Schlichting*, 2008). Stěžejní roli ve vazbě iontu železa ve struktuře CYP představují thiolové –SH skupiny cysteinu. Právě thiolová skupina, respektive její ionizovaná forma, umožňuje změnu elektronové

hustoty v katalytickém cyklu přeměny substrátu, a slouží k aktivaci molekulárního kyslíku (Hasler *et al.*, 1999).

Význačnou vlastností enzymů rodin CYP podílejících se na metabolismu léčiv je schopnost konformační změny aktivního místa, tedy přizpůsobení se tvaru a velikosti substrátu. Většina substrátů se váže do oblasti helixů F a G. Toto místo je zodpovědné za substrátovou specifitu daných enzymů CYP (Cryle *et Schlichting*, 2008).



Obrázek 1 – Krystalová struktura lidského cytochromu CYP3A4 a chemická struktura hemu (upraveno podle Sevrioukova *et Poulos*, 2013; Loew *et Harris*, 2000)

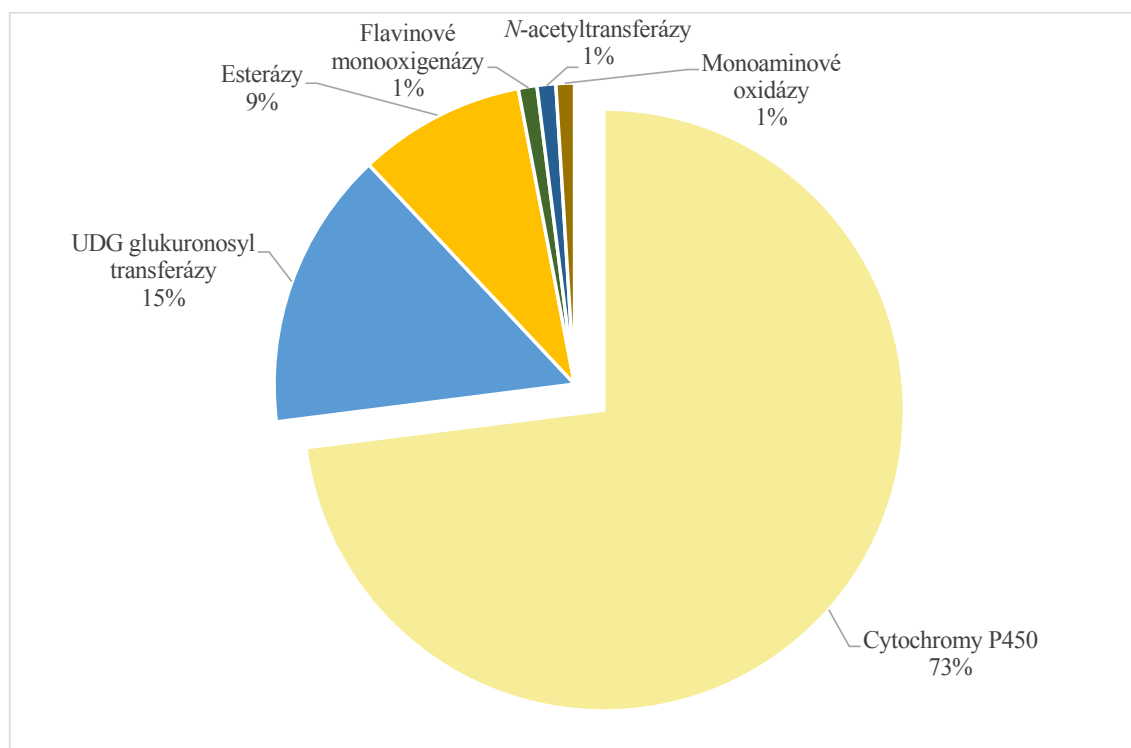
Struktura je barevně odlišena podle sekundární struktury proteinu – alfa-helixy jsou znázorněny růžově, beta-skládané listy jsou vyznačeny žlutě. Centrální část CYP a zároveň aktivní místo enzymu je tvořeno hemem a jeho okolím (Guengerich, 2015).

### 2.1.2 Cytochromy P450 v metabolismu xenobiotik

Cizorodé látky, jako léky, chemikálie nebo třeba polutanty, jež se dostávají do lidského organismu, jsou označovány souhrnným pojmem xenobiotika. Metabolismus xenobiotik v organismu lze rozdělit do dvou fází. V první fázi se uplatňují reakce, kterými jsou do molekul léčiv zaváděny reaktivní nebo polární skupiny, jako jsou hydroxy-, karboxy-, amino- a thio-skupiny nejčastěji prostřednictvím cytochromů P450. Ve druhé fázi pak dochází ke konjugaci modifikovaných léčiv s endogenními sloučeninami. Reakce druhé fáze jsou katalyzovány

enzymy třídy transferáz, konkrétně uridindifosfát-glukuronosyltransferázami, sulfotransferázami nebo glutation *S*-transferázami (Jancova *et al.*, 2010, Testa *et al.*, 2012).

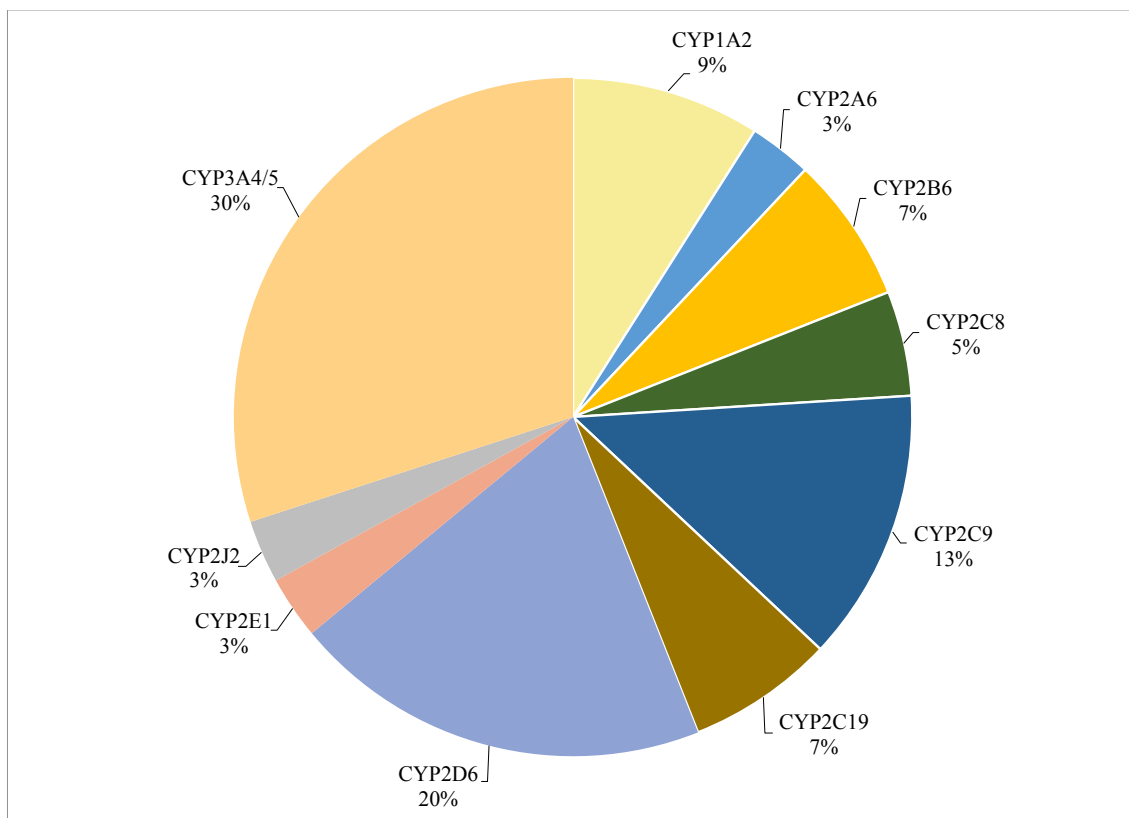
Hlavním cílem metabolismu léčiv je přeměna molekuly léčiva do hydrofilní podoby, která je snáze vyloučena z organismu (Yun *et al.*, 1995, Jancova *et al.*, 2010, Rendic *et Guengerich*, 2015). Většina léčiv je reakcemi s CYP inaktivována, avšak existují i léčiva, tzv. proléčiva (prodrugs), která do organismu vstupují v inaktivovaném stavu a do aktivního stavu jsou konvertována enzymy CYP (Huttunen *et al.*, 2008). Příkladem léčiva, které je prostřednictvím CYP konvertováno do formy aktivního léčiva je tamoxifen (Baldwin *et al.*, 2003).



Obrázek 2 – Enzymy podílející se na metabolismu léčiv v lidském organismu (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021)

Lidské cytochromy P450 se účastní první fáze metabolismu léčiv. Zde působí jako monooxygenázy uložené zejména v endoplazmatickém retikulu (mnohem méně i v cytosolu a mitochondriích buněk) kde se účastní až 90 % reakcí metabolizujících léčiva (de Groot *et al.*, 2004, Bhattacharyya *et al.*, 2014).

Za nejvýznamnější lidské cytochromy P450 metabolizující léčiva jsou považovány rodiny CYP1, 2 a 3. Podílejí se na metabolismu asi 80 % všech dosud známých léčiv (Guengerich, 2015). Mezi nejvýznamnější enzymy patří konkrétně tyto formy: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A5. Nejdůležitějšími z nich jsou CYP3A4 a CYP2D6, které zprostředkovávají metabolismus více než 50 % používaných léčiv (Zanger *et Schwab*, 2013).



Obrázek 3 – Zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v metabolismu léčiv (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021; Zanger *et Schwab*, 2013)

Existují tisíce chemikálií, které mohou být v organismu metabolizované prostřednictvím cytochromů P450 (Hasler *et al.*, 1999). Vybrané CYP a jejich substráty související s metabolismem léčiv jsou shrnuty v Tab. 1.

Tabulka 1 – Nejdůležitější cytochromy P450 metabolizující léčiva a příklady jejich substrátů (upraveno podle Tornio *et Backman*, 2018; Švihovec *et al.*, 2018)

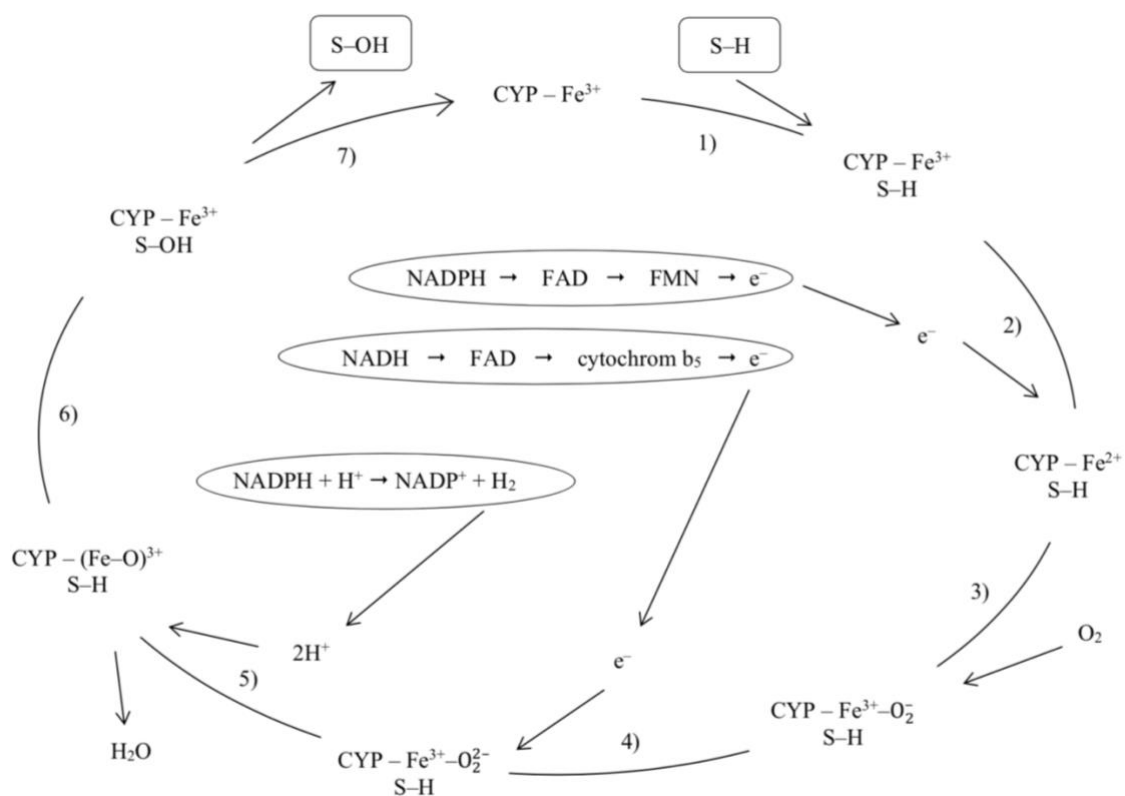
Enzym CYP	Příklady substrátů
CYP1A2	Agomelatin, kofein, klozapin, lidokain, melatonin, paracetamol, takrin, theofylin, tizanidin
CYP2A6	Kotinin, kumarin, letrozol, nikotin, tegafur
CYP2B6	Bupropion, efavirenz, cyklofosfamid
CYP2C8	Cerivastatin, dasabuvir, imatinib, loperamid, repaglinid, montelukast
CYP2C9	Diklofenak, fluvastatin, glimepirid, ibuprofen, losartan, fenytoin, (S)-warfarin
CYP2C19	Citalopram, klopidogrel, omeprazol, sertralin, vorikonazol
CYP2D6	Amitriptylin, kodein, dextrometorfan, fluvoxamin, metoprolol, ondansetron, paroxetin, tamoxifen
CYP2E1	Ethanol, halotan, paracetamol
CYP2J2	Amiodaron, astemizol, cyklosporin
CYP3A4	Alfentanil, alprazolam, atorvastatin, cyklosporin, dexametazon, erytromycin, felodipin, lovastatin, midazolam, sakvinavir, sildenafil, simvastatin, takrolimus, testosteron, triazolam, verapamil, vinkristin
CYP3A5	Substráty shodné s CYP3A4

### 2.1.2.1 Katalytický cyklus

CYP mohou katalyzovat různé reakce jako oxidaci, redukci, hydroxylaci, oxygenaci, *N*- a *O*-dealkylaci sekundárních a terciálních aminů a epoxidaci (Isin *et Guengerich*, 2007, Hrycay *et Bandiera*, 2015). Základem monooxygenační (též hydroxylační) reakce CYP je inkorporace jednoho atomu kyslíku do struktury substrátu za vzniku vody. Zjednodušeně by tato jinak vícestupňová reakce mohla být shrnuta rovnicí:



Podrobnější průběh přeměny substrátu prostřednictvím monooxygenační reakce je znázorněn na Obr. 4.



Obrázek 4 – Mikrosomální reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle Manikandan *et* Nagini, 2018)

Substrát (S-H) je navázán do aktivního místa CYP za vzniku komplexu enzym–substrát. Ve druhém kroku dochází k redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  elektronem pocházejícím z NADPH. Následuje vazba kyslíku (3) a dalšího elektronu z NADH (4) cytochromem P450 za vzniku stabilního komplexu  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}$ . V pátém kroku dojde k interakci jednoho ze dvou atomů kyslíků navázaných na atom železa CYP se dvěma přijatými protony za vzniku molekuly vody. Ve fázi (6) katalytického cyklu cytochromu P450 pak dojde uvolnění druhého atomu kyslíku z komplexu  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}$ , který je přenesen na substrát. Z tohoto cyklu tedy vychází (7) hydroxylovaný substrát (S-OH) a po uvolnění aktivního místa i zregenerovaný CYP, který se může účastnit dalšího metabolismu.

### 2.1.3 Rodiny cytochromů P450

Nomenklatura a rozdělení superrodiny genu P450 do rodin a podrodin bylo zavedeno konsenzem (Nebert *et al.*, 1987). Klasifikace je sestavena na základě sekvenční podobnosti enzymů, jak již bylo zmíněno výše v kapitole 2.1. Díky způsobu rozdělení cytochromů P450 do systému rodin a podrodin lze odvozovat strukturální vztahy mezi jednotlivými enzymy (Hasler *et al.*, 1999).

Cytochromy P450 v rámci jedné rodiny se vyznačují jedinečnými vlastnostmi a funkcí (Shimada *et al.*, 1996). CYP v rodinách CYP1, 2 a 3 hrají významnou roli v játrech, kde se účastní metabolismu léčiv, enzymy CYP z ostatních rodin pak plní jiné důležité funkce (Rendic *et* Guengerich, 2015; 2021). Významnější z nich jsou uvedené v následující Tab. 2.

Tabulka 2 – Primární funkce významných rodin cytochromů P450 (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021; Guengerich, 2015)

Rodina CYP	Primární funkce	Podrodiny	Geny
1	Metabolismus léčiv	3	3
2	Metabolismus léčiv a steroidních látek	13	16
3	Metabolismus léčiv	1	4
4	Metabolismus kys. arachidonové a mastných kyselin	5	12
5	Syntéza tromboxanů	1	1
7	Hydroxylace steroidních látek	2	2
8	Syntéza prostacyklinů a žlučových kyselin	2	2
11	Biosyntéza steroidů	2	3
17	Hydroxylace steroidních látek	1	1
19	Aromatázy	1	1
21	Biosyntéza steroidů	1	1
24	Přeměna vitamínu D	1	1
26	Hydroxylace kys. retinové	3	3
27	Syntéza žlučových kyselin, aktivace vitamínu D	3	3
46	Hydroxylace cholesterolu	1	1
51	Demethylace lanosterolu	1	1

Cytochromy P450 jsou kódovány polymorfními geny a vytvářejí různé alelické formy. Některé formy jsou v populacích častější než jiné (Tucker, 1994). Obecně platí, že exprese i aktivita CYP je individuální pro každého člověka. Byly zaznamenány odlišnosti mezi jednotlivými etnickými skupinami i u pohlaví. Vliv na aktivitu těchto enzymů má také životní styl, fyzická aktivita a špatné životní návyky jako například kouření (van Schaik, 2008, Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Některé CYP mohou být inhibovány nebo naopak indukovány podávanými léčivy nebo jejich metabolity (Lin *et al.*, 2001; Guengerich, 2015). Zejména enzymy CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6 vykazují zvýšenou genetickou variabilitu mezi jedinci v populaci. Na druhou stranu u CYP1A2 a CYP3A4 byl zaznamenán pouze polymorfismus, kterému se zatím nepřipisuje klinický význam. Změna aktivity je zde způsobena zejména v důsledku působení aktivátorů a inhibitorů (Zanger *et Schwab*, 2013; Hasler *et al.*, 1999).



### 2.1.3.1 Rodina CYP1

Rodina CYP1 je považována za nejpřímější genovou rodinu cytochromu P450, která je kódována pouhými dvěma geny. Podrodina CYP1A zahrnuje cytochromy CYP1A1 a CYP1A2. Identita mezi formami CYP1A1 a CYP1A2 odpovídá 68 %. Lidské CYP z rodiny 1 vykazují vysokou podobnost s CYP1 jiných živočišných druhů (Wrighton *et al.*, 1996; Kawajiri *et al.*, 1996).

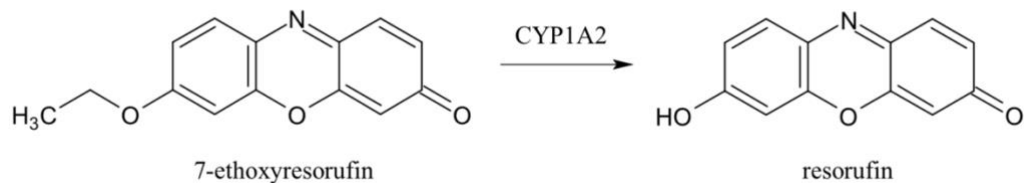
Lidský CYP1A1 je exprimován v plicích a v placentě. Ze studií vyplývá, že tato forma CYP se vyskytuje pouze v 1 % zkoumaných lidských jaterních tkáních (Ryan *et al.*, 1990). Ukázalo se, že lidská forma CYP1A1 má 78% podobnost s potkaní a 80% podobnost s myší formou CYP1A1 (Jaiswal *et al.*, 1985). V souvislosti s CYP1A1 bylo prokázáno, že jeho metabolická aktivita je vyšší u kuřáků oproti nekuřákům a bylo rovněž zpozorováno, že CYP1A1 je indukován vlivem polycyklických aromatických uhlovodíků, z nichž nejznámější je 3-methylcholantren – karcinogenní látka, která vzniká spalováním organické hmoty za vysokých teplot (Quattrochi *et al.*, 1989; Pasanen *et al.*, 1988).

Bylo prokázáno, že tyto enzymy CYP1A1 a CYP1A2 mohou působit jako aktivátory karcinogenů. Při testování potenciálních léčiv je tedy bedlivě sledována případná indukce těchto CYP (Lang *et al.*, 1994).

### CYP1A2

Druhý cytochrom P450 z této podrodiny – CYP1A2 – je typickým jaterním cytochromem (Shimada *et al.*, 1996). Doposud nebylo zjištěno, že by se tato forma CYP vyskytovala mimo jaterní tkáň. Aktivita CYP1A2 se v lidské populaci může výrazně lišit, a to zejména v důsledku indukce – kouřením tabákových výrobků, omeprazolem, fyzickou aktivitou a neposlední řadě také konzumací brukvovitých plodin a konzumací grilovaného masa (Sesardic *et al.*, 1988). Některé epidemiologické studie pak naznačují, že vysoká aktivita CYP1A2 pozitivně koreluje s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu při současné zvýšené aktivitě *N*-acetyltransferázy (Lang *et al.*, 1994; Diaz *et al.*, 1990). Naopak inhibice CYP1A2 byla zaznamenána u pacientů s jaterní cirhózou (Watkins *et al.*, 1990).

Metoda stanovení aktivity CYP1A2 je založena na reakci se specifickým substrátem, například *N*-demethylace kofeinu, *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (viz Obr. 5) nebo fenacetinu. U tohoto CYP jsou rovněž známy typické inhibitory, kterými jsou furafylin a 7,8-benzoflavon (Sesardic *et al.*, 1990; Wrighton *et al.*, 1992).



Obrázek 5 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP1A2 – *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (upraveno podle Chang *et Waxman*, 2006)

### 2.1.3.2 Rodina CYP2

CYP2 je nejpočetnější rodinou cytochromů P450 a je tvořená 13 podrodinami. Převážná většina jednotlivých forem CYP2 je syntetizována v játrech. Jedinou známou výjimkou je CYP2J2, který je exprimován a působí zejména v kardiovaskulárním systému (Zanger *et Schwab*, 2013).

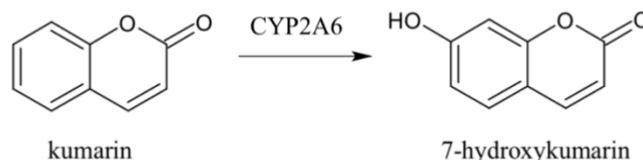
Enzymy z rodiny CYP2 pokrývají velmi široké spektrum substrátů díky odlišným aktivním místům jednotlivých forem CYP. Příkladem reprezentujícím tuto skutečnost, způsobenou variabilitou aktivních míst CYP2, je to, že CYP2D6 interaguje se zásaditými substráty, zatímco CYP2C9 váže a přeměňuje substráty kyselé povahy (Zanger *et Schwab*, 2013).

Variabilita aktivity enzymu CYP2D6 je založena na existenci různých alel genu *CYP2D6*. Doposud bylo u tohoto CYP objeveno ke dvěma stům alelických variant, což je nejvyšší počet ze všech cytochromů P450 (Guengerich, 2015). Každá alela kóduje protein s jinou nebo žádnou aktivitou. Forma *CYP2D6\*1* je tzv. wild-type alela. Alely *\*1*, *\*10* a *\*41* jsou alely kódující protein se standardní aktivitou. Alela *\*2* je typická alela s vysokou aktivitou. Za nefunkční alely jsou považovány zejména alely *\*3*, *\*4*, *\*5* a *\*6*. Na základě toho, jaká kombinace alel se vyskytuje v genomu lze rozlišit 4 fenotypy – pomalí, intermediální, rychlí a ultra-rychlí metabolizátoři. Pomalí metabolizátoři jsou homozygoti nefunkční alely, nebo heterozygoti dvou různých nefunkčních alel. Naopak rychlí metabolizátoři nesou ve svém genotypu alespoň jednu alelu s vysokou aktivitou. Fenotyp ultra-rychlých metabolizátorů vznikl genovou duplikací, tj. přítomností alespoň tří aktivních alel. Tento stav může vést k selhání lékové terapie vlivem extrémně rychlého odbourávání léčiva (Neafsey *et al.*, 2009).

Příkladem induktoru valné většiny cytochromů z rodiny CYP2 je úzkospektrální antibiotikum rifampicin a artemisinin – extrakt z pelyňku s antimalarickým účinkem (Gonzalez, 2004; Hasegawa *et al.*, 2011; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001).

## CYP2A6

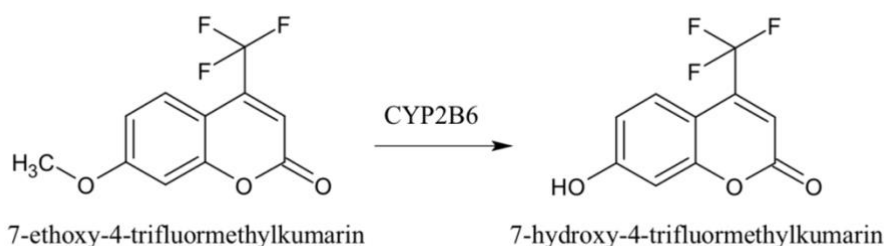
Jednou z forem rodiny 2 zapojené do metabolismu léčiv je CYP2A6. V jaterních mikrosomech tato forma pokrývá jen malou část celkového P450, a to přibližně 1–3 %. I u této formy se aktivita značně liší. Aktivitu této formy lze indukovat běžnými léčivy, jako například barbituráty a dexametazonem. Tato forma cytochromu P450 je stěžejním enzymem při 7-hydroxylaci kumarinu a deethylaci 7-ethoxykumarinu, proto se i tyto látky využívají jako specifické substráty při stanovení katalytické aktivity CYP2A6, viz Obr. 6 (Wrighton *et* Stevens, 1992).



Obrázek 6 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2A6 – 7-hydroxylace kumarinu (upraveno podle Waxman *et* Chang, 2006)

## CYP2B6

Forma CYP2B6 je stejně jako zbytek podrodiny CYP2B indukovatelná fenobarbitalem (Ryan *et* Levin, 1990). I tato forma vlivem indukce a inhibice v populaci vykazuje různou aktivitu. V jaterní tkáni se podílí na metabolismu léčiv a je zastoupena asi 2–10 % celkového P450. Aktivita CYP2B6 je stanovována fluorometricky – reakcí *O*-deethylace 7-ethoxy-4-trifluormethylkumarinu, viz Obr. 7. Pro větší specifitu mohou být do reakce přidávány látky zacílené proti aktivitě CYP1A2, CYP2C a CYP2E1 (Ryan *et* Levin, 1990; Chang *et al.*, 2006).

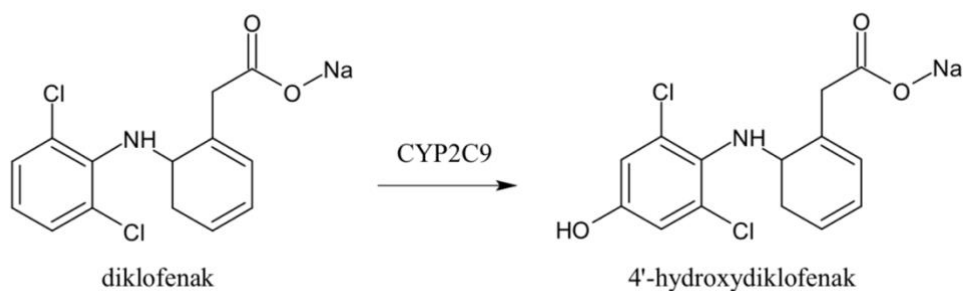


Obrázek 7 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2B6 – *O*-deethylace 7-ethoxy-4-trifluormethylkumarinu (upraveno podle Morse *et* Lu, 1998)

## CYP2C9

Enzymy podrodiny CYP2C jsou rovněž formou cytochromu P450 vyskytující se převážně v játrech, přičemž každý má trochu jinou specifitu a roli v metabolismu léčiv. CYP2C9 má vysoký stupeň podobnosti s CYP2C10, vzájemně se liší pouze 2 aminokyselinami. Tato skutečnost neumožňuje rozdělení katalytické aktivity těchto dvou CYP (Ged *et al.*, 1988).

Markerem aktivity těchto dvou cytochromů P450 je 4'-hydroxylace tolbutamidu, diklofenaku (Obr. 8) nebo 7-hydroxylace (*S*)-warfarinu. Za selektivní inhibitor těchto forem P450 je považována látka zvaná sulfafenazol. Naopak indukci způsobuje, stejně jako u jiných enzymů CYP2, rifampicin. Tato forma se vyskytuje rovněž v různých allozymových variantách, které se liší více či méně ve své aktivitě (Tucker, 1994, Wrighton *et al.*, 1996).



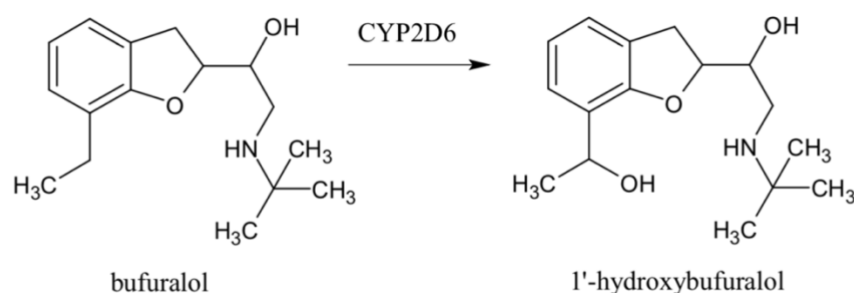
Obrázek 8 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2C9/10 – 4'-hydroxylace diklofenaku (upraveno podle Crespi *et al.*, 2006)

### CYP2C19

Cytochrom P450 s označením CYP2C19 má schopnost 4'-hydroxylace (*S*)-mefenytouinu. Selektivním inhibitorem je tranilcypromin a induktorem je také rifampicin (Wrighton *et al.*, 1993; 1996; Salsali *et al.*, 2004). V souvislosti s touto formou bylo objeveno, že až 20 % asijské populace je pomalým metabolizátorem xenobiotik prostřednictvím CYP2C19. Pomalý metabolismus je v případě CYP2C19 autosomálně recesivně dědičný. Vlivem tohoto dědičného polymorfismu se může enzymová aktivita CYP2C19 v populaci lišit až 150krát (de Morais *et al.*, 1994).

### CYP2D6

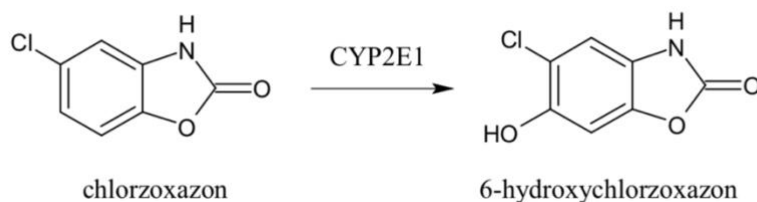
Lidská forma CYP2D6 se z velké části podílí na metabolismu léčiv. Uvádí se, že přispívá k přeměně více než čtvrtiny používaných léčiv se známým průběhem metabolismu (Guengerich, 2015). Pro stanovení aktivity jsou využívány *in vitro* testy založené na reakcích: 4-hydroxylace debrisochinu, oxidace sparteinu, *O*-demethylace dextrometorfanu a 1'-hydroxylace bufuralolu (Obr. 9). Typickým inhibitorem CYP2D6 je chinidin. 25násobný rozdíl v aktivitě CYP2D6 napříč populací je zapříčiněn vlivem existence různých fenotypů (viz kapitola 2.1.3.2 Rodina CYP2) (Guengerich, 1995; Wrighton *et Stevens*, 1992; Zanger *et al.*, 2004).



Obrázek 9 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2D6 – 1'-hydroxylace bufuralolu (upraveno podle Crespi *et al.*, 1998)

### CYP2E1

Tato forma cytochromu P450 je poslední z rodiny 2, která je důležitým enzymem v metabolismu léčiv. CYP2E1 přeměňuje celou řadu substrátů včetně tetrachlormethanu a ethanolu. Právě ethanol, isopropanol, isoniazid a ketony jsou induktory této formy. Aktivita CYP2E1 se stanovuje markerovou reakcí, kterou je 6-hydroxylace chlorzoxazonu (Obr. 10) a *N*-demethylace *N*-nitrosodimethylaminu a dále i hydroxylace *p*-nitrofenolu. V lidské populaci se může vlivem indukce lišit aktivita enzymu CYP2E1 až 50krát (Wrighton *et Stevens*, 1992; Yang *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 1985).



Obrázek 10 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2E1 – 6-hydroxylace chlorzoxazonu (upraveno podle Lucas *et al.*, 1996)

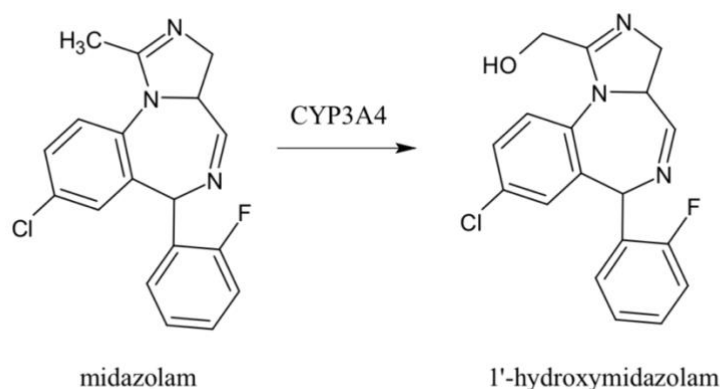
#### 2.1.3.3 Rodina CYP3

Rodina cytochromů CYP3 je reprezentována pouze jedinou podrodinou, kterou je CYP3A hrající stěžejní roli v metabolismu léčiv. Lidská rodina CYP3A se skládá ze 4 členů – CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43. CYP3A4 společně s CYP3A5 se vyskytují v nejvyšší hladině ze všech cytochromů P450 v lidském organismu, zejména v játrech (Kawakami *et al.*, 2011). Enzymy z rodiny CYP3 vykazují širší substrátovou specifitu. Některé z nich, například CYP3A4, může dokonce vázat a přeměňovat i více substrátů najednou. U této rodiny bylo objeveno, že je indukovatelná fenobarbitalem, fenytoinem, nebo například glukokortikoidy (Watkins, 1990).

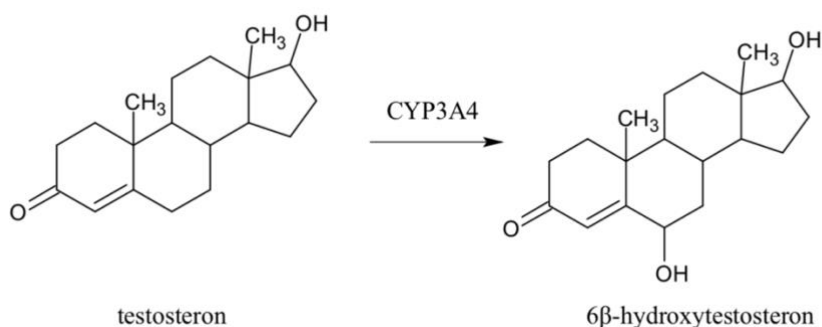
## CYP3A4

Nejvýznamnější zástupce této skupiny – CYP3A4 – má aktivní místo, které je svojí flexibilitou uzpůsobené pro široké spektrum substrátů (Anzenbacherová *et al.*, 2000; Ekroos *et Sjögren*, 2006). Ze specifických substrátů, které slouží jako ukazatel aktivity CYP3A4 jsou v *in vitro* metodách využívány následující – *N*-demethylace erytromycinu a cyklosporinu, oxidace nifedipinu, 1'-hydroxylace midazolamu (Obr. 11) a asi nejpoužívanější 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu, viz Obr. 12 (Wrighton *et al.*, 1996).

CYP3A4 může být indukován látkami přírodního původu, například zeleninou (tuřín a špenát). Zároveň ale může docházet k jeho inhibici šťávou z grapefruitů, která obsahuje flavonoidy (konkrétně kvercetin a bergamottin) (Wrighton *et al.*, 1996; Guengerich, 2015). Mechanism-based inhibice byla v souvislosti s CYP3A4 zjištěna u ethynylestradiolu. Rovněž u látky zvané triacetyloleandomycin (TAO) bylo zjištěno, že tvoří s CYP3A4 komplex, a tím tuto formu inhibuje (Wrighton *et Stevens*, 1992). Je rovněž známo, že aktivita tohoto enzymu je vyšší u žen oproti mužům, a tedy léky metabolizované tímto enzymem jsou u žen eliminovány rychleji (Tanaka, 1999).



Obrázek 11 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP3A4/5 – 1'-hydroxylace midazolamu (upraveno podle Kronbach *et al.*, 1989)



Obrázek 12 – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP3A4/5 – 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu (upraveno podle Guengerich *et al.*, 1986)

#### 2.1.4 Studium enzymové aktivity cytochromů P450

Měření vlivu testované látky na aktivitu jednotlivých forem cytochromů P450 je dnes již nezbytnou součástí vývoje nových léčiv. Díky *in vitro* experimentálním postupům lze určit, jaká forma cytochromu P450 je zodpovědná za metabolismus daného xenobiotika, a také jestli daná látka nezpůsobuje případnou změnu aktivity některé z forem CYP. Pro tyto experimenty jsou využívány mikrosomální frakce z lidských jater, případně jater různých zvířecích modelů (Tassaneeyakul *et al.*, 1993).

Dané eseje jsou navrženy tak, že pro zvýraznění aktivity požadované formy cytochromu P450 v mikrosomální frakci je využit specifický substrát pro danou formu CYP. Navíc je do reakce přidáván NADPH generující komplex, který se skládá z NADP<sup>+</sup>, isocitrátu a isocitrátdehydrogenázy a MgSO<sub>4</sub>, pro tvorbu NADPH, jež je donorem H<sup>+</sup>, jak je uvedeno v Obr. 4. Kromě mikrosomů, substrátu a NADPH generujícího systému je v reakci přítomen také fosfátový pufr (pH 7,4) napodobující vnitřní prostředí organismu a testovaná látka (Ung *et al.*, 2018; Cohen *et al.*, 2003).

Poznatky získané z těchto experimentálních přístupů poskytují informace o možných lékových interakcích a pomáhají při navržení klinických *in vivo* studií. Nicméně hlavním cílem při vývoji léčiv je vyhnout se sloučeninám vykazující lékové interakce. V USA jsou pro testování 9 nejvýznamnějších forem P450 metabolizující léčiva zavedeny validované poloautomatické testy. Jako markery aktivity jsou využívány následující reakce: CYP1A2 – *O*-deethylace fenacetinu; CYP2A6 – 7-hydroxylace kumarinu; CYP2B6 – hydroxylace bupropionu; CYP2C8 – *N*-desethylace amodiachinu; CYP2C9 – 4'-hydroxylace diklofenaku a tolbutamidu; CYP2C19 – 4'-hydroxylace (*S*)-mefenytinu; CYP2D6 – *O*-demethylace dextrometorfanu; CYP2E1 – 6-hydroxylace chlorzoxazonu a pro CYP3A4/5 je to 6β-hydroxylace testosteronu a 1'-hydroxylace midazolamu (Walsky *et Obach*, 2004).

##### 2.1.4.1 HPLC

Připravené reakční směsi pro stanovení aktivity cytochromu P450 jsou podrobeny HPLC analýze (vysokoučinná kapalinová chromatografie, zkratka odvozená z anglického high-performance liquid chromatography), která poskytuje kvantitativní informaci o vzniklém metabolitu. Metabolitem je v tomto případě nazýván specifický substrát přeměněný vlivem zkoumané formy CYP. Finální stanovené množství vzniklého metabolitu je přímo úměrné aktivitě enzymu CYP (Donato *et al.*, 2004).

Chromatografie obecně je analytická metoda, při které dochází k rozdělení složek vzorku unášeného mobilní fází na základě jejich interakce se stacionární fází. Moderní HPLC systém je složený z několika částí, kterými jsou: injektor, který zavádí vzorek do systému; pumpy

sloužící k zajištění průchodu mobilní fáze systémem; kolona obsahující nosič se zakotvenou stacionární fází; detektor monitorující změny ve složení mobilní fáze po průchodu kolonou. Výsledkem analýzy prostřednictvím HPLC je tzv. chromatogram. Chromatogram je složen z oddělených rozlišitelných píků, jež odpovídají jednotlivým analytům, které opouštějí chromatografickou kolonu na základě jejich polarit. Pokud je použita normální stacionární fáze, tedy polární, analyty jdoucí z chromatografické kolony jsou seřazeny od nepolárních analytů až po ty polární. Druhou variantou je chromatografie na obrácených fázích, kdy je stacionární fáze nepolární povahy. V tomto případě z HPLC kolony odcházejí nejprve nejpolárnější analyty a polarita uvolňovaných látek postupně klesá (Klouda, 2003; Weston *et al.*, 1997; Yandamuri *et al.*, 2013).

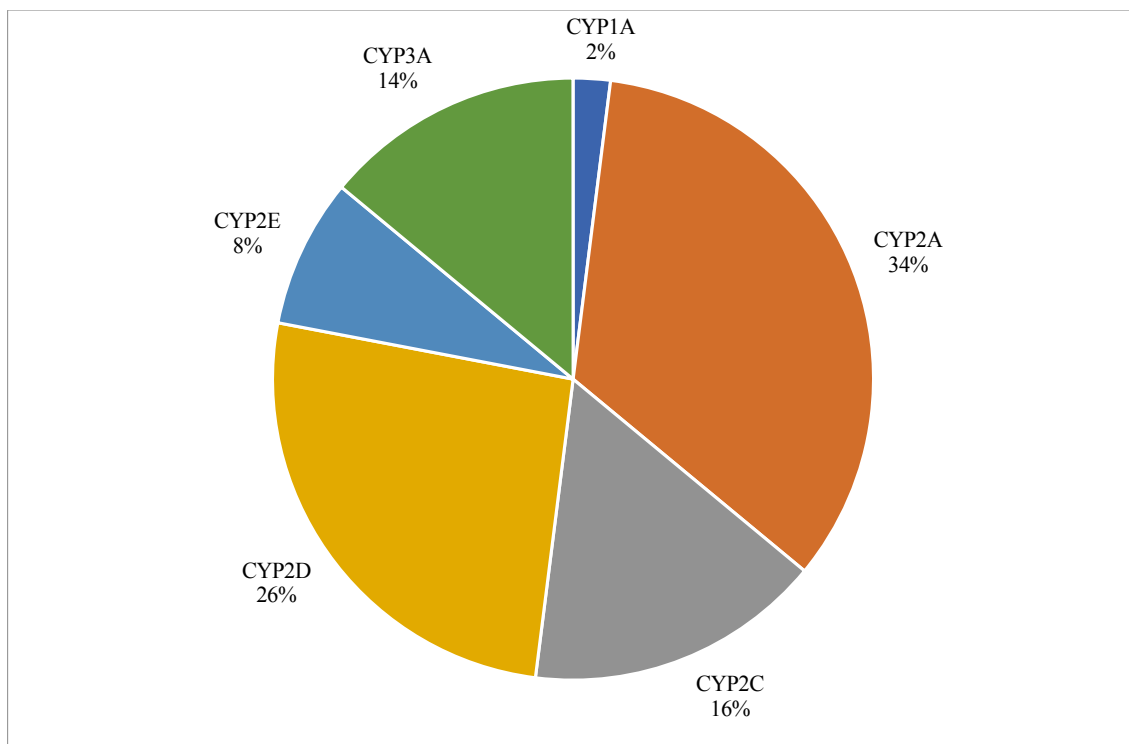
Parametry pro stanovení aktivit CYP jsou dány zavedenými a validovanými metodami. Při studiu cytochromů P450 jsou využívány kolony s reverzní neboli obrácenou fází (někdy označované jako RP-HPLC). Každá metoda pro jednotlivé formy CYP má dané specifické podmínky jako jsou mobilní fáze, tlak, průtoková rychlost HPLC systémem, objem vzorku pro stanovení, podmínky eluce, vlnová délka detekce a doba analýzy jednoho vzorku (Ko *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2013).

Vzorek pro HPLC analýzu je obecně velmi složitý na přípravu zejména kvůli nutnosti extrakce proteinů a odstranění jiných velkých molekul, které by mohly změnit nebo i zablokovat celou analýzu. Mimo to je HPLC kvantifikace aktivit CYP velmi časově náročná a také je při ní vysoká spotřeba chemikálií a rozpouštědel. Proto v současnosti v některých specializovaných laboratořích nahrazují konvenční metody high-throughput metodami na bázi fluorescenčních nebo luminiscenčních screeningových testů a také hmotnostní spektrometrií, které jsou dostačující pro rychlou orientaci (Ung *et al.*, 2018). V posledních letech také došlo k rozvoji počítačových programů, které umožňují na základě modelování a simulace předpovídat případnou inhibici nebo indukci CYP (Kato, 2020).

#### **2.1.4.2 Prase jako experimentální model pro studium CYP**

Prase je při vývoji nových léčiv stále využívanějším experimentálním modelem. Jedním z důvodů je, že prasečí enzymová výbava je z velké části odpovídající lidské (Hughes *et al.*, 1996). Četnost výskytu různých forem cytochromu P450 v prasečí izolované mikrosomální frakci se však může od lidských mikrosomů lišit. Ve studii (Achour *et al.*, 2011) byla provedena kvantifikace jednotlivých forem CYP v jaterních mikrosomových vzorcích prasat plemene Suffolk White. Složení forem CYP je uvedeno na následujícím Obr. 13:





Obrázek 13 – Zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v prasečí mikrosomální frakci (upraveno podle Achour *et al.*, 2011)

V této studii bylo rovněž prokázáno, že jsou v prasečích mikrosomech exprimovány jiné formy cytochromu P450, které však vykazují vysokou sekvenční homologii k lidským formám CYP. U prasat jsou nejběžnějšími formami cytochromu P450 – CYP1A2, CYP2A19, CYP2C33, CYP2C49, CYP2D25, CYP2E1, CYP3A29 a CYP3A39 (Achour *et al.*, 2011). Lidské orthology a podobnost k prasečím formám jsou uvedeny v Tab. 3:

Tabulka 3 – Podobnost prasečích a lidských forem cytochromů P450 (upraveno podle Achour *et al.*, 2011)

Prasečí CYP	Orthologický lidský CYP	Podobnost
CYP1A2	CYP1A2	90,3 %
CYP2A19	CYP2A6	93,5 %
CYP2C33	CYP2C9	80,2 %
CYP2C49	CYP2C18	90,2 %
CYP2D25	CYP2D6	86,6 %
CYP2E1	CYP2E1	90,9 %
CYP3A29/39	CYP3A4/5	88,1 %

Aktivity lidských forem CYP1A2, CYP2A6 a CYP3A4 korelují s aktivitami odpovídajících enzymů u prasete. Právě pro tyto CYP je prase vhodným experimentálním modelem. Aktivita a případná inhibice je prokazována totožnými reakcemi jako u lidských forem. Opačná situace je u CYP2D a CYP2E – zde je aktivita prasečích a lidských enzymů odlišná (Skaanild, 2006). Specifická reakce pro stanovení aktivity lidského CYP2D6 – 1'-hydroxylace bufuralolu – je u prasat zřejmě katalyzována prostřednictvím CYP2B (Skaanild *et Friis*, 2002). Přeměna chlorzoxazonu je u prasat katalyzována cytochromy CYP2A nebo CYP3A, nikoliv CYP2E1 jako je tomu u lidí (Skaanild, 2006). Pro cytochrom CYP2C9 je specifická reakce pro lidské i prasečí mikrosomy stejná – 4'-hydroxylace diklofenaku, avšak vhodnějším modelem než prase, je u této formy potkan (Thomas, 2007).

## 2.2 Lékové interakce

Cytochromy P450 ve své struktuře obsahují vazebná aktivní místa, do kterých se mohou vázat kromě substrátů také specifické inhibitory a induktory (Guengerich *et al.*, 2016). Indukce a inhibice cytochromů P450 jsou považovány za hlavní mechanismus lékových interakcí (Wienkers *et Heath*, 2005). Kromě samotných léků mohou být aktivity CYP ovlivňovány také metabolizovanými meziprodukty. Tato skutečnost následně může ovlivnit metabolismus léčiv katalyzovaný těmito CYP (Trieu *et Murray*, 2000).

Znalost lékových interakcí a jejich dopad na aktivitu CYP – jako je indukce a inhibice, je pro klinické aplikace nezbytná (Hakkola *et al.*, 2020). Při indukci CYP je totiž zvýšena aktivita dané formy, a tedy i metabolismus xenobiotika, což vede ke snížení jeho koncentrace v plazmě, a tím může dojít poklesu koncentrace léčiva pod jeho terapeutickou hladinu. Oproti tomu inhibice CYP, která je nejčastěji způsobena kompeticí dvou či více léčiv o vazbu do aktivního místa téhož enzymu, může způsobit akumulaci xenobiotika v organismu, zvýšení plazmatické koncentrace daného léčiva, a tím i vyšší pravděpodobnost možných toxických vlivů dané látky (Manikandan *et Nagini*, 2018). Při vývoji nových léčiv se tedy dbá na to, aby daná látka nebyla silným inhibitorem ani induktorem některého cytochromu P450, s cílem předejít případným hrozícím lékovým interakcím (Lin *et Lu*, 1998; Guengerich, 2022).

Z výsledků studií vyplývá, že i interindividuální variabilita genové výbavy jedince s ohledem na CYP může mít vliv na terapeutický úspěch. Různé polymorfismy v genech CYP mohou způsobovat ztrátu, částečné snížení, nebo zvýšení aktivity CYP. Polymorfismy CYP jsou v posledních letech zkoumány, protože mohou být příčinou rozvoje onemocnění a neschopnosti jedince metabolizovat léčiva (van Schaik, 2008, Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

Změn aktivit CYP však lze v některých výjimečných případech i využívat. Bylo prokázáno, že v buňkách karcinomu prsu je zvýšená exprese CYP1B1, u karcinomu jater a plic

pak CYP2A6. Při nádorové terapii některých druhů karcinomů se pak využívají látky aktivované právě těmito formami cytochromů P450, typickými pro dané nádorové onemocnění (Sneha *et al.*, 2021, McFadyen *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Indukce

Indukce cytochromů P450 je běžným procesem v organismu. Indukce probíhá z velké části na transkripční úrovni prostřednictvím epigenetických regulací (Tompkins *et Wallace*, 2007). Aktivace exprese CYP probíhá prostřednictvím receptorů, které se po navázání xenobiotika nebo endogenního ligandu dostávají do jádra, kde indukují transkripci genů CYP (Manikandan *et Nagini*, 2018). Jsou ovšem popsány i mechanismy nesouvisející s transkripcí, které se rovněž podílejí na indukci CYP, a to například stabilizace mRNA, enzymová stabilizace a inhibice dráhy degradace cytochromu P450 (Tompkins *et Wallace*, 2007, Pelkonen *et al.*, 2008).

Hlavní cesta vedoucí k indukci cytochromů P450 je aktivace jaderných receptorů. Typickým příkladem je aryluhlovodíkový receptor (AhR), který reguluje expresi cytochromů CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2S1. Druhým příkladem je jaderný receptor – pregnanový X receptor (PXR), který zvyšuje expresi důležitých CYP3A. Dalším je konstitutivní androstanový receptor (CAR), který reguluje indukci CYP2B. A v neposlední řadě jsou to také jaderné receptory aktivované peroxisomovými proliferátory (PPAR) jako jsou fibráty a další látky (viz Tab. 4) zprostředkovávající indukci cytochromů podrodiny CYP4A a CYP2J (Smutny *et al.*, 2013; Elcombe *et al.*, 2014; Kawajiri *et Fujii-Kuriyama*, 2007; Blumberg *et al.*, 1998). Receptory jsou po navázání příslušného induktoru transportovány do jádra, kde fungují jako transkripční faktory a způsobují expresi genů CYP (Mutoh *et al.*, 2013).

Přestože indukce není z klinického hlediska tak závažná jako inhibice cytochromů P450, je i přesto snaha minimalizovat vývoj léčiv s touto vlastností (Dickins, 2004). Některé vybrané známé induktory jsou shrnuty v Tab. 4.

Tabulka 4 – Ligandy jaderných receptorů indukující cytochromy P450 (upraveno podle Manikandan *et Nagini*, 2018)

Receptor	Ligand	Významné indukce CYP
AhR	Uhlovodíkové sloučeniny, některá léčiva, kofein, eikosanoidy	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1
PXR	Steroidy a steroidní hormony Mnoho terapeuticky významných léčiv (rifampicin, karbanazepin, dexametazon, fenylobutazon, fenytoin, karotenoidy, koumestrol)	CYP2B CYP2C CYP3A
CAR	Fenobarbital, amobarbital, sekobarbital, androstanol	CYP2B CYP3A4 CYP2C8 CYP2C9
PPAR	Fibráty, negenotoxické karcinogeny, mastné kyseliny, leukotrieny, 8-hydroxyeikosatetraenová kyselina	CYP4A CYP2J

### 2.2.2 Inhibice

Další možnou změnou aktivity CYP je inhibice, která je v organismu dokonce častější než indukce. Při této formě změny aktivity cytochromů P450 často dochází ke kompetici dvou látek o stejné vazebné místo ve struktuře cytochromu P450. Při inhibici CYP může docházet k hromadění nevyužitého léčiva v organismu, což může ovlivnit terapeutický výsledek léčby a uživateli hrozí vedlejší účinky daného léku (Kumar *et al.*, 2012, Kalra, 2007). Mimo metabolismu léčiv hrají cytochromy P450 roli také v metabolismu karcinogenů. Proto se uvažuje, že inhibitory CYP by se mohly uplatnit jako protinádorová léčiva (Wahlang *et al.*, 2015).

Inhibitor cytochromu P450 by mohl být definován jako substrát tohoto enzymu, který zároveň způsobuje snížení jeho aktivity. Podle způsobu interakce inhibitoru s CYP, může být inhibice rozdělena do dvou typů: vratná (reversibilní) a nevratná (ireversibilní). Reverzibilní inhibice probíhá ještě před oxidačním krokem katalytického cyklu cytochromu P450. Tento typ inhibice je z hlediska lékových interakcí mnohem častější, a ještě se dále dělí na kompetitivní, nekompetitivní a smíšený (Pelkonen *et al.*, 2008; McGinnity *et Riley*, 2001).

Při kompetitivní inhibici má inhibitor podobnou strukturu standardnímu enzymovému substrátu. Inhibitor soutěží se substrátem o vazebné místo CYP, a tím dochází ke snížení dostupného množství enzymu. Tímto způsobem probíhá například inhibice CYP3A4 prostřednictvím ketokonazolu, což je v současnosti používané a předepisované antifungální léčivo (Dilmaghanian *et al.*, 2004; Olkkola *et al.*, 1993).

Nekompetitivní inhibice naopak probíhá tak, že se inhibitor váže na komplex enzym–substrát, nebo na volný enzym, avšak jinam než do aktivního místa. Při tomto typu inhibice

nedochází k zablokování aktivního místa, ale ke snížení aktivity enzymu. Mezi cytochromové nekompetitivní inhibitory patří léky jako omeprazol, lansoprazol a cimetidin (Lin *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2005). V obou případech reverzibilní inhibice, ať už kompetitivní nebo nekompetitivní, jsou za vazbu xenobiotika na CYP zodpovědné nekovalentní interakce (Sadek, 2011).

Při posledním typu inhibice – ireverzibilní inhibici – vzniká mezi inhibitorem a enzymem kovalentní vazba, která již nezaniká a je pro CYP letální. Ireverzibilní inhibice bývá nejčastěji způsobena reaktivními metabolickými meziprodukty (Zhou *et al.*, 2005). Nevratná inhibice vzniká v důsledku některé z následujících interakcí: interakce inhibitoru s nukleofilními aminokyselinami v aktivním místě enzymu, nebo vazbou na dusíkové atomy porfyrinu nebo přímo tvorbou vazby s centrálním atomem železa v CYP (Murray, 1997).

Existují také případy, kdy inhibice cytochromu P450 může být způsobena nepřímou cestou, za kterou je považováno narušení DNA v oblasti genu pro CYP, narušení struktury proteinu nebo přenosu elektronů, a v neposlední řadě také vlivem nedostatku kyslíku využitelného pro katalytický cyklus cytochromu P450 (Correia *et al.*, 2005).

Pro popis inhibičních vlastností látky jsou využívány základní pojmy jako je  $IC_{50}$  a  $K_i$ .  $IC_{50}$  je označení pro poloviční maximální inhibiční koncentraci, tedy koncentraci, která způsobí za daných experimentálních podmínek 50% inhibici biologické aktivity. Inhibiční konstanta  $K_i$  odráží afinitu sledovaného inhibitoru k enzymu. Čím menší hodnota  $K_i$ , tím menší množství dané látky je potřeba k inhibici biologické aktivity enzymu. Pokud je velikost těchto dvou parametrů stejná nebo velmi podobná, jedná se o nekompetitivní inhibici. Pokud je hodnota  $K_i$  menší, než hodnota  $IC_{50}$  jedná se o inhibici kompetitivní nebo akompetitivní (Ring *et al.*, 2021).

Potenciální inhibice CYP je bedlivě zkoumanou oblastí při vývoji nových léčiv (Tannenbaum *et al.*, 2014). Ireverzibilně zablokované cytochromy P450 totiž zvyšují riziko autoimunitní tvorby akutní hepatotoxicity. Proto jsou v preklinickém stádiu vývoje nových léčiv prováděny studie zaměřené právě na identifikaci případné inhibice jaterních mikrosomálních cytochromů (Lin *et al.*, 2002; Guengerich, 2015). Známé specifické inhibitory zásadních CYP pro metabolismus léčiv jsou pak shrnuty v následující Tab. 5.

Tabulka 5 – Inhibitory vybraných CYP enzymů (upraveno podle Hakkola *et al.*, 2020; Bourrié *et al.*, 1996)

Cytochrom P450	Inhibitor	K <sub>i</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]
CYP1A2	Furafylin	0,6
	α-naftoflavon	0,01
CYP2A6	Pilokarpin	0,05
	Tryptamin	0,2
CYP2B6	Ticlopidin	1,2
	Clopidogrel	0,02
CYP2C9	Sulfafenazol	0,3
	Amiodaron	0,8
CYP2D6	Chinidin	0,04
	Paroxetin	0,15
	Fluoxetin	0,6
CYP2E1	Tranlycypromin	0,4
CYP3A4	Troleandomycin	0,26
	Ketokonazol	0,015

#### 2.2.2.1 Časově závislá inhibice a inhibice založená na mechanismu

Časově závislá inhibice (z anglického TDI – time-dependent inhibition) je druh inhibice, jejíž stanovení je doporučeno FDA při studiu lékových interakcí, při vývoji a zavádění potenciálních léčiv. Tato inhibice je stanovována v reakční směsi s různou dobou preinkubace bez přítomnosti specifického substrátu (Grimm *et al.*, 2009). Termín TDI označuje stav, kdy dochází ke zvýšení účinnosti inhibitoru vůči cytochromu P450 v čase (Silverman; 1988).

MBI neboli inhibice založená na mechanismu (z anglického mechanism-based inhibition) je podskupinou časově závislé inhibice a spočívá v inaktivaci CYP reaktivním metabolitem dané látky (Grimm *et al.*, 2009). MBI způsobuje ve většině případů ireverzibilní nebo kvazi-ireverzibilní inhibici cytochromu P450. Tato situace nastává v důsledku reakce specifické funkční skupiny s aktivním místem, kterou může být například thiofen, furan a alkylamin (Mirzaei *et al.*, 2021).

### 2.3 Antimikrobiální léčiva

Při bakteriální infekci jsou první volbou antibiotika – látky, které inhibují růst a případně i usmrcují mikroorganismy. V současné době hrají nezastupitelnou roli v prevenci i léčbě bakteriálních infekčních onemocnění jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně. Běžnou praxí v zemědělství v několika předchozích desetiletích bylo přidávání antibiotik do krmných směsí za účelem prevence nemocí a zlepšení chovných výnosů hospodářských zvířat. Důsledkem neuváženého zneužívání antibiotik dnes čelíme problému zvýšeného výskytu rezistentních kmenů bakterií. Předmětem vědeckého bádání je, zda alternativní antimikrobiální léčiva dokáží nahradit ověřenou antibiotickou léčbu (Cheng *et al.*, 2016).

Antimikrobiální rezistence (AMR) je v současnosti pro celý svět alarmujícím problémem. Hojné užívání antimikrobiálních léčiv totiž způsobuje vznik a šíření rezistence mezi mikroby (Cheng *et al.*, 2016). Rezistence vůči antimikrobiálním látkám se projevuje ve dvou stupních – na buněčné úrovni, která je způsobena mutacemi a horizontálním přenosem mezi jednotlivými bakteriemi, nebo na úrovni komunity, kdy rezistenci sdílí celý biofilm (Penesyan *et al.*, 2015).

Protože je vývoj nových antibiotik v současné době zejména z ekonomických důvodů téměř zastaven, byly navrženy další možnosti, jak a čím antibiotika v budoucnu nahradit. Alternativami by mohly být antibakteriální vakcíny, imunomodulační látky, bakteriofágy, lysiny a AMP (antimikrobiální peptidy) (Seal *et al.*, 2013; Millet a Maertens, 2011; Chen *et al.*, 2016).

Jinou alternativní cestou, kterou se vydala část vědeckých pracovišť jsou antimikrobiální léčiva na bázi kovových nanočástic. Setkávají se ovšem s problémem, kterým je toxicita těchto částic. Existují však studie, které do budoucna navrhují užívání konvenčních antimikrobiálních léčiv v kombinaci s novými metodami, jako jsou právě nanočástice, které jsou přitahovány k povrchu bakterie, narušují její membránu a tím snižují životaschopnost mikrobů (Cheng *et al.*, 2016).

Další možností se ukazuje návrat ke starším antimikrobiálním látkám, které dnes již nejsou používány. Takovými látkami by mohly být například polymyxiny, fosfomycin, temocilin a nitrofurantoin k léčbě infekcí gramnegativních bakterií; trimethoprim-sulfamethoxazol, tetracykliny, chloramfenikol, rifampicin a kyselina fusidová pro léčbu infekcí způsobenou grampozitivními bakteriemi, nebo třeba klofazimin pro léčbu tuberkulózy. Vývoj léčiv v době, kdy byly tyto látky objeveny, zdaleka nedosahoval dnešních standardů, proto by byla nutná kontrola jejich účinnosti a bezpečnosti a optimalizace terapie (Cassir *et al.*, 2014).

Velmi atraktivní se ukázal výzkum a vývoj antimikrobiálních látek obsahující prvky jako jsou měď, jód a stříbro. Antimikrobiální účinky mědi jsou známy již od starověkého Egypta, kdy byl tento prvek používán pro úpravu vody a potravin a i pro lékařské účely. Činidla obsahující

měď se ukázala efektivní v eliminaci mikroorganismů z povrchů, úpravě vody, dezinfekci potrubí a v kontrole legionely (Konieczny *et Rdzawski*, 2012; Vincent *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Komplexní sloučeniny mědi

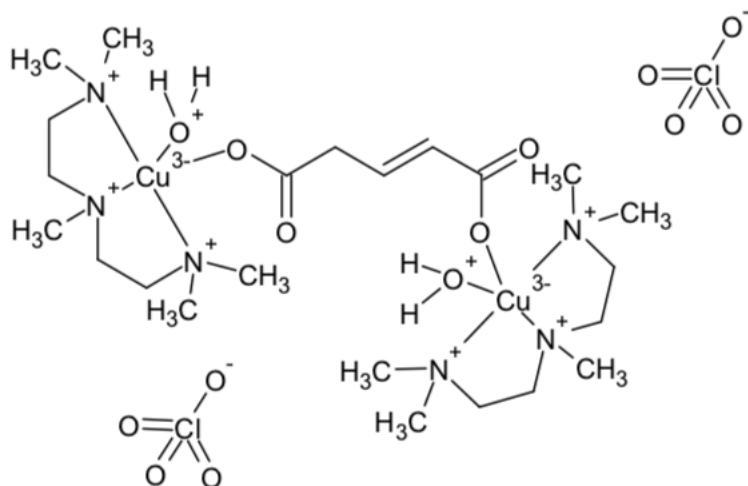
Komplexní koordinační sloučeniny s centrálním atomem tvořeným iontem mědi jsou v prostředí lékařské chemie v souvislosti s vývojem léků aktuální. Ukázalo se, že vykazují četné potenciálně využitelné biologické aktivity. Jednou z nich je možnost využití mědi v protinádorových činidlech namísto v současnosti používané a velmi drahé platiny. Dále jsou u některých sloučenin nalezeny účinky antimikrobiální, antituberkulózní, antimalarické a protizánětlivé. Další využitelnost spočívá ve značených koordinačních sloučeninách mědi ( $\text{Cu}^{64}$ ) pro zobrazovací techniky jako je například PET (pozitronová emisní tomografie) (Krasnovskaya *et al.*, 2020).

Předností léčiv obsahující měď je fakt (Liao *et al.*, 2020), že tkáně zasažené infekcí nebo tumorogenezi metabolizují měď ve větší míře než zdravé tkáně. To dává komplexním sloučeninám obsahující tento prvek terapeutickou výhodu oproti jiným kovům a jsou tak slibnou vizí do budoucna.

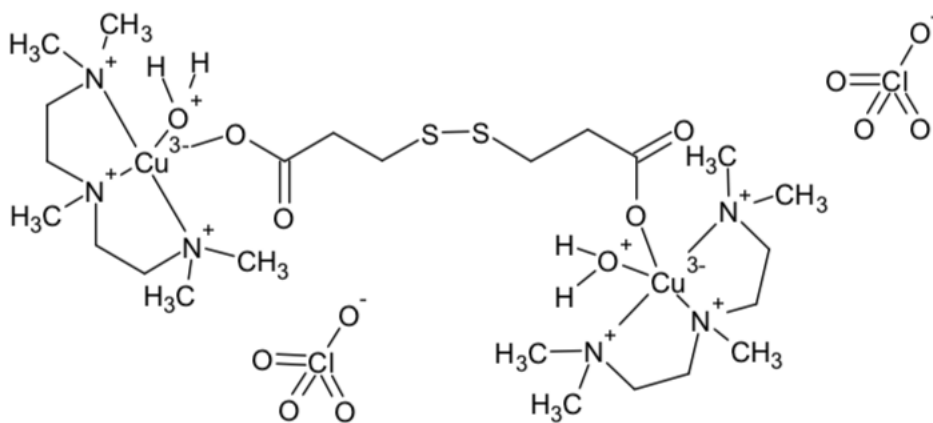
Terapeutické účinky mědi jsou důsledkem vysoké redoxní aktivity tohoto kovu. Principem fungování měďnatých komplexů jakožto léčiv může být rozličná – příkladem je tvorba aduktů měďnatých iontů s glutathionem. V důsledku zablokování glutathionu vznikají ve větší míře volné kyslíkové radikály ROS, které mohou atakovat cílové buňky. Dalšími možnými mechanismy, kterými může docházet k terapeutickým účinkům je inhibice aktivity proteazomu a aktivity telomerázy a také interkalace a degradace DNA (Chudal *et al.*, 2020).

V rámci této diplomové práce jsou testovány 2 koordinační sloučeniny mědi s dikarboxylovými kyselinami a *N* donorovými ligandy, viz Obr. 14. Jedná se o komplexy K5, kde je můstkovým ligandem anion kyseliny fumarové; a komplex K6, u kterého je přítomen anion kyseliny dithiodipropionové. *N* ligandem je u obou komplexů shodně *N,N,N',N'',N''*-pentamethyldiethylentriamin. U těchto komplexů byly prokázány antimikrobiální účinky. Antimikrobiální účinek vůči testovaným bakteriálním kulturám a minimální inhibiční koncentrace těchto komplexů jsou uvedeny v následující Tab. 6. U obou komplexů byla prokázána nestabilita v roztoku. Komplex K6 pak na rozdíl od komplexu K5 vykazoval interakci s NADH. Opačná situace pak byla zjištěna při testování interkalace komplexu do DNA – komplex K5 interkaluje do dsDNA, zatímco komplex K6 nikoliv (Loubalová, 2021; Loubalová *et al.*, 2023).





$[\text{Cu}_2(\text{pmdien})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-fu})](\text{ClO}_4)_2$   
**Komplex K5**



$[\text{Cu}_2(\text{pmdien})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-dtdp})](\text{ClO}_4)_2$   
**Komplex K6**

Obrázek 14 – Struktura testovaných komplexů K5 a K6 (upraveno podle Loubalová *et al.*, 2023)

Tabulka 6 – Minimální inhibiční koncentrace komplexů K5 a K6 (upraveno podle Loubalová *et al.*, 2023)

Testovaná bakteriální kultura	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Komplex	MIC [mg/l]			
K5	8,4	2,1	4,2	1,1
K6	16,9	1,1	8,4	8,4

### 2.3.2 Interakce antimikrobiálních léčiv a mědi s cytochromy P450

Je známo, že některá antimikrobiální léčiva mohou způsobovat změnu aktivity některé z forem cytochromu P450. Typickým příkladem inhibice cytochromu P450 se dostavuje při současném podávání léků trimetoprimu a sulfametoxazolu (léčivo souhrnně označované jako kotrimoxazol). Tato kombinace antibiotik působí jako velmi účinné antimikrobiální léčivo předepisované k léčbě infekčních onemocnění močových cest. Je u něho ovšem prokázána selektivní inhibice CYP2C9. Proto se při užívání této látky zvažuje úprava dávkování warfarinu, který je taktéž metabolizován CYP2C9 (Carpenter *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2002).

Další antibiotikum – chloramfenikol – způsobuje řadu lékových interakcí. Toto širokospektrální antibiotikum není lékem první volby a je indikováno až při rozsáhlejších, zejména anaerobních infekcích. Mezi nežádoucí účinky této látky totiž patří i inhibiční účinek na enzymy CYP2C19, CYP3A4 a slabě i CYP2D6 (Park *et al.*, 2003). Zrovna tak i řada makrolidových antibiotik jako jsou erytromycin a klarytromycin způsobují silnou nekompetitivní inhibici CYP3A4 (Muirhead *et al.*, 2002). Ve studii (Niwa *et al.*, 2016) byla testována tři antibiotika odvozená od penicilinu – konkrétně amoxicilin, ampicilin a piperacilin. Z výsledků vyplývá, že tato  $\beta$ -laktamová antibiotika nezpůsobují inhibici CYP3A4, CYP2D6 ani CYP2C9. Snížení aktivity bylo zaznamenáno u cytochromu CYP2C8 v přítomnosti amoxicilinu (hodnota  $IC_{50} = 0,83 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a u piperacilinu ( $IC_{50} = 1,14 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Posledním příkladem antibiotika se zjištěným účinkem na aktivitu cytochromů P450 je kyselina fusidová indikovaná k léčbě bakteriálních infekcí kůže a měkkých tkání. Tato látka však způsobuje nekompetitivní inhibici CYP2D6 a smíšenou kompetitivní inhibici CYP3A4 (Chen *et al.*, 2017).

V současné době intenzivně studovaný komplex disulfiram-měď s protinádorovým účinkem byl rovněž podroben studiu interakcí s významnými cytochromy P450 v metabolismu léčiv. Studie byla koncipována k odhalení případné indukce cytochromů CYP3A4 a CYP1A2. Výsledek ukázal, že vlivem tohoto komplexu k indukci těchto forem nedochází (Vrzal *et Dvořák*, 2016). Podobně byla testována také koordinační sloučenina mědi  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{C-dmg})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ . U této látky nebyla zaznamenána indukce CYP, ale bylo zjištěno, že komplex mírně inhiboval

cytochromy CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C8 a CYP3A4 (Ahmad *et al.*, 2018).

Další studie (Tang *et al.*, 2018) zkoumala vliv samotné mědi na expresi a aktivitu cytochromů P450 v potkaních játrech. Krysám byla denně perorálně podávána dávka nanomědi, mikromědi nebo iontu mědi. U všech testovaných laboratorních zvířat byly zvýšené jaterní zánětlivé markery, avšak nejzávažnější situace byla pozorována u krys exponovaných nanočásticím mědi. Nanoměď rovněž nejvíce inhibovala expresi a aktivitu jaterních enzymů CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 mechanismem závislým na dávce.

# **Experimentální část**

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Chemikálie

#### - chemikálie

Pro experimenty provedené v rámci této diplomové práce byly použity následující chemikálie: Firma Sigma Aldrich (Praha, Česká republika) byla dodavatelem DL-isocitrátu (ISO), nikotinamidadeninukleoid fosfátu (NADP<sup>+</sup>) a enzymu isocitrátdehydrogenázy (IDH). Firma Lach-ner, (Neratovice, Česká republika) byla prodejcem dihydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnanu draselného, hydroxidu sodného a draselného, octanu a uhličitanu a chloridu sodného, dále i chloroformu, kyseliny fosforečné a síranu hořečnatého. Organické látky jako methanol, ethanol, propan-2-ol, acetonitril a dichlormethan byly pořízeny od firmy VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie).

Kyselina octová a kyselina chloristá byly zakoupeny od firmy Penta (Praha, Česká republika). Plynný oxid uhelnatý a plynný dusík byl dodán firmou Technoplyn (Česká republika).

#### - substráty, inhibitory a standardy

Dále byly pro stanovení aktivity CYP použity následující substráty a standardy: testosteron, diklofenak, bufuralol, resorufin, 1'-hydroxybufuralol byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika); 6β-hydroxytestosteron od firmy Ultrafine (Manchester, UK). Dále pak ethoxyresorufin a 4'-hydroxydiklofenak byly dodány firmou Fluka (Buchs, Švýcarsko).

Rovněž byly využity specifické inhibitory testovaných CYP, konkrétně chinidin, furafylin, sulfafenazol a troleandomycin zakoupené od společnosti Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

#### - testované látky

V rámci této práce byl sledován účinek dvou anorganických koordinačních sloučenin mědi na aktivitu jaterních enzymů CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4. Komplexy byly poskytnuty skupinou prof. RNDr. Pavla Kopela, Ph.D. z Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Komplexy byly syntetizovány v rámci diplomové práce Mgr. Ivany Loubalové – struktury obou komplexů viz Obr. 14

- Komplex K5 –  $[\text{Cu}_2(\text{pmdien})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-fu})](\text{ClO}_4)_2$
- Komplex K6 –  $[\text{Cu}_2(\text{pmdien})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-dtdp})](\text{ClO}_4)_2$

#### - mikrosomy

Směsné prasečí mikrosomy byly izolovány a charakterizovány v rámci této diplomové práce z komerčně dostupných prasečích jater. Lidské směsné jaterní mikrosomy byly komerčně dodány firmou Biopredic (Saint Grégoire, Francie). Mikrosomy byly získány od 17 dárců (7 žen a 10 mužů), celková koncentrace proteinů činila 25 mg/ml, s koncentrací P450 14,55  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.2 Přístrojové vybavení

Experimenty byly provedeny za použití následujících laboratorních přístrojů a pomůcek:

- Analytické váhy XP 205 DeltaRange, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- Automatická analytická multipipeta M4 Eppendorf (Hamburg, Německo)
- BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, kat. č. 23225, Waltham, USA)
- Centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie)
- Centrifuga MiniSpin, Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francie)
- Inkubovaná třepačka TS-100, Biosan (Riga, Lotyšsko)
- Magnetická míchačka MR1000, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline, VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Orbitální třepačka MS 3 digital, IKA, MERCI (Brno, Česká republika)
- pH metr CG 843 SCHOTT, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- Pipetovací špičky a mikrozkmavky, Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Sada automatických pipet s rozsahem 0,1–2,5 µl; 0,5–10 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl; 1–10 ml, Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Sestava pro výrobu deionizované vody s konduktometrem Ultrapur, Watrex (Praha, Česká republika)
- Sonikátor K10, Kraintek (Podhájska, Slovensko)
- Spektrofotometr Infinite M200, Tecan (Männedorf, Švýcarsko)
- Ultracentrifuga ultracentrifuga Optima<sup>TM</sup> LE-80K (Beckman, Praha, Česká republika)
- UV-VIS spektrofotometr Cary 4000, Varian (Palo Alto, USA)
- Váhy PB3002-S/PH DeltaRange, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- Vialky, VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Vodní lázeň WB 14, Memmert (Schwabach, Německo)
- Vortex Heidolph Reax Top, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- HPLC Shimadzu (Kyoto, Japonsko)
  - o kontrola systému CBM-20A: UV detektor RF-10AXL; VIS detektor SPD-20A; termostat CTO-20AC; autosampler SIL-20AC; pumpa LC-20AD a software LabSolutions
  - o kolona dlouhá: LichroCart RP-18: 250x4 mm, s předkolonou 4x4 mm, Merck (Darmstadt, Germany)
  - o kolona krátká: Chromolith RP-18: 100x4,6 mm, monolitická, s předkolonou 5x4,6 mm, Merck (Darmstadt, Germany)

Pro zpracování výsledků a tvorbu obrázků a grafů byly použity následující programy: Microsoft Office (Microsoft, Praha, Česká republika), TECAN Infinity (Tecan, Grödig, Rakousko), LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), Sigma plot 13 (SPSS, Chicago, USA) a ChemSketch (ACDlabs, Toronto, Kanada).

### **3.3 Experimentální metody**

#### **3.3.1 Izolace mikrosomální frakce z prasečích jater**

Mikrosomální frakce byla izolovaná z prasečí jaterní tkáně dle zavedené metody (Guengerich *et* Martin, 1998). Nejprve byla změřena a zaznamenána původní hmotnost jater. Kousky jaterní tkáně byly homogenizovány v homogenizačním přístroji PreCellys Elution s programem 2x 15 sekund při 7200 rpm v homogenizačním roztoku o objemu odpovídajícím trojnásobku výchozí váhy jater. Homogenát byl přenesen do centrifugačních zkumavek a byl centrifugován při 4 °C a 6500 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odpipetován do nových centrifugačních zkumavek a byla provedena další centrifugace po dobu 25 minut při 11000 rpm a 4 °C. Díky této centrifugaci byla v supernatantu získána mitochondriální, lysosomální a peroxisomální frakce.

Supernatant byl přenesen do ultracentrifugačních zkumavek. Byla provedena ultracentrifugace při 4 °C a 35000 rpm po dobu 1 hodiny. Dále byl zpracováván sediment obsahující požadovanou mikrosomální frakci. Sediment byl pomocí homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema homogenizován s promývacím pufrem o objemu jednonásobku váhy původní jaterní tkáně. Suspenze byla centrifugována při 4 °C a 35000 rpm po dobu 1 hodiny. Supernatant byl odstraněn a sediment mikrosomální frakce byl rehomogenizován pomocí homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema v rehomogenizačním roztoku o objemu odpovídajícím 0,2násobku původní váhy jater. Vzniklá suspenze mikrosomální frakce byla přenesena do mikrozkušavek a uchována při -70 °C k dalšímu použití.

#### **3.3.2 Stanovení koncentrace cytochromů P450 v izolované mikrosomální frakci**

Mikrosomální frakce byla 10krát naředěna 50mmol·l<sup>-1</sup> fosfátovým pufrem (pH 7,4). Ke směsi byl přidán dithioničitan sodný, který zredukoval železité ionty hemoproteinových enzymů na ionty železnaté. Směs byla přenesena do 2 kyvet. Kyvety byly umístěny do dvoupraprskového spektrofotometru Varian a bylo provedeno měření baseline, tedy nulového bodu v rozsahu vlnových délek 300–500 nm rychlostí 2 nm/s.

Přední kyveta byla vyjmuta ze spektrofotometru a směs byla probublána oxidem uhelnatým po dobu 15 sekund za vzniku komplexu Fe<sup>2+</sup>-CO. Připravený vzorek byl opět vložen do spektrofotometru a bylo provedeno opětovné měření.

Ze získaného spektra byly odečteny hodnoty absorbance při 450 nm (nativní cytochromy P450), při 420 nm (degradované cytochromy P450), a absorbance  $A_0$ , která byla podle polohy spektra přičtena nebo odečtena od hodnot  $A_{450}$  a  $A_{420}$ . Z těchto hodnot byla následně vypočtena koncentrace cytochromů P450 a koncentrace P420 podle následujících vzorců:

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_0}{\varepsilon \cdot l} \cdot \text{\textit{\textit{ředení}}} = \frac{A_{450} - A_0}{0,091} \cdot \text{\textit{\textit{ředení}}} [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$$

$$c_{P420} = \frac{A_{420} - A_0 - \left[ -0,041 \cdot \left( \frac{A_{450} - A_0}{0,091} \right) \right]}{0,111} \cdot \text{\textit{\textit{ředení}}} [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$$

### 3.3.3 Stanovení celkové koncentrace proteinů v izolované mikrosomální frakci

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku byl použit komerční kit BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit. Tato metoda je založena na reakci kyseliny bicinchoninové s  $\text{Cu}^{2+}$  za vzniku modro-fialového komplexu, který je spektrofotometricky stanovován při 562 nm. Nejprve byla připravena koncentrační řada standardu BSA – hovězího sérového albuminu – o koncentracích 0; 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 mg/ml. Poté byl připraven vzorek námi izolované mikrosomální frakce, který byl 50krát naředěn  $100\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátovým pufrům. Na mikrotitrační desku bylo přeneseno 12,5  $\mu\text{l}$  každého vzorku ve třech technických replikátech (3x koncentrační řada, slepý vzorek a mikrosomální frakce). Ke všem vzorkům bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  směsi roztoků A+B (v poměru 50+1), které jsou součástí používaného kitu.

Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 30 minut ve tmě. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení na přístroji TECAN M200 při vlnové délce 562 nm. Z koncentrační řady byla získána kalibrační křivka, stanovena rovnice regrese a koeficient determinace  $R^2$ . Na základě rovnice regrese byla vypočtena koncentrace proteinu ve vzorku mikrosomální frakce.

### 3.3.4 Stanovení aktivity izolované mikrosomální frakce ( $K_m$ , $v_{\max}$ )

Pro stanovení aktivit jednotlivých forem cytochromu P450 byly využity specifické substráty. Pro stanovení kinetických parametrů enzymové reakce byly připraveny reakční směsi obsahující vzestupnou koncentrační řadu specifického substrátu, NADPH generující systém ( $0,8\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADP<sup>+</sup>;  $5,8\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  isocitrát;  $8\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml) a mikrosomy dle Tab. 7. Směsi byly do celkového reakčního objemu doplněny  $100\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátovým pufrům (pH 7,4) a byly inkubovány při 37 °C. Následně byla provedena HPLC analýza metabolitu přeměněného sledovanou formou P450. Získané koncentrace vzniklého metabolitu byly zpracovány do grafů, ze kterých byly následně odečteny  $K_m$  (Michaelisova konstanta) a  $v_{\max}$  (maximální rychlost reakce). Hodnota  $K_m$  byla použita v inhibičních esejích jako koncentrace substrátu pro zajištění ideálních podmínek reakce.



Tabulka 7 – Pipetovací schéma pro měření kinetických parametrů izolované mikrosomální frakce

Forma P450	Prasečí forma P450	Substrát [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace substrátu [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	NADPH g.s. [ $\mu\text{l}$ ]	Mikrosomy [ $\mu\text{l}$ ]	Reakční objem [ $\mu\text{l}$ ]
CYP1A2	CYP1A2	Ethoxyresorufin 50 $\mu\text{l}$	0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100	29	3,5	100
CYP2C9	CYP2C33	Diklofenak 8 $\mu\text{l}$	1, 56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100	77,5	35	200
CYP2D6	CYP2D25	Bufuralol 14 $\mu\text{l}$	3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200	65	6,75	200
CYP3A4/5	CYP3A29/39	Testosteron 100 $\mu\text{l}$	10; 50; 100; 150; 200; 300; 400; 500	155	10	500

### 3.3.5 Měření vazebného spektra komplexů K5 a K6

Pro spektrofotometrické stanovení vazebného spektra byly připraveny roztoky testovaných komplexů K5 a K6 – o koncentraci  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dále byl připraven roztok mikrosomální frakce o koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vazebné spektrum bylo změřeno na dvoupaprskovém spektrofotometru Varian. Měření bylo provedeno postupným ředěním roztoku mikrosomů – do měřicí kvyety přidáván roztok komplexu a do srovnávací kvyety totožné množství fosfátového pufru (pH 7,4). Ředění bylo prováděno v rozsahu koncentrací komplexu  $0\text{--}200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v reakční směsi.

### 3.3.6 Vliv testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu cytochromů P450

V rámci této diplomové práce byl testován inhibiční potenciál komplexů K5 a K6 na enzymovou aktivitu nejdůležitějších forem cytochromu P450 – CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5, jimž odpovídají prasečí orthology CYP1A2, CYP2C33, CYP2D25, CYP3A29/39. Pro stanovení aktivity jednotlivých forem cytochromu P450 byly připraveny reakční směsi obsahující potenciální inhibitor K5 a K6 o koncentraci  $0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nulová koncentrace inhibitoru sloužila jako kontrola reprezentující 100% aktivitu stanovovaného enzymu. Do reakčních směsí byl dále přidáván NADPH generující systém ( $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP<sup>+</sup>;  $5,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  isocitrát;  $8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  MgSO<sub>4</sub>; isocitrátdehydrogenasa  $0,3 \text{ U/ml}$ ) a mikrosomy. Směsi byly do celkového reakčního objemu doplněny  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátovým pufrem (pH 7,4).

Po provedení HPLC analýzy reakčních směsí dle zavedených metod bylo provedeno grafické zpracování dat za účelem stanovení hodnoty  $IC_{50}$ ,  $K_i$  a typu inhibice.

Všechny experimenty byly prováděny ve dvou technických opakováních. Pro stanovení typu inhibice byly provedeny tytéž experimenty s obměnami jako jsou zkrácení doby preinkubace na 3 minuty, změna koncentrace specifického substrátu ( $0,5 K_m$ ,  $2 K_m$  a  $4 K_m$ ) a ověření inhibice specifickým inhibitorem a na lidské mikrosomální frakci. Experimentální podmínky pro stanovení jednotlivých enzymových aktivit jsou uvedeny v následujících Tab. 8–11.

Tabulka 8 – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP1A2 (CYP1A2 u prasete)

<b>CYP1A2</b>	<b>O-deethylace 7-ethoxyresorufinu</b>
Reakční objem	100 $\mu$ l
Inhibitor	0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50 $\mu$ mol $\cdot$ l $^{-1}$ komplex (K5 nebo K6)
Mikrosomy	35 pmol/RS
NADPH generující systém	0,8mmol $\cdot$ l $^{-1}$ NADP $^{+}$ ; 6mmol $\cdot$ l $^{-1}$ isocitrát; 8mmol $\cdot$ l $^{-1}$ MgSO $_4$ ; IDH (0,3 U/ml)
<b>Preinkubace 30 min (37 °C)</b>	
Substrát	2,8 $\mu$ mol $\cdot$ l $^{-1}$ ethoxyresorufin
<b>Inkubace 15 min (37 °C)</b>	
Zastavení reakce	200 $\mu$ l methanolu
Centrifugace	14000 rpm (10 min; 22 °C)
<b>Parametry HPLC</b>	
HPLC stanovení	Fluorescenční, excitace při 535 nm, emise při 585 nm
Stanovovaný metabolit	Resorufin
Retenční čas	6,128 min
Mobilní fáze	A: 25mmol $\cdot$ l $^{-1}$ Na $_2$ HPO $_4$ (pH = 7,0) / 100% methanol (58/42; v/v)
Eluce	Izokratická
Průtok	0,8 ml/min
Tlak	13,8 MPa
Nástřik vzorku	50 $\mu$ l
Kolona	Dlouhá

Tabulka 9 – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP2C9 (CYP2C33 u prasete)

<b>CYP2C9; CYP2C33</b>	<b>4'-hydroxylace diklofenaku</b>
Reakční objem	200 $\mu$ l
Inhibitor	0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> komplex (K5 nebo K6)
Mikrosomy	350 pmol/RS
NADPH generující systém	0,8mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> NADP <sup>+</sup> ; 6mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> isocitrát; 8mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ; IDH (0,3 U/ml)
<b>Preinkubace 30 min (37 °C)</b>	
Substrát	45 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> diklofenak
<b>Inkubace 25 min (37 °C)</b>	
Zastavení reakce	50 $\mu$ l ACN/ kyselina octová (94/6; v/v)
Centrifugace	14000 rpm (10 min; 4 °C)
<b>Parametry HPLC</b>	
HPLC stanovení	UV při 280 nm
Stanovovaný metabolit	4'-hydroxydiklofenak
Retenční čas	9,1 min
Mobilní fáze	A: 2,85mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> / ACN (7/3; v/v) B: 100% methanol
Eluce	Gradientová 0,01 min – 30% B; 17 min – 90% B; 17,5 min – 100% B; 20 min – 100% B; 21 min – 30% B; 30 min – 30% B
Průtok	1 ml/min
Tlak	8,3–5 MPa
Nástřik vzorku	50 $\mu$ l
Kolona	Dlouhá

Tabulka 10 – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP2D6 (CYP2D25 u prasete)

<b>CYP2D6; CYP2D25</b>		<b>1'-hydroxylace bufuralolu</b>
Reakční objem	200 $\mu$ l	
Inhibitor	0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> komplex (K5 nebo K6)	
Mikrosomy	67,3 pmol/RS	
NADPH generující systém	0,8mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> NADP <sup>+</sup> ; 6mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> isocitrát; 8mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ; IDH (0,3 U/ml)	
<b>Preinkubace 30 min (37 °C)</b>		
Substrát	70 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> bufuralol	
<b>Inkubace 20 min (37 °C)</b>		
Zastavení reakce	20 $\mu$ l 70% HClO <sub>4</sub>	
Centrifugace	14000 rpm (10 min; 4 °C)	
<b>Parametry HPLC</b>		
HPLC stanovení	Fluorescenční, excitace při 252 nm, emise při 302 nm	
Stanovovaný metabolit	1'-hydroxybufuralol	
Retenční čas	3,6 min	
Mobilní fáze	A: 2,85mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> / ACN (7/3; v/v) B: 100% ACN	
Eluce	Gradientová 0,01 min – 0% B; 5 min – 0% B; 5,83 min – 100% B; 8 min – 100% B; 8,83 min – 0% B; 15 min – 0% B	
Průtok	1,5 ml/min	
Tlak	11,1 MPa	
Nástřik vzorku	5 $\mu$ l	
Kolona	Dlouhá	

Tabulka 11 – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP3A4/5 (CYP3A29/39 u prasete)

<b>CYP3A4/5; CYP3A29/39 6β-hydroxylace testosteronu</b>	
Reakční objem	500 μl
Inhibitor	0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50 μmol·l <sup>-1</sup> komplex (K5 nebo K6)
Mikrosomy	100 pmol/RS
NADPH generující systém	0,8 mmol·l <sup>-1</sup> NADP <sup>+</sup> ; 6 mmol·l <sup>-1</sup> isocitrát; 8 mmol·l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ; IDH (0,3 U/ml)
<b>Preinkubace 30 min (37 °C)</b>	
Substrát	80 μmol·l <sup>-1</sup> testosteron
<b>Inkubace 20 min (37 °C)</b>	
Zastavení reakce	100 μl 1 mol·l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 2 mol·l <sup>-1</sup> NaCl
Vytřepání do organické fáze	2000 μl dichlormethanu Vortex 15 s
Centrifugace	3000 rpm (5 min; 4 °C)
Odebrat 1000 μl spodní organické fáze	
Odpařit pomocí plynného dusíku	
Rozpustit ve 200 μl 40% methanolu	
<b>Parametry HPLC</b>	
HPLC stanovení	UV při 245 nm
Stanovovaný metabolit	6β-hydroxytestosteron
Retenční čas	4,7 min
Mobilní fáze	A: deionizovaná voda B: 100% methanol
Eluce	Gradientová 0,01 min – 40% B; 11 min – 40% B; 12 min – 100% B; 13 min – 100% B; 14 min – 40% B; 20 min – 40% B
Průtok	1 ml/min
Tlak	10 MPa
Nástřik vzorku	25 μl
Kolona	Krátká

### **IC<sub>50</sub> Shift Assay**

Pokud byl pozorován rozdíl v aktivitě CYP při krátké (3minutové) a dlouhé (30minutové) inkubaci byla provedena IC<sub>50</sub> Shift Assay. Při tomto experimentu byly porovnávány hodnoty IC<sub>50</sub> ve 3 různých experimentálních podmínkách – bez preinkubace (0 minut), s 30minutovou preinkubací bez NADPH generujícího systému; a 30minutová preinkubace s NADPH. Složení reakční směsi i HPLC stanovení bylo stejné jako u stanovení aktivity dané formy cytochromu P450. Pokud experimentálně získané hodnoty IC<sub>50</sub> klesají ve směru 0 min; 30 min (bez NADPH) a 30 min (s NADPH) je testovaná látka klasifikována jako časově závislý inhibitor (TDI = time dependent inhibitor) (Grimm *et al.*, 2009). Tímto experimentem lze rovněž rozlišit reverzibilní a ireverzibilní inhibice. Pokud je inhibitor reverzibilní, není pozorována žádná změna a všechny 3 reakční podmínky poskytují stejné hodnoty (Obach *et al.*, 2006).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Izolace a charakterizace prasečí mikrosomální frakce

Izolace mikrosomální frakce byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 3.3 Experimentální metody. Tímto postupem byly získány jednotlivé mikrosomální frakce. Z izolovaných frakcí byly vybrány čtyři, z nichž byla připravena směsná prasečí mikrosomální frakce. Ta byla následně využívána při enzymových esejích pro stanovení aktivity a inhibice jednotlivých forem CYP.

V následující Tab. 12 jsou uvedeny získané hodnoty koncentrace proteinů, koncentrace cytochromu P450 a vypočítaný specifický obsah. Stejným způsobem pak byla charakterizována směsná prasečí mikrosomální frakce v Tab. 13.

Tabulka 12 – Charakterizace jednotlivých izolovaných prasečích mikrosomálních frakcí

Prasečí mikrosomy	Koncentrace proteinů $c_{\text{prot}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	Koncentrace cytochromů P450 $c_{\text{P450}} [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	Specifický obsah [nmol/mg]
1	15,77	9,36	0,59
2	6,60	3,45	0,52
3	5,30	2,10	0,39
4	22,49	5,30	0,24
5	42,24	24,85	0,59
6	41,10	14,30	0,35
7	43,23	12,75	0,29

Směsné prasečí mikrosomy byly připraveny smícháním frakcí 3, 5, 6 a 7 z předchozí tabulky v poměru 1/1/1/1 (v/v) do celkového objemu 10 ml. Směs byla rozdělena do eppendorfek po 500  $\mu\text{l}$ , zamražena a použita v následujících experimentech.

Tabulka 13 – Charakterizace směsné prasečí mikrosomální frakce

Směsný vzorek	Koncentrace proteinů $c_{\text{prot}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	Koncentrace cytochromů P450 $c_{\text{P450}} [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	Specifický obsah [nmol/mg]
3, 5, 6, 7	36,91	12,09	0,33

### Aktivita mikrosomální směsi

V rámci charakterizace připravené směsné mikrosomální frakce bylo provedeno stanovení aktivit testovaných prasečích forem CYP1A2, CYP2C33, CYP2D25 a CYP3A29/39. Připravené reakční směsi byly podrobeny HPLC analýze. Z výsledků HPLC byly zpracovány grafy, z nichž byly odvozeny kinetické parametry  $K_m$  a  $v_{max}$ . Hodnota  $K_m$  dále sloužila jako hodnota ideální koncentrace substrátu při testování inhibičního vlivu testovaných látek na aktivitu CYP.

Z výsledků zpracovaných v Tab. 14 vyplývá, že vhodná koncentrace substrátu pro jednotlivé formy jsou následující: CYP1A2 –  $2,8\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  7-ethoxyresorufin, CYP2C33 –  $45\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  diklofenak, CYP2D25 –  $70\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bufuralol, CYP3A29/39 –  $80\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  testosteron, u kterého byla hodnota  $K_m$  úmyslně navýšena oproti stanovené hodnotě.

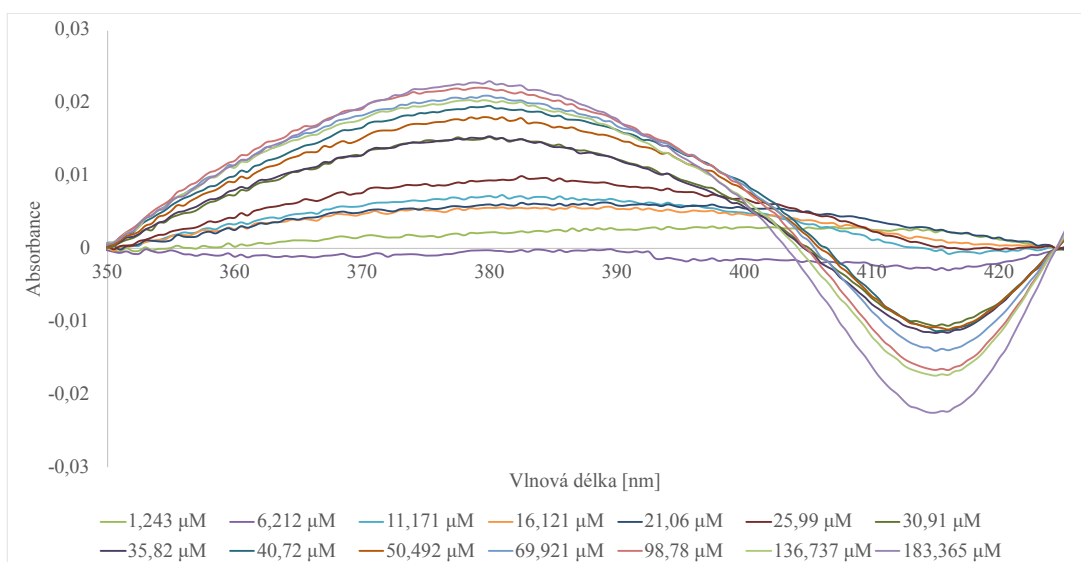
Tabulka 14 – Získané kinetické parametry ( $K_m$ ,  $v_{max}$ ) pro jednotlivé testované formy CYP

Forma P450	Specifická reakce	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$v_{max}$ [nmol/RS]
CYP1A2	O-deetylace 7-ethoxyresorufinu	$2,72 \pm 0,69$	$0,014 \pm 0,001$
CYP2C33	4'-hydroxylace diklofenaku	$43,08 \pm 4,95$	$0,179 \pm 0,008$
CYP2D25	1'-hydroxylace bufuralolu	$69,40 \pm 7,60$	$0,36 \pm 0,01$
CYP3A29/39	6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu	$54,05 \pm 24,63$	$3,52 \pm 0,38$

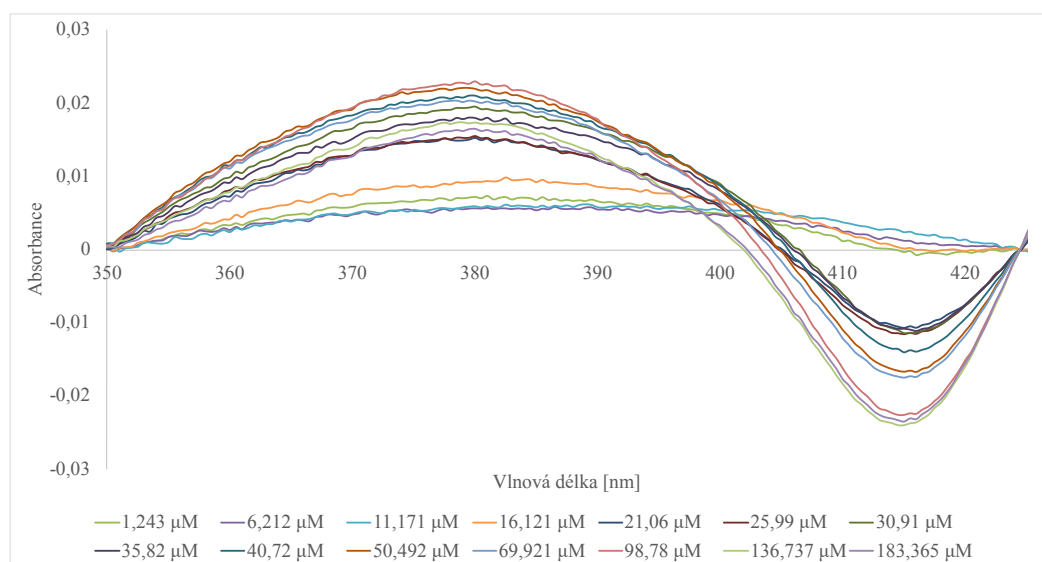
### Vazebné spektrum komplexů K5 a K6 se směsnou prasečí mikrosomální frakcí

Měřením vazebného spektra testovaných komplexů vůči směsné prasečí mikrosomální frakci bylo zjištěno, že dané komplexy vykazují vazbu na CYP (viz Obr. 15 – komplex K5 a Obr. 16 – komplex K6). Konkrétně se jedná o vazbu typu 1, která je charakteristická pro vazbu do aktivního místa. Na základě výsledků měření byly zpracovány grafy na Obr. 17 a byly vypočteny vazebné konstanty  $K_s$  pro oba testované komplexy. Pro komplex K5 odpovídá  $K_s = 34,57 \pm 8,33 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pro komplex K6 je tato hodnota rovna  $K_s = 10,39 \pm 2,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

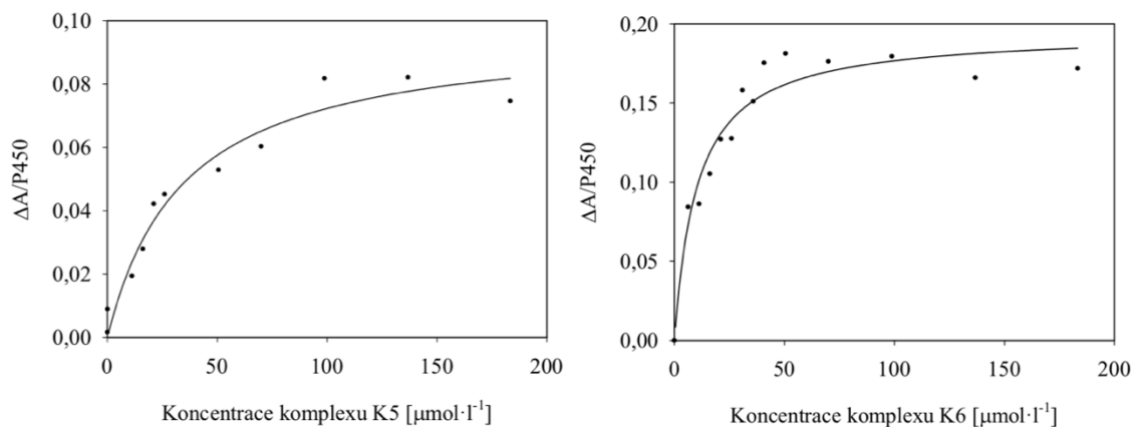




Obrázek 15 – Vazebné spektrum směsných prasečích jaterních mikrosomů se vzrůstající koncentrací komplexu K5



Obrázek 16 – Vazebné spektrum směsných prasečích jaterních mikrosomů se vzrůstající koncentrací komplexu K6



Obrázek 17 – Vazebná spektra testovaných komplexů K5 a K6 se směsnou prasečí mikrosomální frakcí ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

## 4.2 Vliv testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu cytochromů P450

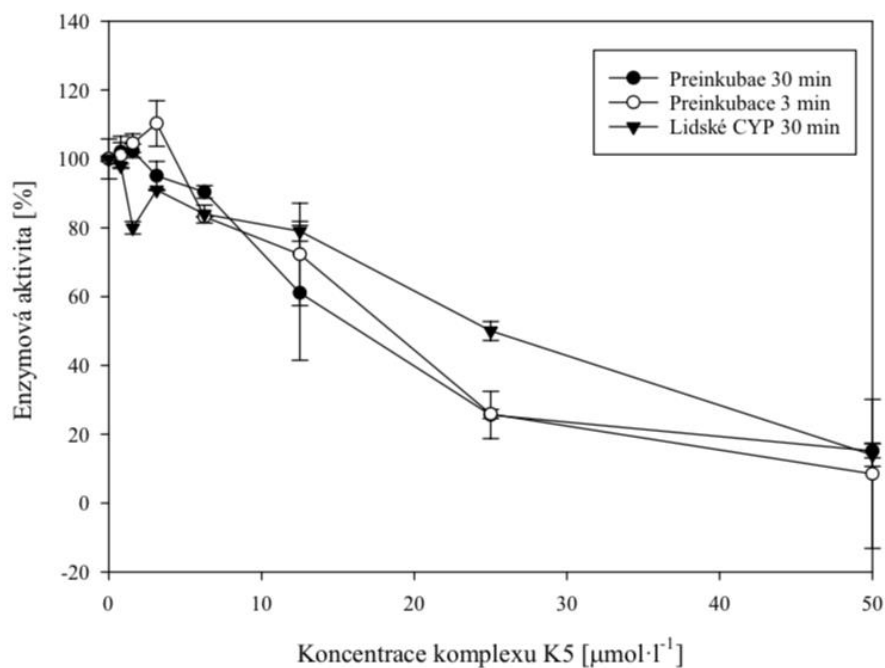
V rámci experimentální části této diplomové práce byl studován inhibiční vliv testovaných látek – dvou dvoujaderných komplexů mědi – komplexů K5 a K6 na vybrané formy cytochromu P450. Experimenty byly prováděny nejprve na směsné prasečí jaterní mikrosomální frakci, která byla izolována a charakterizována v rámci této práce. Prasečí mikrosomy byly zvoleny na základě vysoké podobnosti studovaných enzymů k lidským. Zvolenými formami cytochromu P450 pro studium inhibičního vlivu komplexů byly CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5 u lidí, čemuž odpovídají orthologické CYP1A2, CYP2C33, CYP2D25, CYP3A29/39 u námi využívaného prasečího modelu. Tyto formy CYP byly zvoleny proto, že se jedná o nejdůležitější formy P450 v metabolismu léčiv. Pro stanovení aktivity těchto forem byly využity markerové reakce se specifickými substráty, kterými jsou CYP1A2 – *O*-deetylace 7-ethoxyresorufinu; CYP2C9 (CYP2C33) – 4'-hydroxylace diklofenaku; CYP2D6 (CYP2D25) – 1'-hydroxylace bufuralolu; a CYP3A4/5 (CYP3A29/39) – 6β-hydroxylace testosteronu.

V první fázi byly provedeny experimenty na prasečích mikrosomech se vzrůstající koncentrací testovaných látek (K5 a K6 o koncentracích 0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Na základě změny aktivity enzymu při vzrůstající koncentraci testované látky byla potvrzena či vyvrácena inhibice. Experimenty byly prováděny při krátké (3 min) a dlouhé (30 min) preinkubaci pro vyhodnocení časové závislosti inhibice. Výsledné inhibiční křivky jsou shrnuty na Obr. 18–25, hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pak v Tab. 15.

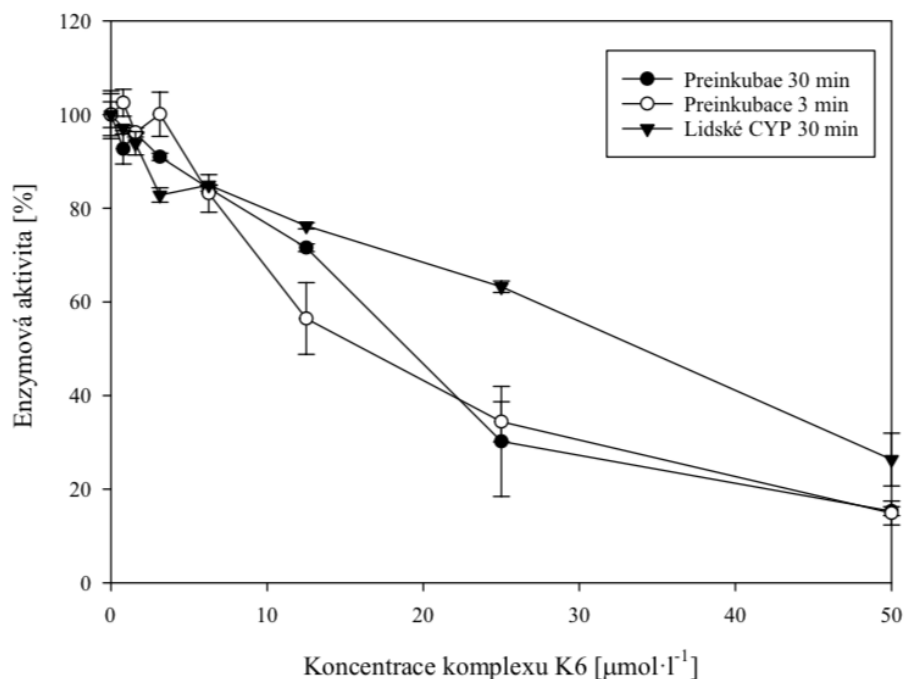
Výsledky studia enzymové aktivity prasečího enzymu CYP1A2 ukázaly, že oba testované komplexy K5 i K6 inhibují jeho aktivitu. Při nejvyšší testované koncentraci potenciálního inhibitoru, tj., 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  klesla aktivita CYP1A2 na 15 % shodně u obou komplexů. Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro tuto formu CYP odpovídají  $13,46 \pm 0,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K5 a  $17,09 \pm 2,09 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro K6. Druhou sledovanou formou cytochromu P450 byl prasečí enzym CYP2C33, u něhož ve zvoleném rozsahu koncentrací testovaných komplexů nebyla zaznamenána inhibice aktivity tohoto enzymu. Aktivita CYP2C33 při 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  neklesla o více než 50 %, proto nebylo možné stanovit hodnotu  $\text{IC}_{50}$ . Dalším sledovaným cytochromem byl CYP2D25. U této formy klesla aktivita při nejvyšší testované koncentraci až na 1 % (u komplexu K5) a na 4 % (u komplexu K6). Naměřené hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro CYP2D25 byly následující:  $24,22 \pm 9,42 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro K5 a  $19,73 \pm 7,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro K6. Posledním studovaným cytochromem byl prasečí enzym CYP3A29/39, který odpovídá lidskému CYP3A4/5. V případě této formy poklesla aktivita při nejvyšší sledované koncentraci potenciálních inhibitorů (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na 10 % u komplexu K5 ( $\text{IC}_{50} 12,47 \pm 1,14 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a na 4 % u komplexu K6 ( $\text{IC}_{50} 13,01 \pm 1,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Ve druhé fázi byly provedeny srovnávací experimenty na lidské jaterní mikrosomální frakci. Výsledky těchto pokusů ukázaly rozdíl u lidské formy CYP2C9 / prasečí CYP2C33. Na rozdíl od prasečích mikrosomů, u kterých nebyla nalezena žádná inhibice, u lidských

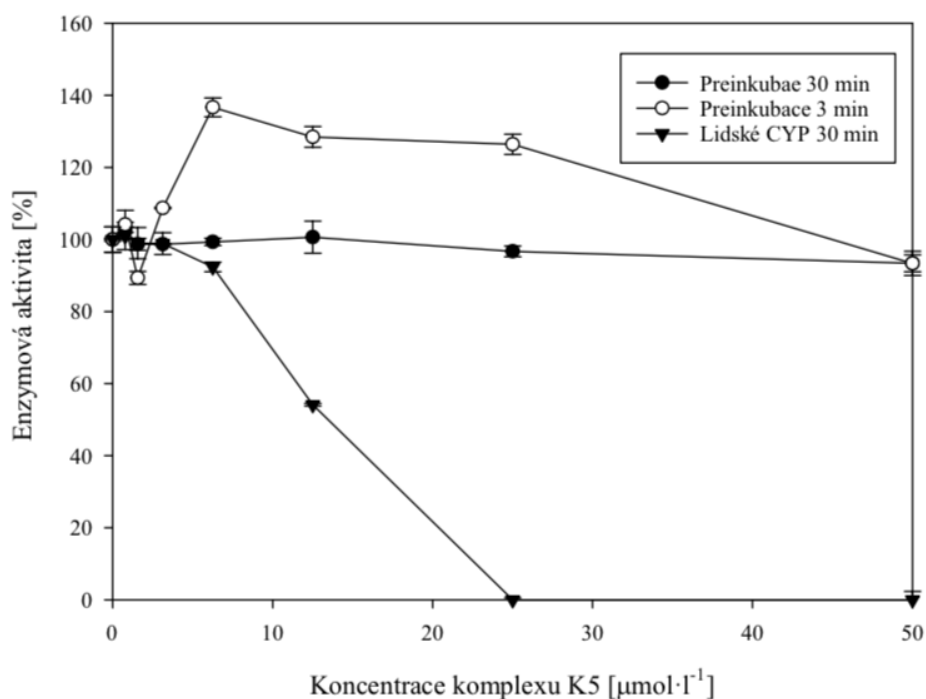
mikrosomů byla nulová aktivita tohoto enzymu zaznamenána již při druhé nejvyšší koncentraci, tj.  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u obou testovaných komplexů K5 ( $\text{IC}_{50} 13,04 \pm 0,37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) i K6 ( $\text{IC}_{50} 10,77 \pm 0,36 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). U formy CYP1A2 byla hodnota  $\text{IC}_{50}$  vyšší v případě lidských oproti prasečím mikrosomům. Naopak tomu bylo u forem CYP2D6 a CYP3A4/5, kde byla hodnota  $\text{IC}_{50}$  u lidských mikrosomů o přibližně  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nižší než u prasečích orthologů (viz Tab. 16).



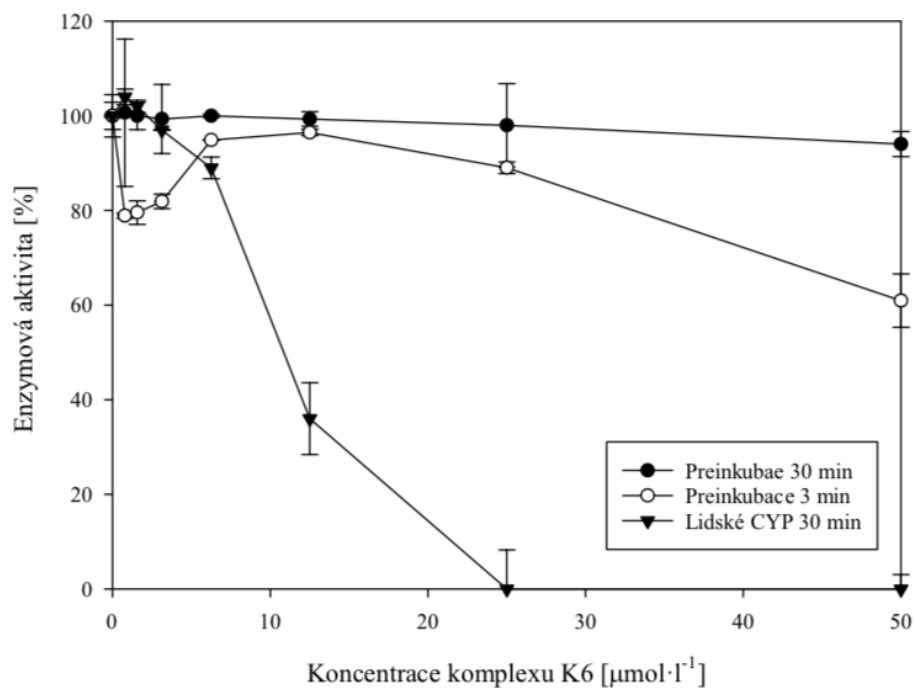
Obrázek 18 – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP1A2 u lidí / CYP1A2 u prasat (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu)



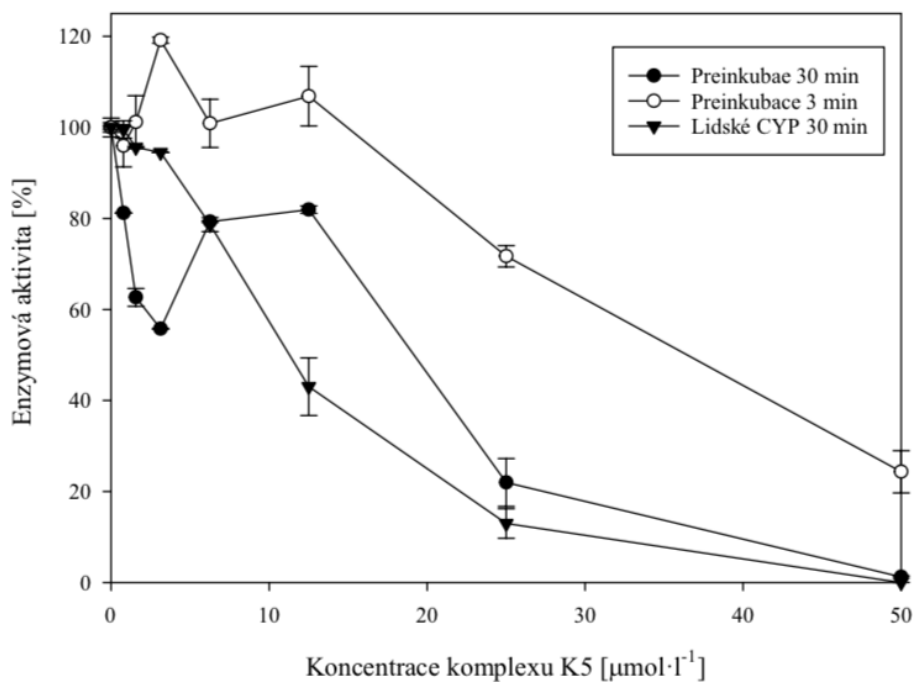
Obrázek 19 – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP1A2 u lidí / CYP1A2 u prasat (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu)



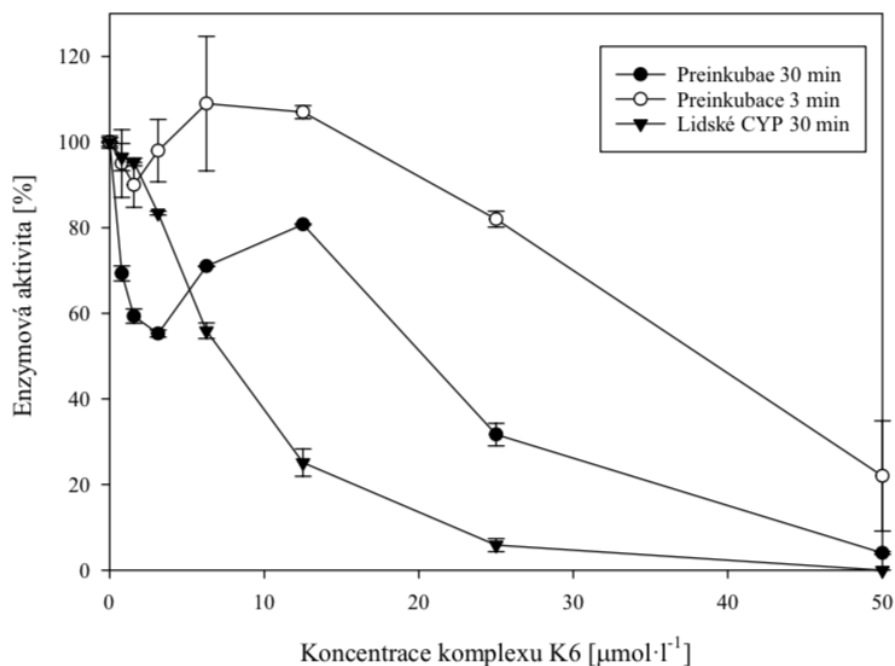
Obrázek 20 – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2C9 u lidí / CYP2C33 u prasat (4'-hydroxylace diklofenaku)



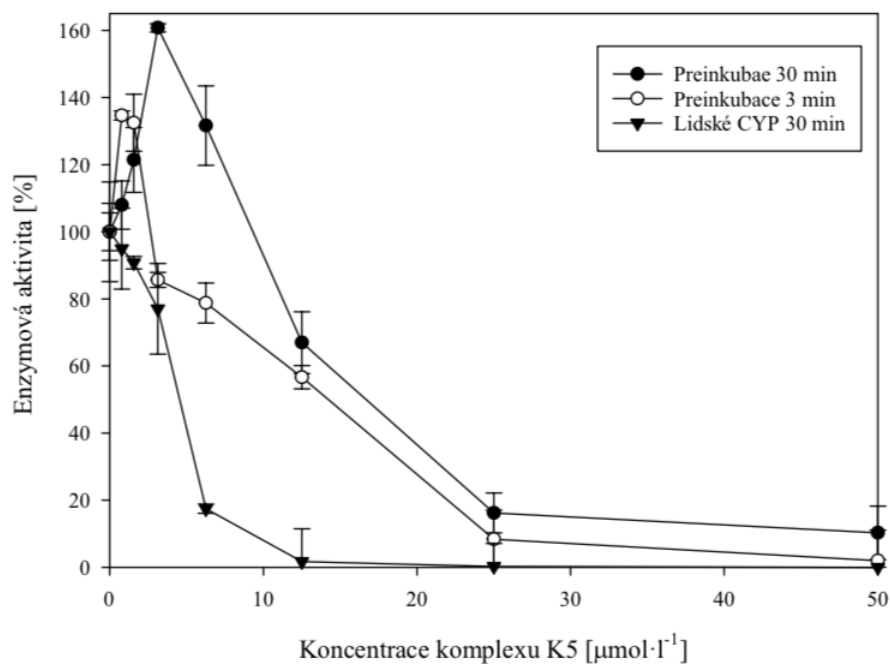
Obrázek 21 – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2C9 u lidí / CYP2C33 u prasat (4'-hydroxylace diklofenaku)



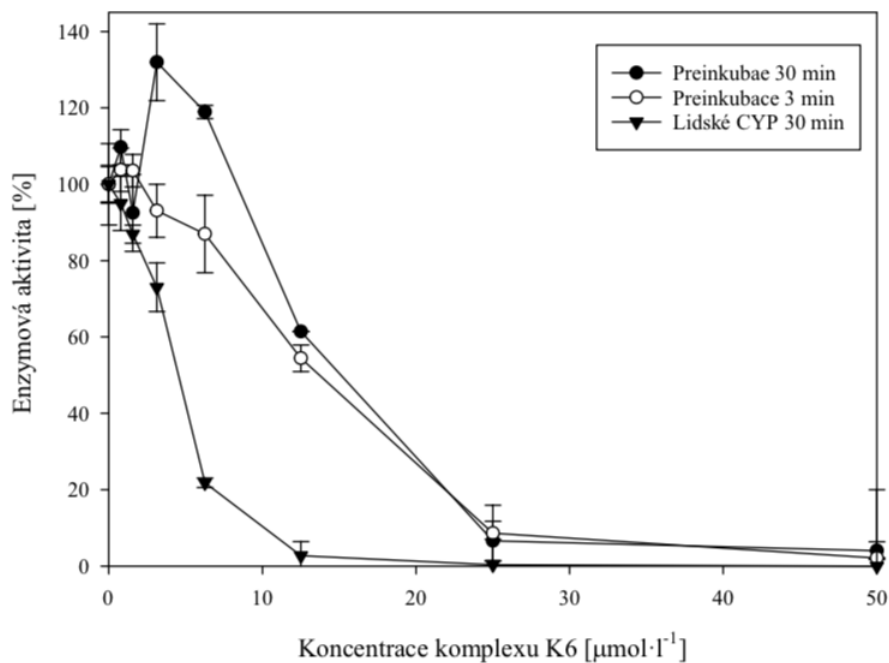
Obrázek 22 – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2D6 u lidí / CYP2D25 u prasat (1'-hydroxylace bufuralolu)



Obrázek 23 – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2D6 u lidí / CYP2D25 u prasat (1'-hydroxylace bufuralolu)



Obrázek 24 – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP3A4/5 u lidí / CYP3A29/39 u prasat ( $6\beta$ -hydroxylace testosteronu)



Obrázek 25 – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP3A4/5 u lidí / CYP3A29/39 u prasat ( $6\beta$ -hydroxylace testosteronu)

Tabulka 15 – Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných komplexů K5 a K6 s prasečími mikrosomy

Testovaný CYP	Orthologický CYP u prasete	Komplex K5	Komplex K6	Časová závislost
		IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]		
CYP1A2	CYP1A2	13,46 ± 0,69	17,09 ± 2,09	Ne
CYP2C9	CYP2C33	>50	>50	Ne*
CYP2D6	CYP2D25	24,22 ± 9,42	19,73 ± 7,69	Ne
CYP3A4/5	CYP3A29/39	12,47 ± 1,14	13,01 ± 1,02	Ne

\* Ověřeno pomocí IC<sub>50</sub> Shift Assay (viz následující Tab. 17)

Tabulka 16 – Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných komplexů K5 a K6 s lidskými mikrosomy

Testovaný CYP	Komplex K5	Komplex K6
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	
CYP1A2	24,43 ± 4,77	26,53 ± 4,84
CYP2C9	13,04 ± 0,37	10,77 ± 0,36
CYP2D6	11,61 ± 0,61	7,39 ± 0,18
CYP3A4/5	4,35 ± 0,17	4,36 ± 0,24

U cytochromů CYP1A2, CYP2C33, CYP3A29/39 nebyla pozorována změna mezi krátkou (3 min) a dlouhou (30 min) preinkubací, proto bylo vyhodnoceno, že inhibice u těchto forem není závislá na čase. U CYP2D25 bylo přistoupeno k IC<sub>50</sub> Shift Assay, která má za cíl potvrdit nebo vyvrátit časovou závislost inhibice. Výsledné hodnoty získané na základě tohoto experimentu jsou shrnuty v Tab. 17. Provedená IC<sub>50</sub> Shift Assay neprokázala časovou závislost inhibice ani u jednoho z testovaných komplexů.

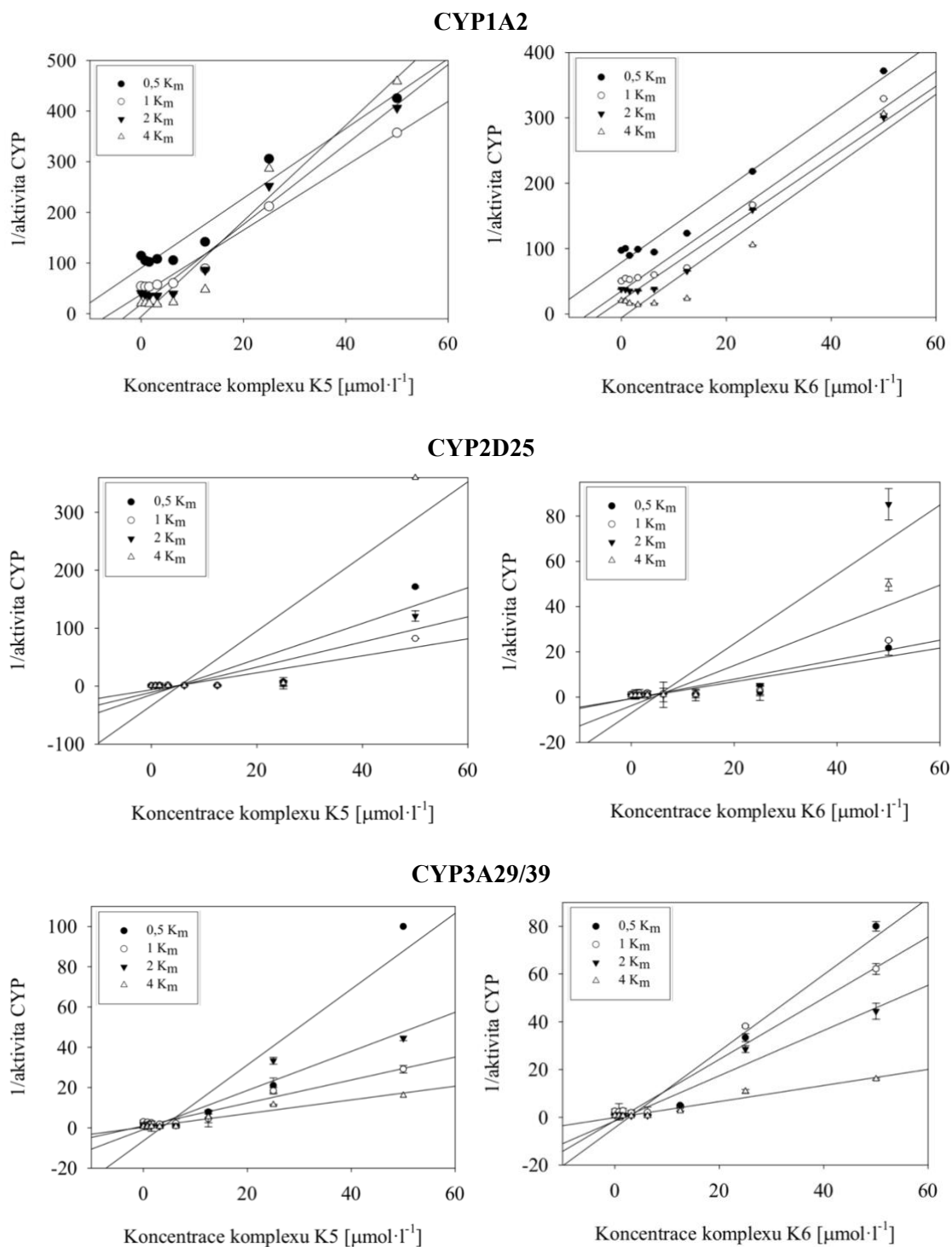
Tabulka 17 – Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných komplexů K5 a K6 vůči CYP2D25 v rámci experimentu IC<sub>50</sub> Shift Assay

Reakční podmínky	IC <sub>50</sub> Shift Assay	
	Komplex K5	Komplex K6
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	
0 minut	30,77	30,87
30 minut bez NADPH	23,37	22,86
30 minut s NADPH	29,90	31,25

Dále byly provedeny experimenty se změnou koncentrace specifického substrátu. Koncentrace substrátů byly upraveny podle stanovené koncentrace  $K_m$ , tak aby výsledné koncentrace specifického substrátu v reakční směsi odpovídaly hodnotám  $0,5 K_m$ ,  $2 K_m$  a  $4 K_m$ . Z výsledků provedených experimentů byly sestrojeny Dixonovy grafy (Obr. 26), Lineweaverovy-Burkovy grafy (Obr. 27) a byly určeny jednotlivé inhibiční konstanty  $K_i$  a typy inhibice (Tab. 18).

Z analýzy těchto grafů je patrné, že typ inhibice se u obou testovaných látek K5 a K6 mírně liší. U sledovaného enzymu CYP1A2 se pravděpodobně jedná o nekompetitivní typ inhibice v případě komplexu K5 a o plně akompetitivní inhibici v přítomnosti testovaného inhibitoru K6. U dalšího sledovaného cytochromu P450 – CYP2D25 odpovídající lidské formě CYP2D6 – se pravděpodobně jedná o inhibici parciálně kompetitivní způsobenou komplexem K5 a parciálně akompetitivní způsobenou komplexem K6 v nižších testovaných koncentracích. U vyšších testovaných koncentrací komplexů ( $25$  a  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  K5 nebo K6) pak zřejmě dochází k silné interakci mezi enzymem CYP2D25 a testovanou látkou. V případě enzymu CYP3A29/39, orthologické k lidské formě CYP3A4/5, pak docházelo vlivem obou testovaných komplexů K5 i K6 k inhibici, jejíž mechanismus je zřejmě parciálně kompetitivní.





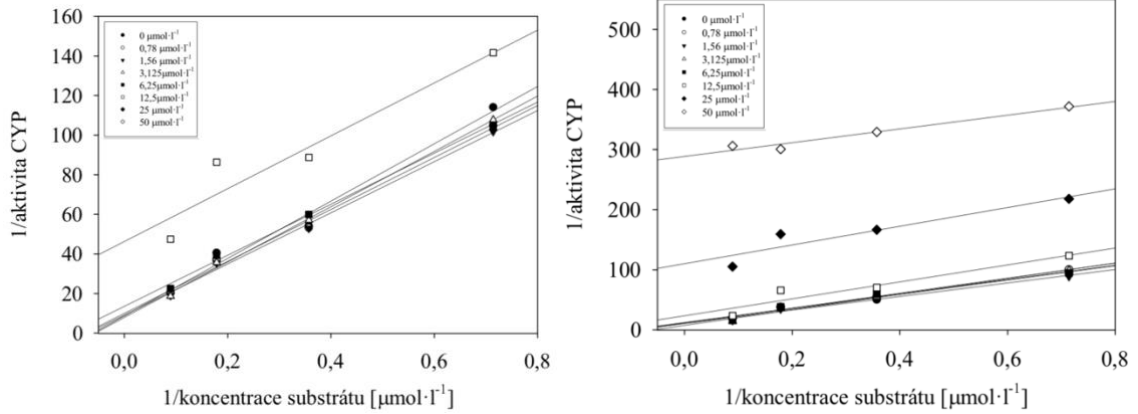
Obrázek 26 – Dixonovy výnosy inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

CYP1A2 – 7-ethoxyresorufin ( $0,5 K_m = 1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 K_m = 2,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 K_m = 5,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 K_m = 11,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

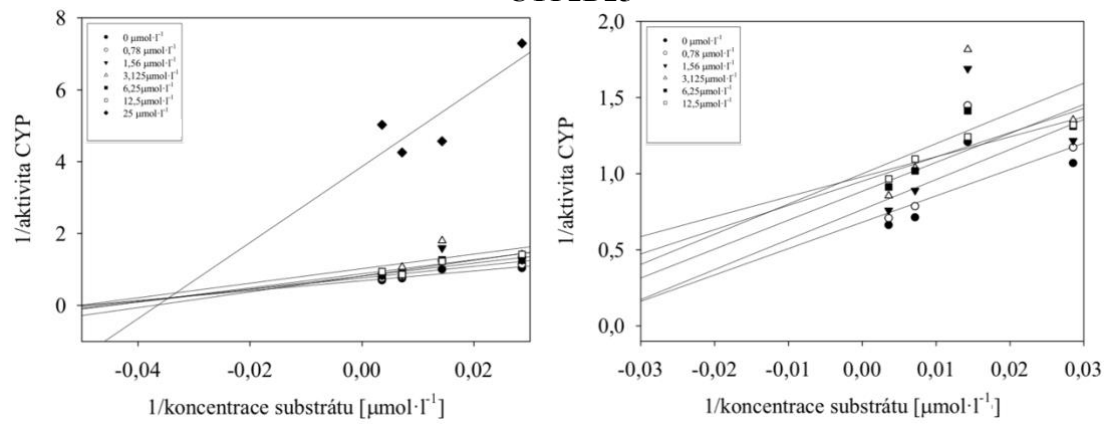
CYP2D25 – bufuralol ( $0,5 K_m = 35 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 K_m = 70 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 K_m = 140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 K_m = 280 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

CYP3A29/39 – testosteron ( $0,5 K_m = 40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 K_m = 80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 K_m = 160 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $4 K_m = 320 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

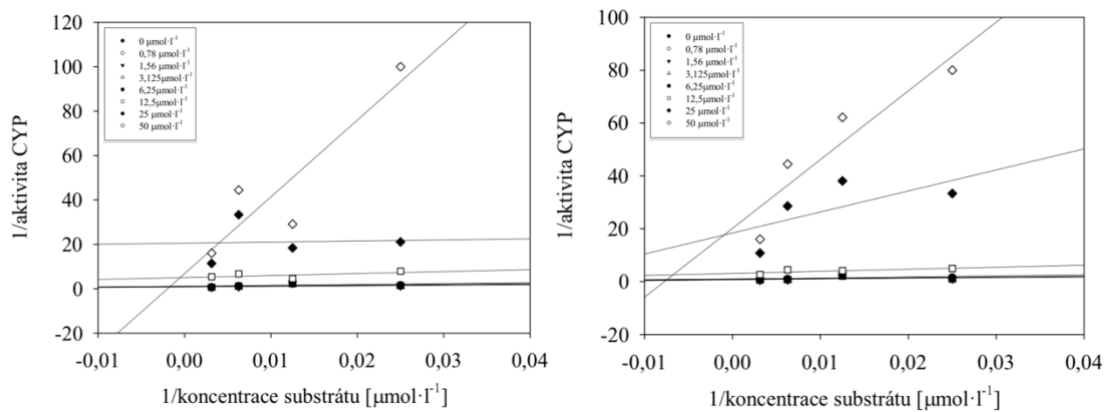
### CYP1A2



### CYP2D25



### CYP3A29/39



Obrázek 27– Lineweaverovy-Burkovy výnosy inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

CYP1A2 – 7-ethoxyresorufin ( $1/[S]: 0,5 K_m = 0,714, 1 K_m = 0,357, 2 K_m = 0,179, 4 K_m = 0,089$ )

CYP2D25 – bufuralol ( $1/[S]: 0,5 K_m = 0,029, 1 K_m = 0,014, 2 K_m = 0,007, 4 K_m = 0,004$ )

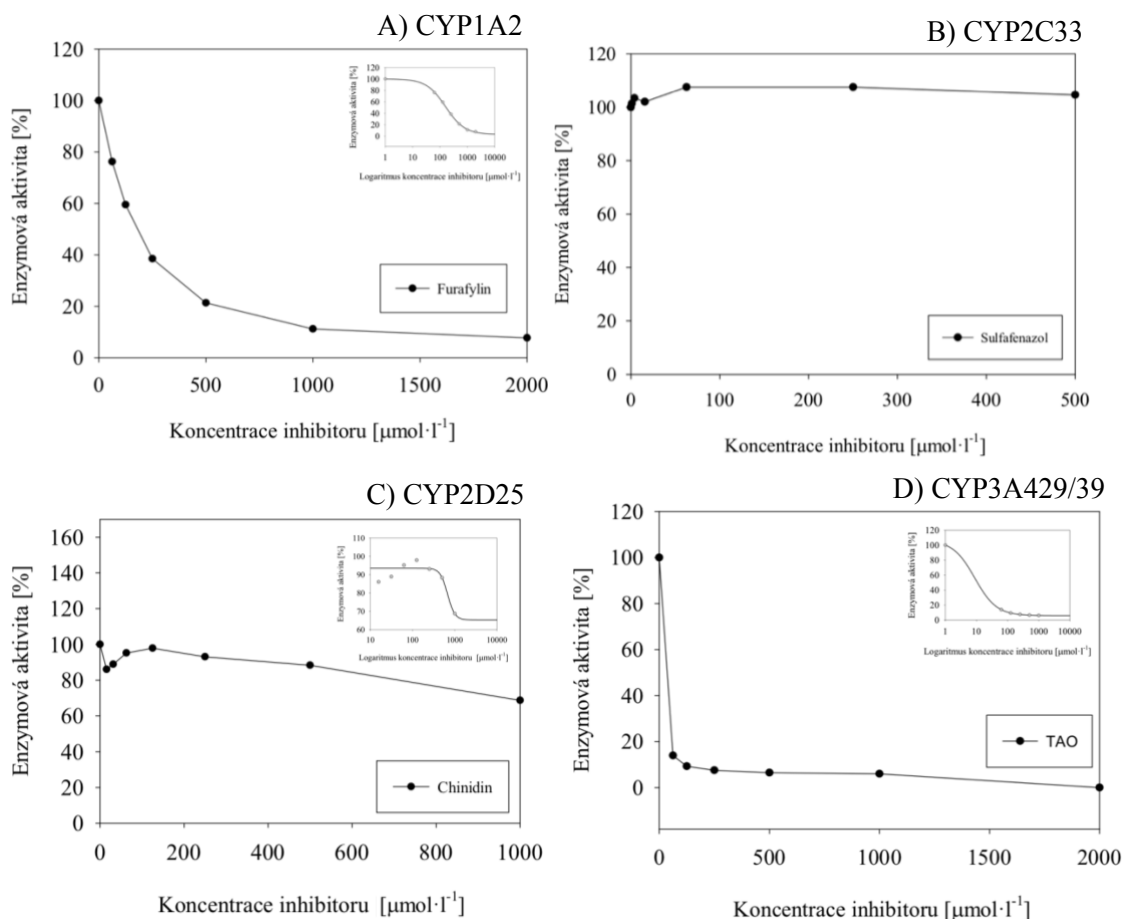
CYP3A29/39 – testosteron ( $1/[S]: 0,5 K_m = 0,025, 1 K_m = 0,013, 2 K_m = 0,006, 4 K_m = 0,003$ )

Tabulka 18 – Shrnutí inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

<b>Komplex K5</b>			
<b>Testovaný CYP</b>	<b>Orthologický CYP u prasete</b>	<b>K<sub>i</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Typ inhibice</b>
CYP1A2	CYP1A2	14,06	Nekompetitivní
CYP2D6	CYP2D25	5,50	Parciálně kompetitivní
CYP3A4/5	CYP3A29/39	5,46	Parciálně kompetitivní
<b>Komplex K6</b>			
<b>Testovaný CYP</b>	<b>Orthologický CYP u prasete</b>	<b>K<sub>i</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Typ inhibice</b>
CYP1A2	CYP1A2	11,42	Akompetitivní
CYP2D6	CYP2D25	5,67	Parciálně akompetitivní
CYP3A4/5	CYP3A29/39	4,18	Parciálně kompetitivní

### 4.3 Ověření specifity použitých prasečích mikrosomů

Závěrečné experimenty provedené v rámci této práce sloužily k ověření specifity použité prasečí mikrosomální frakce pomocí specifických inhibitorů lidských forem cytochromu P450. Byl použit furafylin – specifický inhibitor lidského CYP1A2; sulfafenazol – specifický inhibitor lidského CYP2C9; chinidin – specifický inhibitor lidského CYP2D6 a troleandomycin (TAO) – specifický inhibitor lidského CYP3A4/5. Tyto experimenty, jejichž výsledky jsou zpracovány v Obr. 28, ukázaly, že sulfafenazol, jež je specifickým inhibitorem lidské formy CYP2C9 není specifický pro námi používaný prasečí mikrosomální model. Pro sulfafenazol není možné určit hodnotu IC<sub>50</sub>. Pro zbylé 3 testované specifické inhibitory byly vypočteny hodnoty IC<sub>50</sub>, které jsou shrnuty v Tab. 19.



Obrázek 28 – Inhibiční vliv specifických inhibitorů na enzymovou aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

A) CYP1A2 – inhibitor furafylin (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

B) CYP2C33 – inhibitor sulfafenazol (0; 0,95; 3,9; 15,6; 62,5; 250; 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

C) CYP2D25 – inhibitor chinidin (0; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

D) CYP3A29/39 – inhibitor troleandomycin (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

Tabulka 19 – Naměřené hodnoty  $\text{IC}_{50}$  testovaných komplexů K5 a K6 s prasečími mikrosomy

Testovaný CYP	Orthologický CYP u prasete	Specifický inhibitor	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
CYP1A2	CYP1A2	Furafylin	$159,38 \pm 5,61$
CYP2C9	CYP2C33	Sulfafenazol	<500
CYP2D6	CYP2D25	Chinidin	$673,09 \pm 2,69$
CYP3A4/5	CYP3A29/39	Troleandomycin	$8,82 \pm 1,52$

## 5 DISKUZE

V současné době čelíme v souvislosti s léčbou bakteriálních onemocnění velkému problému, kterým je rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům a antimikrobiálním látkám. Bakterie nesoucí rezistentní schopnosti může díky horizontálnímu přenosu sdílet tuto výhodu s dalšími bakteriemi, a tím vzniká antimikrobiálně rezistentní biofilm. Rezistence vůči antimikrobiálním látkám může být i vícenásobná, v takových případech mluvíme o polyrezistentních kmenech způsobujících vážné mnohdy neléčitelné infekce. Z tohoto důvodu se novodobý vědecký výzkum soustředí na vývoj nových látek s antimikrobiální aktivitou, které by mohly podpořit a v některých případech nahradit konvenční antibiotickou léčbu.

Příkladem alternativních cest, kterými se výzkum v oblasti antimikrobiálních léčiv vydal jsou antibakteriální vakcíny, imunomodulační látky, bakteriofágy, lysiny, AMP (antimikrobiální peptidy), antimikrobiální léčiva na bázi kovových nanočástic a látky na bázi mědi, stříbra a jódu. V rámci této diplomové práce byly sledovány 2 koordinační sloučeniny mědi s dikarboxylovými kyselinami a *N* donorovými ligandy (*N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriamin). Konkrétně se jednalo o komplexy K5, kde byl můstkovým ligandem anion kyseliny fumarové a komplex K6, u kterého byl přítomen anion kyseliny dithiodipropionové. U těchto komplexů byla prokázána antimikrobiální aktivita vůči bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* a s nižší účinností pak i u *Escherichia coli* (Loubalová *et al.*, 2023). Zmíněné testované komplexy K5 a K6 byly v rámci této diplomové práce podrobeny *in vitro* experimentům studujícím inhibiční vliv těchto látek na aktivitu nejdůležitějších cytochromů P450 v metabolismu léčiv, kterými jsou CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5. Pokusy byly prováděny dle zavedených metod s využitím HPLC metody.

Studie vlivu potenciálních léčiv na aktivitu cytochromů P450 jsou prováděny při vývoji všech nových léčiv. Důvodem sledování právě těchto enzymů jsou hrozící lékové interakce. Cytochromy P450 se jakožto jaterní enzymy účastní první fáze metabolismu převážné většiny používaných léčiv. Pokud by nové léčivo výrazně inhibovalo aktivitu některého ze sady cytochromů P450, hrozila by akumulace léčiv standardně metabolizovaných daným cytochromem, který vlivem inhibice nemůže plnit svou funkci. Tím by došlo k výraznému nárůstu plazmatické koncentrace léčiva v organismu, zvýšila by se pravděpodobnost projevu nežádoucích a toxických účinků léčiva a došlo by k selhání terapie.

Experimenty byly prováděny na směsné prasečí jaterní mikrosomální frakci, protože prase je svým enzymovým profilem nejpodobnější lidskému. V prasečím modelu byly studovány formy cytochromu P450 CYP1A2, CYP2C33, CYP2D25 a CYP3A29/39, které jsou orthologické vůči lidským formám CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5 (Achour *et al.*, 2011). Pro srovnání a ověření námi zvoleného prasečího modelu byly experimenty provedeny i na směsných lidských mikrosomech.

Studium vazebného spektra komplexů K5 a K6 s prasečími mikrosomy ukázalo, že oba komplexy interagují s cytochromy P450 přítomnými v mikrosomální frakci. Podle profilu naměřených diferenčních UV-VIS spekter lze usoudit, že se jedná o vazbu typu I. Tento typ vazby je typický pro vazbu substrátu do aktivního místa. Průběh křivky byl charakteristický zvýšeným maximem při 390 nm, a poklesem při 420 nm. Vazbou látky do aktivního místa došlo k přechodu atomu železa do vysokospinového stavu a vytěsnění molekuly vody z aktivního místa (DeVore *et al.*, 2009).

Experimenty sledující změnu enzymové aktivity vybraných cytochromů P450 prokázaly inhibici CYP1A2, CYP2D25 a CYP3A29/39 ve směsné prasečí mikrosomální frakci. Markerová reakce pro studium aktivity CYP1A2, kterou byla *O*-deetylace 7-ethoxyresorufinu, ukázala snížení aktivity o 85 % při nejvyšší testované koncentraci komplexů K5 i K6. Aktivita CYP2C33 byla sledována pomocí reakce 4'-hydroxylace diklofenaku, u které nebylo zaznamenáno snížení aktivity o více než 10 %. Cytochrom CYP2D25 byl studován pomocí reakce 1'-hydroxylace bufuralolu. Výsledky při nejvyšší testované koncentraci testovaných komplexů, tj. 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  klesly téměř na nulovou aktivitu (pouhé 1 % aktivity u komplexu K5 a 4 % u komplexu K6). Poslední sledovaný a zároveň nejvýznamnější cytochrom CYP3A29/39 byl měřen na základě 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu. I u tohoto enzymu byla naměřena významná redukce aktivity, a to o 90 % u komplexu K5 a o 96 % u K6.

Na základě našich výsledků lze konstatovat, že inhibiční vliv testovaných komplexů K5 a K6 se projevoval velmi podobně u testovaných lidských forem CYP1A2, CYP2D6 a CYP3A4/5. U CYP2C33 (odpovídající lidskému CYP2C9) v případě prasečích mikrosomů k žádné inhibici nedošlo, avšak při použití lidských mikrosomů byla aktivita testovaných CYP značně inhibována. Tento výsledek naznačuje, že prasečí mikrosomy by mohly být vhodným experimentálním modelem pro cytochromy CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4/5 (respektive jejich orthology CYP1A2, CYP2D25 a CYP3A4/5), avšak nikoliv pro lidský CYP2C9. Experimentálně zjištěné hodnoty  $\text{IC}_{50}$  testovaných lidských forem CYP2D6 a CYP3A4/5 byly ve srovnání s jejich prasečími orthology o přibližně 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nižší. Naopak u formy CYP1A2 byla stanovená hodnota  $\text{IC}_{50}$  v lidské mikrosomální frakci o zhruba 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  vyšší než u prasečí.

Názor, že prasečí mikrosomy nejsou vhodným experimentálním modelem pro studium CYP2C9 podporuje i fakt, že prasečí CYP2C33 nebyl inhibován specifickým inhibitorem lidského CYP2C9 – sulfafenazolem. Námi izolované směsné prasečí mikrosomy se rovněž ukázaly jako méně citlivé vůči účinkům furafylinu na aktivitu CYP1A2. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  furafylinu vůči prasečímu CYP1A2 vyšla 159,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco u člověka odpovídá pouze 1,56  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Park *et al.*, 2022). Podobně tomu bylo i v případě inhibičního vlivu chinidinu na aktivitu CYP2D25/CYP2D6 –  $\text{IC}_{50}$  bylo 673,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u prasat, a pouze 0,051  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u člověka (Thu *et al.*, 2016). Specifický inhibitor CYP3A4/5 – troleandomycin – byl podobně citlivý, jak na prasečí CYP3A29/39 ( $\text{IC}_{50} = 8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), tak i na lidskou variantu tohoto enzymu –

CYP3A4/5 s  $IC_{50} = 1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Buckley *et al.*, 2010).

Dalším rozdílem pozorovaným mezi prasečí a lidskou jaterní mikrosomální frakcí byl nespecifický nárůst aktivity, ke kterému docházelo při sledování aktivit CYP2D25 a CYP3A29/39 v prasečích mikrosomech. Nárůst aktivity byl pozorován v rozmezí koncentrací  $1,56\text{--}12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  testovaných komplexů K5 a K6. Neznáme přesnou příčinu tohoto jevu, ale domníváme se, že by mohl být způsoben změnou struktury aktivního místa prasečích CYP testovanými komplexy K5 a K6.

Na základě analýzy vynesení dle Dixona a Lineweavera-Burka byl určen nejpravděpodobnější typ inhibice u testovaných komplexů K5 a K6 vůči prasečím cytochromům CYP1A2, CYP2D25 a CYP3A29/39. Komplex K5 byl na základě našich výsledků nekompetitivním inhibitorem CYP1A2 ( $K_i = 14,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tomu odpovídá i fakt, že v případě nekompetitivních inhibitorů byla hodnota  $K_i$  a  $IC_{50}$  stejná nebo velmi podobná. Při tomto typu inhibice se inhibitor váže na enzym do jiného místa, než je aktivní místo pro vazbu substrátu. Příkladem léčiva vykazující slabou inhibici nekompetitivního typu může být amiodaron. Amiodaron je lék podávaný jako antiarytmikum, u něhož je zaznamenána slabá inhibice CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5. Hodnoty  $K_i$  amiodaronu pro tyto enzymy jsou v rozsahu hodnot  $45\text{--}271 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Ohyama *et al.*, 2000).

Komplex K6 byl na základě námi získaných výsledků posouzen jako akompetitivní inhibitor CYP1A2. U akompetitivní inhibice se, na rozdíl od nekompetitivní, inhibitor neváže na samotný enzym, ale pouze na komplex enzym-substrát, a to do jiného místa, než je aktivní místo enzymu. V praxi je tento typ často doprovázen také kompetitivní inhibicí, a proto může být posuzován také jako smíšený typ inhibice (Madan *et al.*, 2001). Smíšený typ inhibice je znám u antifungálního léčiva – flukonazolu. Toto léčivo je středně silným inhibitorem CYP3A4/5 a při jeho používání je doporučeno monitorování hladin enzymů CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4/5. Hodnoty  $K_i$  vlivu flukonazolu na aktivitu CYP3A4/5 se pohybují v rozmezí  $10\text{--}17 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Niwa *et al.*, 2005).

Posledním typem inhibice, který byl pozorován v souvislosti se studovanými komplexy K5 a K6 je typ parciálně kompetitivní. Parciálně kompetitivní typ inhibice s největší pravděpodobností vykazoval komplex K5 v interakci s prasečími enzymy CYP2D25 a CYP3A29/39; komplex K6 pak v interakci s CYP3A29/39. Kompetitivní typ inhibice znamená, že se inhibitor váže do stejného vazebného místa jako substrát, tedy do aktivního místa enzymu. V tomto případě dochází k soutěžení inhibitoru a substrátu o vazbu do tohoto místa. Sulfafenazol může být příkladem léčiva, které způsobuje silnou kompetitivní inhibici CYP2C9 ( $K_i = 300 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Bourrié *et al.*, 1996). Pro kompetitivní a akompetitivní typ inhibice by měla hodnota  $K_i$  být menší než hodnota  $IC_{50}$ , což je v souladu s našimi výsledky a stanovenými typy inhibice.

Určení typu inhibice u prasečího cytochromu CYP2C33 nebylo možné, protože používané prasečí mikrosomy nevykazovaly inhibici vůči testovaným komplexům. Pro potvrzení hypotézy, že prasečí ortholog CYP2C33 zřejmě není vhodným experimentálním modelem pro studium lidského enzymu CYP2C9, by bylo vhodné experimenty sledující aktivitu tohoto enzymu provést v přítomnosti jiného markerového substrátu, například tolbutamidu nebo (*S*)-warfarinu. Nižší aktivita byla u prasečích mikrosomů oproti lidským zaznamenána také u CYP2D25, a to zejména v souvislosti se specifickým inhibitorem, jehož hodnota  $IC_{50}$  byla až o 4 řády nižší než u lidského CYP2D6. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky článku (Skaanild, 2006), jež uvádí, že prasečí mikrosomy jsou vhodné pro studium metabolismu a aktivity cytochromů CYP1A, CYP2A a CYP3A.

MIC neboli minimální inhibiční koncentrace stanovené pro testované komplexy K5 a K6 se pohybují v rozmezí 1,1–18,6  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Loubalová *et al.*, 2023), což jsou hodnoty řádově odpovídající v současnosti používaným antibiotikům (Andrews, 2001). U testovaných látek však byly zjištěny následující hodnoty inhibičních konstant  $K_i$ : CYP1A2 – 14,06  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; CYP2D25 – 5,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; CYP3A29/39 – 5,46  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K5 a CYP1A2 – 11,42  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; CYP2D25 – 5,67  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; CYP3A29/39 – 4,18  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro porovnání antibiotikum chloramfenikol, jehož hodnota MIC vůči bakteriím rodu *Enterobacteriaceae* se pohybuje v rozmezí 0,25–128  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , způsobuje silnou inhibici CYP3A4 ( $K_i = 10,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a slabou inhibici CYP2D6 ( $K_i = 75,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Park *et al.*, 2003).

Systémové podání by podle námi zjištěných výsledků pravděpodobně ovlivnilo metabolismus ostatních léků metabolizovaných prostřednictvím lidských forem cytochromů CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4/5. Lékové interakce by potenciálně byly možné i v případě CYP2C9, u něhož sice nebyla naměřena inhibice aktivity v prasečích mikrosomech, avšak po ověření na lidských CYP byla inhibice zaznamenána. O plazmatických koncentracích těchto komplexů však nejsou v literatuře žádné informace, proto detailnější popis potenciálních lékových interakcí není možný.

Vzhledem k množství provedených experimentů bylo otestování dalších forem cytochromů P450 nad rámec této diplomové práce. Pokud vezmeme v potaz dosavadní získané výsledky studovaných komplexů K5 a K6, je velmi málo pravděpodobné uvažovat o systémovém použití těchto látek. Reálná použitelnost komplexů je spatřena spíše v lokálním použití, k němuž se přiklání také autoři studovaných látek. Komplexy by mohly být potenciálně vhodné k léčbě těžce hojících se povrchových ran. Z farmakologického hlediska se nabízí pokračovat ve studiu komplexů cestou *in silico* modelování, stanovením metabolitů pomocí hmotnostní spektrometrie, případně studiem vlivu komplexů na další významné cytochromy P450 a studiem toxicity, než by se přistoupilo k testování komplexů na laboratorních zvířatech.



## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala studiem dvou potenciálních antimikrobiálních léčiv – komplexů K5 a K6 – z hlediska interakce s nejvýznamnějšími cytochromy P450, působící jako biotransformační enzymy v metabolismu léčiv. Byly provedeny *in vitro* experimenty s HPLC detekcí pro posouzení inhibičního vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu enzymů CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4/5. Pokusy byly prováděny na směsné prasečí jaterní mikrosomální frakci, izolované a charakterizované v rámci této práce, s využitím specifických substrátů jednotlivých lidských a prasečích forem CYP – 7-ethoxyresorufin pro CYP1A2; diklofenak pro CYP2C9 (prasečí ortholog CYP2C33); bufuralol pro CYP2D6 (prasečí ortholog CYP2D25); a testosteron pro CYP3A4/5 (prasečí ortholog CYP3A29/39).

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že oba komplexy K5 i K6 interagovaly se všemi sledovanými formami cytochromu P450:

- **CYP1A2**

Prasečí cytochrom CYP1A2 byl inhibován komplexem K5 i K6 s hodnotami  $IC_{50} = 13,46 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u komplexu K5 a  $IC_{50} = 17,09 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u komplexu K6. Na základě Dixonova a Lineweaver-Burkova výnosu byly určeny inhibiční konstanty pro oba komplexy. Pro komplex K5 byla získána hodnota  $K_i = 14,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pravděpodobně docházelo k nekompetitivní inhibici. V případě komplexu K6 byla inhibiční konstanta rovna  $11,42 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , přičemž typ inhibice byl zřejmě akompetitivní. Inhibice byla potvrzena na lidských mikrosomech i pomocí specifického inhibitoru – furafylinu.

- **CYP2C9 (prasečí CYP2C33)**

Další sledovaný cytochrom CYP2C9, respektive jeho prasečí ortholog CYP2C33, nebyl ve směsné prasečí mikrosomální frakci inhibován. Po ověření experimentu na směsných lidských jaterních mikrosomech byla však inhibice prokázána s hodnotou  $IC_{50} = 13,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K5 a  $IC_{50} = 10,77 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K6. Prasečí CYP2C33 nebyla citlivá vůči specifickému inhibitoru lidské formy CYP2C9, tedy vůči sulfafenazolu. Na základě těchto výsledků se domníváme, že prase zřejmě není vhodným experimentálním modelem pro studium této formy cytochromu P450.

- **CYP2D6 (prasečí CYP2D25)**

Aktivita prasečího cytochromu CYP2D25, který odpovídá lidskému CYP2D6, byla inhibována komplexem K5 ( $IC_{50} = 24,22 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a komplexem K6 ( $IC_{50} = 19,73 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Rovněž byly stanoveny inhibiční konstanty a typ inhibice. U komplexu K5 byla na základě výsledků stanovena parciálně kompetitivní inhibice

s  $K_i = 5,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U komplexu K6 byla určena parciálně akompetitivní inhibice s hodnotou  $K_i = 5,67 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pomocí  $\text{IC}_{50}$  Shift Assay byla u obou komplexů vyloučena časově závislá inhibice této formy cytochromu P450. Inhibice byla úspěšně ověřena na lidské mikrosomální frakci i pomocí specifického inhibitoru (chinidinu).

- **CYP3A4/5 (prasečí CYP3A29/39)**

Poslední a zároveň nejdůležitější forma cytochromu P450 v metabolismu léčiv – CYP3A4/5 – byla rovněž inhibována oběma testovanými komplexy, a to jak v prasečí, tak i v lidské mikrosomální frakci. Aktivita formy CYP3A29/39 byla redukována komplexem K5 ( $\text{IC}_{50} = 12,47 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a komplexem K6 ( $\text{IC}_{50} = 13,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Komplexy K5 i K6 vykazovaly vůči této formě shodně inhibici parciálně kompetitivní s hodnotami  $K_i = 5,46 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K5, a  $K_i = 4,18 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro komplex K6. Prasečí mikrosomy byly rovněž citlivé vůči specifickému inhibitoru lidské formy CYP3A4/5 – troleandomycinu.

Na základě našich výsledků se domníváme, že látky jsou potenciálně rizikové z hlediska lékových interakcí, a proto jsou spíše nevhodné k systémovému podání. Systémová aplikace testovaných komplexů by pravděpodobně ovlivnila metabolismus léčiv zprostředkovaný enzymy CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A4/5. Vzhledem k velmi slibným hodnotám minimálních inhibičních koncentrací testovaných komplexů lze uvažovat o lokálním použití těchto látek.

## Seznam obrázků

**Obrázek 1** – Krystalová struktura lidského cytochromu CYP3A4 a chemická struktura hemu (upraveno podle Sevrioukova *et Poulos*, 2013; Loew *et Harris*, 2000)

**Obrázek 2** – Enzymy podílející se na metabolismu léčiv v lidském organismu (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021)

**Obrázek 3** – Zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v metabolismu léčiv (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021; Zanger *et Schwab*, 2013)

**Obrázek 4** – Mikrosomální reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle Manikandan *et Nagini*, 2018)

**Obrázek 5** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP1A2 – *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (upraveno podle Chang *et Waxman*, 2006)

**Obrázek 6** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2A6 – 7-hydroxylace kumarinu (upraveno podle Waxman *et Chang*, 2006)

**Obrázek 7** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2B6 – *O*-deethylace 7-ethoxy-4-trifluormethylkumarinu (upraveno podle Morse *et Lu*, 1998)

**Obrázek 8** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2C9/10 – 4'-hydroxylace diklofenaku (upraveno podle Crespi *et al.*, 2006)

**Obrázek 9** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2D6 – 1'-hydroxylace bufuralolu (upraveno podle Crespi *et al.*, 1998)

**Obrázek 10** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP2E1 – 6-hydroxylace chlorzoxazonu (upraveno podle Lucas *et al.*, 1996)

**Obrázek 11** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP3A4/5 – 1'-hydroxylace midazolamu (upraveno podle Kronbach *et al.*, 1989)

**Obrázek 12** – Schéma stanovení katalytické aktivity CYP3A4/5 – 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu (upraveno podle Guengerich *et al.*, 1986)

**Obrázek 13** – Zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v prasečí mikrosomální frakci (upraveno podle Achour *et al.*, 2011)

**Obrázek 14** – Struktura testovaných komplexů K5 a K6 (upraveno podle Loubalová *et al.*, 2023)

**Obrázek 15** – Vazebné spektrum směsných prasečích jaterních mikrosomů se vzrůstající koncentrací komplexu K5

**Obrázek 16** – Vazebné spektrum směsných prasečích jaterních mikrosomů se vzrůstající koncentrací komplexu K6

**Obrázek 17** – Vazebná spektra testovaných komplexů K5 a K6 se směsnou prasečí mikrosomální frakcí (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

**Obrázek 18** – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP1A2 u lidí / CYP1A2 u prasat (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu)

**Obrázek 19** – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP1A2 u lidí / CYP1A2 u prasat (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu)

**Obrázek 20** – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2C9 u lidí / CYP2C33 u prasat (4'-hydroxylace diklofenaku)

**Obrázek 21** – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2C9 u lidí / CYP2C33 u prasat (4'-hydroxylace diklofenaku)

**Obrázek 22** – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2D6 u lidí / CYP2D25 u prasat (1'-hydroxylace bufuralolu)

**Obrázek 23** – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP2D6 u lidí / CYP2D25 u prasat (1'-hydroxylace bufuralolu)

**Obrázek 24** – Inhibiční vliv komplexu K5 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP3A4/5 u lidí / CYP3A29/39 u prasat (6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu)

**Obrázek 25** – Inhibiční vliv komplexu K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na enzymovou aktivitu CYP3A4/5 u lidí / CYP3A29/39 u prasat (6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu)

**Obrázek 26** – Dixonovy výnosy inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

**Obrázek 27** – Lineweaverovy-Burkovy výnosy inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12; 25; 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

**Obrázek 28** – Inhibiční vliv specifických inhibitorů na enzymovou aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

## Seznam tabulek

**Tabulka 1** – Nejdůležitější cytochromy P450 metabolizující léčiva a příklady jejich substrátů (upraveno podle Tornio *et Backman*, 2018; Švihovec *et al.*, 2018)

**Tabulka 2** – Primární funkce významných rodin cytochromů P450 (upraveno podle Zhao *et al.*, 2021; Guengerich, 2015)

**Tabulka 3** – Podobnost prasečích a lidských forem cytochromů P450 (upraveno podle Achour *et al.*, 2011)

**Tabulka 4** – Ligandy jaderných receptorů indukující cytochromy P450 (upraveno podle Manikandan *et Nagini*, 2018)

**Tabulka 5** – Inhibitory vybraných CYP enzymů (upraveno podle Hakkola *et al.*, 2020; Bourrié *et al.*, 1996)

**Tabulka 6** – Minimální inhibiční koncentrace komplexů K5 a K6 (upraveno podle Loubalová *et al.*, 2023)

**Tabulka 7** – Pipetovací schéma pro měření kinetických parametrů izolované mikrosomální frakce

**Tabulka 8** – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP1A2 (CYP1A2 u prasete)

**Tabulka 9** – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP2C9 (CYP2C33 u prasete)

**Tabulka 10** – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP2D6 (CYP2D25 u prasete)

**Tabulka 11** – Protokol pro stanovení vlivu komplexů K5 a K6 na aktivitu CYP3A4/5 (CYP3A29/39 u prasete)

**Tabulka 12** – Charakterizace jednotlivých izolovaných prasečích mikrosomálních frakcí

**Tabulka 13** – Charakterizace směsné prasečí mikrosomální frakce

**Tabulka 14** – Získané kinetické parametry ( $K_m$ ,  $v_{max}$ ) pro jednotlivé testované formy CYP

**Tabulka 15** – Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  testovaných komplexů K5 a K6 s prasečími mikrosomy

**Tabulka 16** – Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  testovaných komplexů K5 a K6 s lidskými mikrosomy

**Tabulka 17** – Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  testovaných komplexů K5 a K6 vůči CYP2D6 v rámci experimentu  $IC_{50}$  Shift Assay

**Tabulka 18** – Shrnutí inhibičních vlivů testovaných komplexů K5 a K6 na aktivitu vybraných CYP ve směsné prasečí mikrosomální frakci

**Tabulka 19** – Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  testovaných komplexů K5 a K6 s prasečími mikrosomy

## Seznam literatury

- Ahmad, M., Suhaimi, S. N., Chu, T. L., Abdul Aziz, N., Mohd Kornain, N. K., Samiulla, D. S., Lo, K. W., Ng, C. H., Khoo, A. S. (2018).** Ternary copper(II) complex: NCI60 screening, toxicity studies, and evaluation of efficacy in xenograft models of nasopharyngeal carcinoma. *PLOS One*, 13(1)
- Achour, B., Barber, J., Rostami-Hodjegan, A. (2011).** Cytochrome P450 Pig liver pie: determination of individual cytochrome P450 isoform contents in microsomes from two pig livers using liquid chromatography in conjunction with mass spectrometry [corrected]. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 39(11), 2130–2134.
- Andrews, J. M. (2001).** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16.
- Anzenbacherová, E., Bec, N., Anzenbacher, P., Hudecek, J., Soucek, P., Jung, C., Munro, A. W., Lange, R. (2000).** Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *European journal of biochemistry*, 267(10), 2916–2920.
- Baldwin, A., Huang, Z., Jounaidi, Y., Waxman, D. J. (2003).** Identification of novel enzyme-prodrug combinations for use in cytochrome P450-based gene therapy for cancer. *Archives of biochemistry and biophysics*, 409(1), 197–206.
- Bhattacharyya, S., Sinha, K., Sil, P. C. (2014).** Cytochrome P450s: mechanisms and biological implications in drug metabolism and its interaction with oxidative stress. *Current drug metabolism*, 15(7), 719–742.
- Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr, Juguilon, H., Bolado, J., Jr, van Meter, C. M., Ong, E. S., Evans, R. M. (1998).** SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes development*, 12(20), 3195–3205.
- Bourrié, M., Meunier, V., Berger, Y., Fabre, G. (1996).** Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 277(1), 321–332.
- Buckley, D. B., Kazmi, F., Yerino, P., Toren, P., Holsapple, J., Ogilvie, B. W., Paris, B. L., Parkinson, A. (2010).** Pitfalls in the design of metabolism-dependent CYP inhibition (MDI) experiments with a dilution step: Inhibitor depletion by metabolism and/or microsomal binding leads to underestimation of the shifted IC50 value. *Drug metabolism reviews*, 42, 146.
- Carpenter, M., Berry, H., Pelletier, A. L. (2019).** Clinically Relevant Drug-Drug Interactions in Primary Care. *American family physician*, 99(9), 558–564.
- Cassir, N., Rolain, J. M., Brouqui, P. (2014).** A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in microbiology*, 5, 551.
- Cohen, L. H., Remley, M. J., Raunig, D., Vaz, A. D. (2003).** In vitro drug interactions of cytochrome p450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 31(8), 1005–1015.
- Correia, M. A., Ortiz de Montellano, P. R. (2005).** Inhibition of cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450*, 247-322.
- Crespi, C. L., Chang, T. K., Waxman, D. J. (1998).** CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 107, 141–145.
- Crespi, C. L., Chang, T. K., Waxman, D. J. (2006).** Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 320, 109–113.

- Cryle, M. J., Schlichting, I.** (2008). Structural insights from a P450 Carrier Protein complex reveal how specificity is achieved in the P450(BioI) ACP complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15696–15701.
- de Groot, M. J., Kirton, S. B., Sutcliffe, M. J.** (2004). In silico methods for predicting ligand binding determinants of cytochromes P450. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(16), 1803–1824.
- de Morais, S. M., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U. A., Goldstein, J. A.** (1994). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *The Journal of biological chemistry*, 269(22), 15419–15422.
- DeVore, N. M., Smith, B. D., Wang, J. L., Lushington, G. H., Scott, E. E.** (2009). Key residues controlling binding of diverse ligands to human cytochrome P450 2A enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37(6), 1319–1327.
- Diaz, D., Fabre, I., Daujat, M., Saint Aubert, B., Bories, P., Michel, H., Maurel, P.** (1990). Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology*, 99(3), 737–747.
- Dickins M.** (2004). Induction of cytochromes P450. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(16), 1745–1766.
- Dilmaghanian, S., Gerber, J. G., Filler, S. G., Sanchez, A., Gal, J.** (2004). Enantioselectivity of inhibition of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by ketoconazole: Testosterone and methadone as substrates. *Chirality*, 16(2), 79–85.
- Donato, M. T., Jiménez, N., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J.** (2004). Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 32(7), 699–706.
- Ekroos, M., Sjögren, T.** (2006). Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13682–13687.
- Elcombe, C. R., Peffer, R. C., Wolf, D. C., Bailey, J., Bars, R., Bell, D., Cattley, R. C., Ferguson, S. S., Geter, D., Goetz, A., Goodman, J. I., Hester, S., Jacobs, A., Omiecinski, C. J., Schoeny, R., Xie, W., Lake, B. G.** (2014). Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Critical reviews in toxicology*, 44(1), 64–82.
- Ged, C., Umbenhauer, D. R., Bellew, T. M., Bork, R. W., Srivastava, P. K., Shinriki, N., Lloyd, R. S., Guengerich, F. P.** (1988). Characterization of cDNAs, mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P-450 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase. *Biochemistry*, 27(18), 6929–6940.
- Gerbai-Chaloin, S., Pascussi, J. M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J. M., Carrère, N., Maurel, P.** (2001). Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29(3), 242–251.
- Gonzalez F. J.** (2004). Cytochrome P450 humanised mice. *Human genomics*, 1(4), 300–306.
- Grimm, S. W., Einolf, H. J., Hall, S. D., He, K., Lim, H. K., Ling, K. H., Lu, C., Nomeir, A. A., Seibert, E., Skordos, K. W., Tonn, G. R., Van Horn, R., Wang, R. W., Wong, Y. N., Yang, T. J., Obach, R. S.** (2009). The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37(7), 1355–1370.
- Guengerich F. P.** (2022). Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by Drugs-Molecular Basis and Practical Applications. *Biomolecules & therapeutics*, 30(1), 1–18.

- Guengerich, F. P.** (2008). Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 70-83.
- Guengerich, F. P.** (2015). Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 4<sup>th</sup> edition. (Ortiz de Montellano, P.R., ed.). 689 pages. New York: Springer.
- Guengerich, F. P., Martin, M. V.** (1998). Purification of cytochromes P450. *Methods in Molecular Biology*, 107, 35-53.
- Guengerich, F. P., Martin, M. V., Beaune, P. H., Kremers, P., Wolff, T., Waxman, D. J.** (1986). Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 261(11), 5051–5060.
- Guengerich, F. P., Waterman, M. R., Egli, M.** (2016). Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in pharmacological sciences*, 37(8), 625–640.
- Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., Pelkonen, O.** (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of toxicology*, 94(11), 3671–3722.
- Hasegawa, M., Kapelyukh, Y., Tahara, H., Seibler, J., Rode, A., Krueger, S., Lee, D. N., Wolf, C. R., Scheer, N.** (2011). Quantitative prediction of human pregnane X receptor and cytochrome P450 3A4 mediated drug-drug interaction in a novel multiple humanized mouse line. *Molecular pharmacology*, 80(3), 518–528.
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla V., Helvig C. Falck J. R., Farrell G., Kaminsky L. S., Spivack S. D., Boitier E., Beaune, P.** (1999). Human cytochromes P450. *Molecular aspects of medicine*, 20(1-2), 1-137.
- Hill, H. A. O., Röder, A., Williams, R. J. P.** (1970). The chemical nature and reactivity of cytochrome P-450. *Biochemistry*, 123-151.
- Hrycay, E. G., Bandiera, S. M.** (2015). Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes. *Advances in experimental medicine and biology*, 851, 1–61.
- Hughes, R. D., Williams, R.** (1996). Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Seminars in liver disease*, 16(4), 435–444.
- Huttunen, K. M., Mähönen, N., Raunio, H., Rautio, J.** (2008). Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Current medicinal chemistry*, 15(23), 2346–2365.
- Chang, T. K., Crespi, C. L., Waxman, D. J.** (2006). Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 320, 127–131.
- Chang, T. K., Waxman, D. J.** (2006). Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 320, 85–90.
- Chen, D., Lin, X. X., Zhao, Q., Xiao, J., Peng, S. F., Xiao, M. F., Ouyang, D. S., Tan, Z. R., Wang, Y. C., Peng, J. B., Zhang, W., Chen, Y.** (2017). Screening of drug metabolizing enzymes for fusidic acid and its interactions with isoform-selective substrates in vitro. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 47(9), 778–784.
- Chen, R., Willcox, M. D., Ho, K. K., Smyth, D., Kumar, N.** (2016). Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models. *Biomaterials*, 85, 142–151.
- Cheng, G., Dai, M., Ahmed, S., Hao, H., Wang, X., Yuan, Z.** (2016). Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 7, 470.



- Chudal, L., Pandey, N. K., Phan, J., Johnson, O., Lin, L., Yu, H., Shu, Y., Huang, Z., Xing, M., Liu, J. P., Chen, M. L., Chen, W.** (2020). Copper-Cysteamine Nanoparticles as a Heterogeneous Fenton-Like Catalyst for Highly Selective Cancer Treatment. *ACS applied bio materials*, 3(3), 1804–1814.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C.** (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacology & therapeutics*, 116(3), 496–526.
- Isin, E. M., Guengerich, F. P.** (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1770(3), 314–329.
- Jaiswal, A. K., Gonzalez, F. J., Nebert, D. W.** (1985). Human dioxin-inducible cytochrome P1-450: complementary DNA and amino acid sequence. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4695), 80–83.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.** (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(2), 103–116.
- Kalra B. S.** (2007). Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: an update. *Indian journal of medical sciences*, 61(2), 102–116.
- Kato H.** (2020). Computational prediction of cytochrome P450 inhibition and induction. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 35(1), 30–44.
- Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y.** (2007). Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464(2), 207–212.
- Kawajiri, K., Hayashi, S. I.** (1996). The CYP1 family. *Cytochromes P 450*, 77-97.
- Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., Terasaki, T.** (2011). Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), 341–352.
- Klouda, P.** (2003). Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda. *Ostrava*, 10, 25-32.
- Ko, J. W., Desta, Z., Soukhova, N. V., Tracy, T., Flockhart, D. A.** (2000). In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6. *British journal of clinical pharmacology*, 49(4), 343–351.
- Konieczny, J., Rdzawski, Z.** (2012). Antibacterial properties of copper and its alloys. *Archives of Materials Science and Engineering*, 56(2), 53-60.
- Krasnovskaya, O., Naumov, A., Guk, D., Gorelkin, P., Erofeev, A., Beloglazkina, E., Majouga, A.** (2020). Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3965.
- Kronbach, T., Mathys, D., Umeno, M., Gonzalez, F. J., Meyer, U. A.** (1989). Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Molecular pharmacology*, 36(1), 89–96.
- Kumar, S., Sharma, R., Roychowdhury, A.** (2012). Modulation of cytochrome-P450 inhibition (CYP) in drug discovery: a medicinal chemistry perspective. *Current medicinal chemistry*, 19(21), 3605–3621.
- Lang, N. P., Butler, M. A., Massengill, J., Lawson, M., Stotts, R. C., Hauer-Jensen, M., Kadlubar, F. F.** (1994). Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

*Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(8), 675–682.

**Liao, J., Yang, F., Yu, W., Qiao, N., Zhang, H., Han, Q., Hu, L., Li, Y., Guo, J., Pan, J., Tang, Z.** (2020). Copper induces energy metabolic dysfunction and AMPK-mTOR pathway-mediated autophagy in kidney of broiler chickens. *Ecotoxicology and environmental safety*, 206, 111366.

**Lin, H. L., Kent, U. M., Hollenberg, P. F.** (2002). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 alpha-ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301(1), 160–167.

**Lin, J. H., Lu, A. Y.** (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical pharmacokinetics*, 35(5), 361–390.

**Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A. D., Rushmore, T. H., Shou, M.** (2001). Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29(4), 368–374.

**Loew, G. H., Harris, D. L.** (2000). Role of the heme active site and protein environment in structure, spectra, and function of the cytochrome p450s. *Chemical reviews*, 100(2), 407–420.

**Loubalová I.** (2021). Koordinační sloučeniny niklu, mědi a zinku s dikarboxylovými kyselinami a N donorovými ligandy a studium jejich biologické aktivity [online]. Olomouc, 2021 [cit. 2023-02-19]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/pnxrbn/>. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce prof. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.

**Loubalová, I., Zahradníková, E., Masaryk, L., Nemeč, I., Hochvaldová, L., Panáček, A., Kvítek L., Večeřová R., Świątkowski M., Kopel, P.** (2023). Antibacterial study on nickel and copper dicarboxylate complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 545, 121273.

**Lucas, D., Menez, J. F., Berthou, F.** (1996). Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1. *Methods in enzymology*, 272, 115–123.

**Madan, A., Usuki, E., Burton, L. A., Ogilvie, B. W., Parkinson, A.** (2001). In vitro approaches for studying the inhibition of drug-metabolizing enzymes and identifying the drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 116, 217-294.

**Manikandan, P., Nagini, S.** (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current drug targets*, 19(1), 38–54.

**McFadyen, M. C., Cruickshank, M. E., Miller, I. D., McLeod, H. L., Melvin, W. T., Haites, N. E., Parkin, D., Murray, G. I.** (2001). Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer. *British journal of cancer*, 85(2), 242–246.

**McGinnity, D. F., Riley, R. J.** (2001). Predicting drug pharmacokinetics in humans from in vitro metabolism studies. *Biochemical Society transactions*, 29(2), 135–139.

**Millet, S., Maertens, L.** (2011). The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 187(2), 143–144.

**Mirzaei, M. S., Ivanov, M. V., Taherpour, A. A., Mirzaei, S.** (2021). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: Computational insights. *Chemical research in toxicology*, 34(4), 959–987.

**Morse, M. A., Lu, J.** (1998). High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 708(1-2), 290–293.

- Muirhead, G. J., Faulkner, S., Harness, J. A., Taubel, J.** (2002). The effects of steady-state erythromycin and azithromycin on the pharmacokinetics of sildenafil in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology*, 53(1), 37–43.
- Murray M.** (1997). Drug-mediated inactivation of cytochrome P450. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 24(7), 465–470.
- Mutoh, S., Sobhany, M., Moore, R., Perera, L., Pedersen, L., Sueyoshi, T., Negishi, M.** (2013). Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Science signaling*, 6(274), 31.
- Neafsey, P., Ginsberg, G., Hattis, D., Sonawane, B.** (2009). Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population distribution of CYP2D6 activity. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 12(5-6), 334–361.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W.** (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)*, 6(1), 1–11.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W.** (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1–42.
- Niwa, T., Inoue-Yamamoto, S., Shiraga, T., Takagi, A.** (2005). Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(9), 1813–1816.
- Niwa, T., Watanabe, T., Suzuki, K., Hayashi, H., Ohta, H., Nakayama, A., Tsuchiya, M., Yasuda, K., Murakami, N., Itoh, Y.** (2016). Early optimization of antimicrobial therapy improves clinical outcomes of patients administered agents targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 41(1), 19–25.
- Obach, R. S., Walsky, R. L., Venkatakrisnan, K., Gaman, E. A., Houston, J. B., Tremaine, L. M.** (2006). The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 316(1), 336–348.
- Ohyama, K., Nakajima, M., Suzuki, M., Shimada, N., Yamazaki, H., Yokoi, T.** (2000). Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *British journal of clinical pharmacology*, 49(3), 244–253.
- Olkkola, K. T., Aranko, K., Luurila, H., Hiller, A., Saarnivaara, L., Himberg, J. J., Neuvonen, P. J.** (1993). A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 53(3), 298–305.
- Omura T.** (1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and biophysical research communications*, 266(3), 690–698.
- Ortiz de Montellano, P.R.**, Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. 4<sup>th</sup> edition. ed. 2015. 689 pages. New York: Springer.
- Pan, Y., Mak, J. W., Ong, C. E.** (2013). Heterologous expression of human cytochrome P450 (CYP) 2C19 in *Escherichia coli* and establishment of RP-HPLC method to serve as activity marker. *Biomedical chromatography: BMC*, 27(7), 859–865.
- Park, E. J., Park, K., Durai, P., Kim, K. Y., Park, S. Y., Kwon, J., Lee, H. J., Pan, C. H., Liu, K. H.** (2022). Potent and Selective Inhibition of CYP1A2 Enzyme by Obtusifolin and Its Chemopreventive Effects. *Pharmaceutics*, 14(12), 2683.

- Park, J. Y., Kim, K. A., Kim, S. L.** (2003). Chloramphenicol is a potent inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in human liver microsomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3464–3469.
- Pasanen, M., Stenbäck, F., Park, S. S., Gelboin, H. V., Pelkonen, O.** (1988). Immunohistochemical detection of human placental cytochrome P-450-associated mono-oxygenase system inducible by maternal cigarette smoking. *Placenta*, 9(3), 267–275.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H.** (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of toxicology*, 82(10), 667–715.
- Penesyanyan, A., Gillings, M., Paulsen, I. T.** (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(4), 5286–5298.
- Quattrochi, L. C., Tukey, R. H.** (1989). The human cytochrome Cyp1A2 gene contains regulatory elements responsive to 3-methylcholanthrene. *Molecular pharmacology*, 36(1), 66–71.
- Rendic, S. P., Guengerich, F. P.** (2021). Human Family 1-4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update. *Archives of toxicology*, 95(2), 395–472.
- Rendic, S., Guengerich, F. P.** (2015). Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chemical research in toxicology*, 28(1), 38–42.
- Ring, B., Wrighton, S. A., Mohutsky, M.** (2021). Reversible Mechanisms of Enzyme Inhibition and Resulting Clinical Significance. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2342, 29–50.
- Robert, C., Wilson, C. S., Guengerich, F. P., Arreto, C. D.** (2010). Evolution of the scientific literature of cytochrome P450 from 1977 to 2008. *Current drug metabolism*, 11(2), 162–170.
- Ryan, D. E., Levin, W.** (1990). Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacology & therapeutics*, 45(2), 153–239.
- Ryan, D. E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P. E., Haniu, M., Shively, J. E., Lieber, C. S., Levin, W.** (1985). Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *The Journal of biological chemistry*, 260(10), 6385–6393.
- Sadek, B.** (2011). Imidazole-substituted drugs and tendency for inhibition of cytochrome P450 isoenzymes: A review. *Der Pharma Chemica*, 3(1), 410-419.
- Salsali, M., Holt, A., Baker, G. B.** (2004). Inhibitory effects of the monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine on the cytochrome P450 enzymes CYP2C19, CYP2C9, and CYP2D6. *Cellular and molecular neurobiology*, 24(1), 63–76.
- Seal, B. S., Lillehoj, H. S., Donovan, D. M., Gay, C. G.** (2013). Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Animal health research reviews*, 14(1), 78–87.
- Sesardic, D., Boobis, A. R., Edwards, R. J., Davies, D. S.** (1988). A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *British journal of clinical pharmacology*, 26(4), 363–372.
- Sesardic, D., Boobis, A. R., Murray, B. P., Murray, S., Segura, J., de la Torre, R., Davies, D. S.** (1990). Furofylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *British journal of clinical pharmacology*, 29(6), 651–663.
- Sevrioukova, I. F., Poulos, T. L.** (2013). Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 42(9), 3116–3126.

- Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., Sutter, T. R.** (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer research*, 56(13), 2979–2984.
- Silverman R. B.** (1988). The potential use of mechanism-based enzyme inactivators in medicine. *Journal of enzyme inhibition*, 2(2), 73–90.
- Skaanild M. T.** (2006). Porcine cytochrome P450 and metabolism. *Current pharmaceutical design*, 12(11), 1421–1427.
- Skaanild, M. T., Friis, C.** (2002). Is cytochrome P450 CYP2D activity present in pig liver?. *Pharmacology & toxicology*, 91(4), 198–203.
- Smutny, T., Mani, S., Pavek, P.** (2013). Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily. *Current drug metabolism*, 14(10), 1059–1069.
- Sneha, S., Baker, S. C., Green, A., Storr, S., Aiyappa, R., Martin, S., Pors, K.** (2021). Intratumoural Cytochrome P450 Expression in Breast Cancer: Impact on Standard of Care Treatment and New Efforts to Develop Tumour-Selective Therapies. *Biomedicines*, 9(3), 290.
- Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.** (Eds.). (2018). *Farmakologie* (pp. 729-737). Grada Publishing.
- Tanaka E.** (1999). Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 24(5), 339–346.
- Tang, H., Xu, M., Shi, F., Ye, G., Lv, C., Luo, J., Zhao, L., Li, Y.** (2018). Effects and mechanism of nano-copper exposure on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2140.
- Tannenbaum, C., Sheehan, N. L.** (2014). Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions. *Expert review of clinical pharmacology*, 7(4), 533–544.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D. J., Veronese, M. E., McManus, M. E., Tukey, R. H., Quattrochi, L. C., Gelboin, H. V., Miners, J. O.** (1993). Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 265(1), 401–407.
- Testa, B., Pedretti, A., Vistoli, G.** (2012). Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug discovery today*, 17(11-12), 549–560.
- Thomas J. H.** (2007). Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. *PLoS Genetics*, 3(5), 67.
- Thu, O. K., Nilsen, O. G., Hellum, B.** (2016). In vitro inhibition of cytochrome P-450 activities and quantification of constituents in a selection of commercial *Rhodiola rosea* products. *Pharmaceutical biology*, 54(12), 3249–3256.
- Tompkins, L. M., Wallace, A. D.** (2007). Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 21(4), 176–181.
- Tornio, A., Backman, J. T.** (2018). Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 83, 3–32.
- Trieu, L., Murray, M.** (2000). Metabolite-intermediate complexation and inhibition of microsomal CYP3A in rat liver by diltiazem. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 30(2), 131–140.
- Tucker G. T.** (1994). The interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450. *Alimentary pharmacology therapeutics*, 8(1), 33–38.

- Ung, Y. T., Ong, C. E., Pan, Y.** (2018). Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *High-throughput*, 7(4), 29.
- van Schaik R. H.** (2008). CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 11(3), 77–98.
- Vincent, M., Hartemann, P., Engels-Deutsch, M.** (2016). Antimicrobial applications of copper. *International journal of hygiene and environmental health*, 219(7), 585–591.
- Vrzal, R., Dvorak, Z.** (2016). The comparative effects of diethyldithiocarbamate-copper complex with established proteasome inhibitors on expression levels of CYP1A2/3A4 and their master regulators, aryl hydrocarbon and pregnane X receptor in primary cultures of human hepatocytes. *Fundamental & clinical pharmacology*, 30(6), 585–595.
- Wahlang, B., Falkner, K. C., Cave, M. C., Prough, R. A.** (2015). Role of Cytochrome P450 Monooxygenase in carcinogen and chemotherapeutic drug metabolism. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 74, 1–33.
- Walsky, R. L., Obach, R. S.** (2004). Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 32(6), 647–660.
- Watkins, P. B.** (1990). Role of cytochromes P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. *Seminars in liver disease* 10(4), 235-250.
- Watkins, P. B., Murray, S. A., Thomas, P. E., Wrighton, S. A.** (1990). Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver. *Biochemical pharmacology*, 39(3), 471–476.
- Waxman, D. J., Chang, T. K.** (2006). Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 320, 91–96.
- Wen, X., Wang, J. S., Backman, J. T., Laitila, J., Neuvonen, P. J.** (2002). Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 30(6), 631–635.
- Weston, A., Brown, P. R.** (1997). *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis: principles and practices*. Elsevier.
- Wienkers, L. C., Heath, T. G.** (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(10), 825–833.
- Wrighton, S. A., Stevens, J. C.** (1992). The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Critical reviews in toxicology*, 22(1), 1–21.
- Wrighton, S. A., Stevens, J. C., Becker, G. W., VandenBranden, M.** (1993). Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 306(1), 240–245.
- Wrighton, S. A., VandenBranden, M., Ring, B. J.** (1996). The human drug metabolizing cytochromes P450. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 24(5), 461–473.
- Yandamuri, N., Srinivas Nagabattula, K. R., Kurra, S. S., Batthula, S., Nainasha Allada, L. P. S., Bandam, P.** (2013). Comparative study of new trends in HPLC: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23, 52-57.
- Yang, C. S., Yoo, J. S., Ishizaki, H., Hong, J. Y.** (1990). Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug metabolism reviews*, 22(2-3), 147–159.
- Yun, C. H., Jeong, H. G., Jhoun, J. W., Guengerich, F. P.** (1995). Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 16(6), 1437–1440.

**Zanger, U. M., Raimundo, S., Eichelbaum, M.** (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(1), 23–37.

**Zanger, U. M., Schwab, M.** (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology therapeutics*, 138(1), 103–141.

**Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., Qin, S.** (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12808.

**Zhou, S., Yung Chan, S., Cher Goh, B., Chan, E., Duan, W., Huang, M., McLeod, H. L.** (2005). Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clinical pharmacokinetics*, 44(3), 279–304.