

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium interakcí derivátů transplatiny s lidskými  
cytochromy P450**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Martina Michalová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	5.5. 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:.....

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Mgr. Vlastimilovi Maškovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení a všestrannou pomoc a paní doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, Csc. za cenné připomínky. Všem pracovníkům Ústavu farmakologie LF UPOL děkuji za pomoc, kterou mi v průběhu práce poskytovali.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Martina Michalová
Název práce	Studium interakcí derivátů transplatiny s lidskými cytochromy P450
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce je zaměřená na studium interakcí dvou derivátů transplatiny s devíti formami lidských jaterních mikrosomálních cytochromů P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4). Platinové komplexy (PSVM 005 a PSVM 006) byly připraveny s benzylaminopurinovými deriváty jako neodstupujícími ligandy. Byla studována přeměna markerových substrátů jednotlivých cytochromů P450 na výsledný metabolit, který byl kvantifikován fluorimetricky, luminometricky nebo pomocí HPLC. Výsledky ukázaly, že oba deriváty transplatiny inhibují aktivitu CYP2C9 u derivátu PSVM 005 na 46% a na 16% u PSVM 006 (vždy při koncentraci inhibitorů 200 <math>\mu\text{mol.l}^{-1}</math>). Forma CYP2C19 byla inhibována PSVM 005 na 33% a PSVM 006 na 25% (rovněž při koncentraci 200 <math>\mu\text{mol.l}^{-1}</math>). Oba komplexy inhibovaly při koncentraci inhibitorů 200 <math>\mu\text{mol.l}^{-1}</math> také formu CYP2D6, a to na 17% (PSVM 005) a na 15% (PSVM 006). Při koncentraci inhibitorů odpovídající plasmatické koncentraci cisplatiny (tj. 10 <math>\mu\text{mol.l}^{-1}</math>) však nebyl rozsah inhibice takový, že by mohl mít význam v klinické praxi.</p>
Klíčová slova	Cytochrom P450, transplatina, enzymová aktivita
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Martina Michalová
Title	Study of interaction of transplatin derivatives with human cytochromes P450
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>This bachelor thesis focuses on the study of interaction of the two transplatin derivatives with the nine forms of human liver microsomal cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4). Platinum complexes (PSVM 005 and PSVM 006) having benzylaminopurine derivatives as non retracting ligands. The study is based on the biotransformation of marker substrates of nine forms of cytochrome P450 for metabolites, which were quantified fluorometrically, luminometrically or by HPLC. Results show, that both derivatives of transplatin inhibited the activity CYP2C9 (to 46% in the case of the PSVM 005 and to 16% in the PSVM 006) Inhibitor concentration was in all cases <math>200 \mu\text{mol.l}^{-1}</math>. CYP2C19 form was inhibited by PSVM 005 to 33% and by PSVM 006 to 25% of its original activity with inhibitor concentrations <math>200 \mu\text{mol.l}^{-1}</math>. Both complexes inhibited (with the same concentration <math>200 \mu\text{mol.l}^{-1}</math>) also the CYP2D6 form to 17% (PSVM 005) and to 15% (PSVM 006). Due to the fact that at the inhibition concentration corresponding to the plasmatic level of cisplatin (i.e. <math>10 \mu\text{mol.l}^{-1}</math>) the extent of inhibition was relatively low, no clinically relevant inhibition of cytochrome P450 activities can be expected.</p>
Keywords	Cytochrome P450, transplatin, enzyme activity
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

ÚVOD.....	7
<b>1 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>2 CYTOCHROMY P450.....</b>	<b>9</b>
2.1 STRUKTURA .....	10
2.2 REAKČNÍ MECHANISMUS CYTOCHROMU P450.....	11
2.3 NÁZVOSLOVÍ.....	12
2.4 VÝZNAMNÉ FORMY CYTOCHROMU P450.....	12
2.4.1 CYP1A2 .....	13
2.4.2 CYP2A6 .....	14
2.4.3 CYP2B6 .....	14
2.4.4 Podrodina 2C .....	14
2.4.5 CYP2D6 .....	14
2.4.6 CYP2E1.....	15
2.4.7 CYP3A4 .....	15
<b>3 METABOLISMUS XENOBIOTIK.....</b>	<b>16</b>
3.1 VSTUP LÁTEK DO ORGANISMU .....	16
3.2 BIOTRANSFORMACE .....	16
3.2.1 I. fáze biotransformace.....	17
3.2.2 II. fáze biotransformace.....	17
3.3 EXKRECE XENOBIOTIK Z ORGANISMU .....	18
<b>4 LÉKOVÉ INTERAKCE.....</b>	<b>18</b>
4.1 INDUKCE .....	19
4.2 INHIBICE .....	20
<b>5 PLATINOVÉ KOMPLEXY A JEJICH DERIVÁTY.....</b>	<b>21</b>
<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>23</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>27</b>

## Úvod

Cytochromy P450 se jsou nejdůležitějšími enzymy 1. fáze jejich metabolismu a významně se podílejí na biotransformaci léčiva. Při současném podávání více léčiv může ale docházet k lékovým interakcím. Znalost metabolismu léčiv významně přispívá k minimalizaci nežádoucích účinků založených právě na jejich interakcích příslušných enzymů.

Cisplatina (*cis* – diaminodichloroplatnatý komplex) a její deriváty vykazují protinádorovou aktivitu. Vzhledem k některým závažným nežádoucím vlastnostem cisplatiny jsou intenzivně hledány sloučeniny, které by cisplatinu (alespoň v případě některých typů nádorového onemocnění) nahradily. Transplatina (*trans* – diaminodichloroplatnatý komplex) se ukázala jako klinicky neúčinná, byly však objeveny její deriváty, které mají významnou cytotoxickou aktivitu. Tyto látky by tedy mohly být kandidáty na protinádorová léčiva.

Studie ukázaly, že cisplatina a její deriváty nevykazují žádný vliv na enzymatickou aktivitu cytochromů P450. U transplatiny byla prokázána inhibice cytochromů P450. Vzhledem k potenciálnímu využití derivátů transplatiny jako léčiv, je nutné důkladně prostudovat jejich interakce s cytochromy P450.

# 1 Cíle práce

Hlavní cíle bakalářské práce byly:

- Literární rešerše na téma cytochromy P450, jejich struktura a funkce
- Charakterizace interakcí derivátů transplatiny s devíti formami cytochromu P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) na základě přeměny markerových substrátů těchto forem cytochromu P450 a sledování inhibice.
- Stanovení typu případných inhibicí jednotlivých forem cytochromu P450



## 2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) jsou zodpovědné za většinu přeměn cizorodých látek v organismu (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001) a představují širokou skupinu monooxygenas. Poprvé byly objeveny M. Klingenbergem v mikrosomální frakci potkaních jater v roce 1958 a pojmenovány byly až v roce 1961 (Klingenberg, 1958; Omura & Sato, 1962). Název „cytochrom“ byl ....na základě skutečnosti, že ionty železa v hemu se střídavě oxidují a redukují. Číslo '450' je označení polohy spektrálního maxima, které vykazuje cytochrom po redukci a vazbě s CO.

Cytochromy P450 představují nadrodinu enzymů, které jsou přítomny ve všech živých organismech (od bakterií až po člověka). Lidský cytochrom P450 je přítomen především v játrech, ale je lokalizován i v ledvinách, tenkém střevě, prostatě, placentě, kůži, mozku, plicích, slezině, srdci, GIT (gastrointestinálním traktu). V eukaryotních buňkách je enzym vázán v lipidové dvouvrstvě membrány endoplasmatického retikula nebo v membráně mitochondrií (Bibi, 2008). V dnešní době je popsáno několik tisíc různých forem cytochromu P450, u člověka bylo prokázáno 57 genů pro tento hemoprotein (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Substráty těchto enzymů jsou jimi v organismu biotransformovány za vzniku produktů, které poté mohou být vyloučeny a nedochází tak k akumulaci příslušných xenobiotik. Může ale také docházet ke vzniku derivátů, které jsou biologicky aktivní anebo mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní (Stiborová et al., 1999). Mezi endogenní substráty cytochromu P450 se řadí nasycené a nenasycené mastné kyseliny, ikosanoidy, steroly a steroidy, vitamin D, žlučové kyseliny. Exogenní látky, které mohou být metabolizovány cytochromem P450, jsou např. léčiva, polutanty životního prostředí a další chemické sloučeniny.

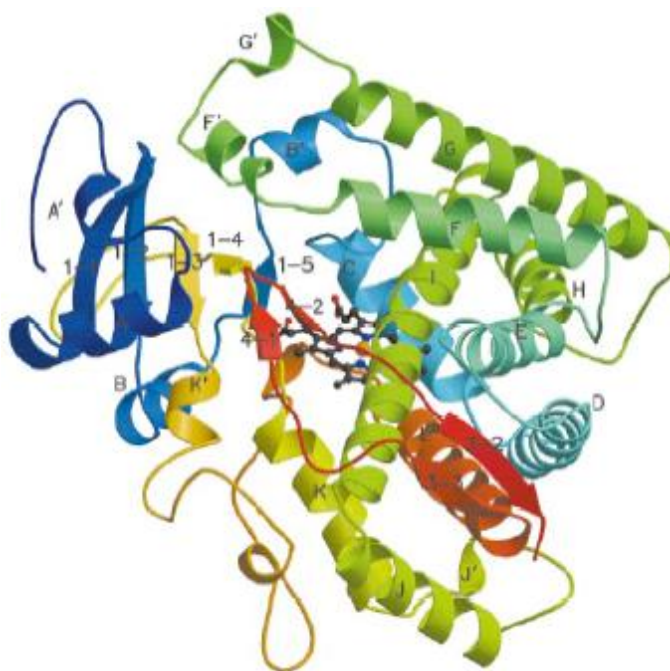
Aktivita některých forem cytochromu P450 vykazuje velkou interindividuální variabilitu, která je způsobená jak vlivy okolí, tak věkem a genetickým polymorfismem. Ten je definován jako geneticky podmíněná odlišnost postihující alespoň 2% z uvažované populace. Z hlediska schopnosti biotransformovat určitou látku se lidská populace rozděluje na pomalé (PM – poor metabolizers), střední (IM – intermediate metabolizers), normální (EM – extensive metabolizers) a ultrarychlé (UM – ultrarapid metabolizers) metabolizátory. Určení genotypu je založeno na metodách molekulární biologie, především PCR (polymerázová řetězová reakce). Pomalí metabolizátoři mají defektní alely, takže léčivo nemetabolizují vůbec nebo jen velmi omezeně. Jsou vystaveni největšímu riziku toxicity nebo selhání terapie u léčiv. Střední metabolizátoři se vyznačují nižší metabolickou aktivitou. EM tvoří většinu populace a mají obě alely

genů funkční a léčiva tedy metabolizují normálně. Ultrarychlí metabolizátoři mají více kopií genu pro daný enzym a vzniká tedy u nich jeho vyšší exprese. Tito lidé léčivo metabolizují intenzivněji a vyžadují větší dávky léčiv (Ingelman – Sundberg et al., 2007). Jednotlivé druhy polymorfismu v populacích se liší především v závislosti na rase.

## 2.1 Struktura

Poprvé byl cytochrom P450 získán z kastrového monooxygenasového systému bakterie *Pseudomonas putida*. Tento cytochrom byl označen jako P450cam (z angl. „camphor“ = kafr) (Poulos & Johnson, 2005) a jeho krystalografická struktura byla uveřejněna roku 1987 (Poulos et al., 1987)

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, obsahující jako prostetickou skupinu hem b (ferriprotoporfyrin IX). Ten je v molekule částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, který představuje pátý ligand železa protoporfyrinu IX (Stiborová et al., 1999). Šestým ligandem hemového železa se v průběhu reakce stává molekula kyslíku.



Obr. 1 Struktura cytochromu P450 2C9. Tmavě modrá barva značí N-konec, červená barva značí C-konec (Williams et al., 2003)

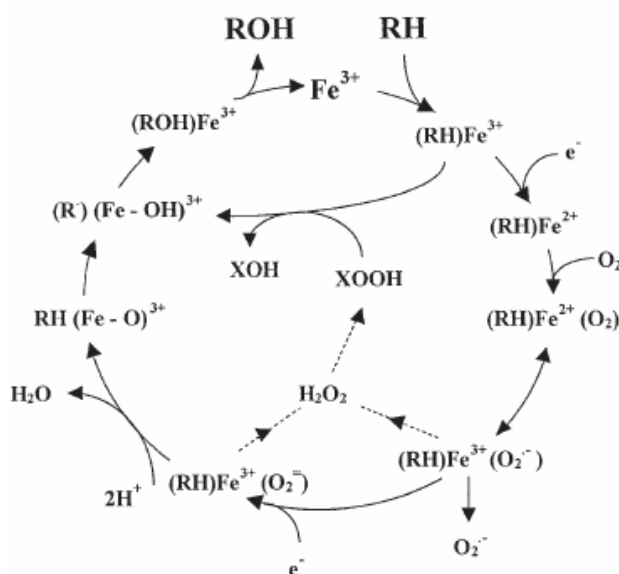
Struktura cytochromů P450 se skládá z  $\alpha$  – helixů A – L a z  $\beta$  – skládaných listů. Helixy I a L jsou v přímém kontaktu s hemem a přístupové místo substrátu je u smyček mezi helixy B a C a helixy F a G (Obr.1). Ve struktuře helixu I se nachází threonin, u jehož

bočního řetězce se nacházejí dvě molekuly vody, což je důležité pro přenos protonů na molekulu kyslíku

## 2.2 Reakční mechanismus cytochromu P450

Nejdůležitější vlastností všech známých cytochromů P450 je jejich schopnost vázat a aktivovat dva atomy kyslíku. Ve většině případů je to molekula kyslíku, nicméně mohou vázat peroxid vodíku nebo jiné peroxidy a zužitkovat jeden z jejich kyslíkových atomů k monooxygenaci (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Pro průběh reakčního mechanismu cytochromu P450 je důležitý pro přenos elektronů z NADPH přes příslušnou reduktasu cytochromu P450 (Obr. 2)

Mikrosomální cytochrom P450 se skládá ze dvou na membránu vázaných komponent, cytochromu a NADPH: cytochrom P450 reduktasy, která byla původně nazvaná NADPH: cytochrom c reduktasa. NADPH: cytochrom P450 reduktasa obsahuje jako kofaktory flavinadenindinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN). FAD přijímá dva elektrony z NADPH a přes FMN je přenáší dále na cytochrom P450 (Vermilion et al., 1981; Wang et al., 1997)



Obr. 2 Katalytický cyklus cytochromu P450. R-H, substrát; R-OH, produkt; XOOH, peroxid (X=H nebo organický zbytek); XOH, hydroxylovaný produkt (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Substrát RH se váže na oxidovanou formu enzymu a vzniká komplex RH – (Fe<sup>3+</sup>), dochází ke konformačním změnám proteinu. Ve druhém kroku se železo redukuje elektronem z NADPH: cytochrom P450 reduktasy. Poté se naváže molekula kyslíku a vzniká komplex, který je redukován dalším elektronem. V pátém kroku následuje heterolýza vazby O-O a vzniká reaktivní oxidant a molekula vody. V dalším kroku dochází k oddělení vodíkového atomu a k rychlému přenosu aktivovaného

kyslíku. Vznikne produkt, který je nakonec uvolněn, a získáme počáteční oxidovaný cytochrom P450.

## 2.3 Názvosloví

Všechny cytochromy P450 jsou členy nadrodiny, která se značí CYP. Vyskytují se v různých formách (nesprávně nazývané isoformy, isoenzymy), které jsou řazeny do rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových makromolekul (Stiborová et al., 1999). Je-li homologie kolem 40%, patří formy do stejné rodiny, která se označuje arabskou číslicí. Podrodina, založená na vyšší míře podobnosti sekvence, asi 55%, se značí velkým písmenem. Poslední arabská číslice určuje jednotlivý enzym (např. CYP3A4). Nová sekvence cytochromu P450 by se neměla lišit o více než 3% (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Důvod pro různé množství enzymu v organismech zřejmě odráží potřebu pro příslušné funkce. Zatímco v bakteriích je počet genu cytochromu P450 20, u lidí se jich nachází 57. V rostlinách je tento počet až 300, což bylo potvrzeno výsledky s genomem *Arabidopsis thaliana*. Rostliny potřebují tento enzym ze dvou důvodů – pro syntézu pigmentů a růstových látek a pro syntézu rostlinných toxinů (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

## 2.4 Významné formy cytochromu P450

Devět základních forem se podílí na biotransformaci přibližně 98% xenobiotik. Dříve se předpokládalo, že je cytochrom P450 lokalizovaný pouze v játrech a pouze malá část je přítomna i v jiných orgánech. Nejdůležitější z forem se jeví CYP3A4, která se ale nenachází v srdci, na rozdíl od CYP2D6, která metabolizuje některé  $\beta$  – blokátory a je popisována v pravé komoře. CYP2E1 je lokalizovaná v celém srdci a ve významných cévách. Tyto údaje mohou být velmi důležité pro určení cíle léků v oblastech srdce (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

Pro metabolismus léčiv je významný jaterní cytochrom P450. Průměrné zastoupení jaterních forem je znázorněno na obrázku 3.

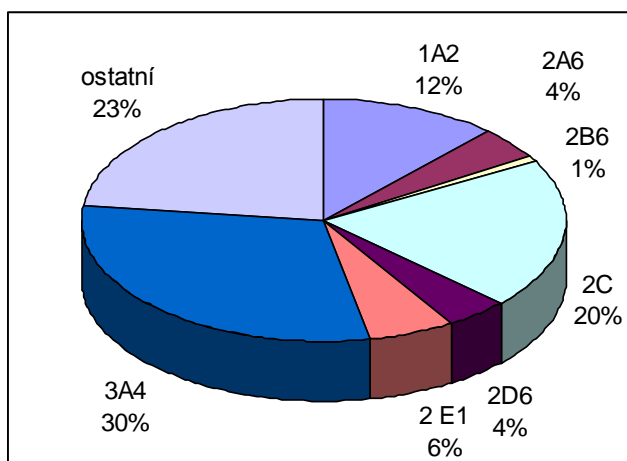
Většina léčiv je substrátem pro více forem cytochromu P450. Podle povahy substrátů rozlišujeme 3 skupiny lidských cytochromů P450:

První skupina, do které se řadí rodiny 1 – 3, vykazují významný genetický polymorfismus a mají nižší afinitu k substrátu. Právě tyto rodiny se účastní nejdůležitějších biotransformací xenobiotik.

Druhá skupina obsahuje 4. rodinu, která metabolizuje malé množství xenobiotik (Ingelman – Sundberg, 2004)

Do třetí skupiny se zařazují zbývající rodiny enzymu, které regulují různé úrovně metabolismu steroidů, prostaglandinů, tromboxanů, derivátů kyseliny retinové a kyseliny arachidonové (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Množství cytochromu P450 v jednotlivých tkáních nemůžeme brát absolutně. Závisí na mnoha faktorech, např. na vlivu vnějšího prostředí, genetickém polymorfismu, kouření, konzumaci alkoholu, na stravě, pohlaví, věku a na působení podávaných léčiv.



Obr. 3 Průměrné zastoupení jednotlivých forem jaterního cytochromu P450 (Zuber, 2002)

### 2.4.1 CYP1A2

Tato forma tvoří 12% z celkového jaterního cytochromu P450 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Zařazuje se mezi typické enzymy cytochromu P450, který je indukovatelný cigaretovým kouřem, heterocyklickými aminy, polyaromatickými uhlovodíky. Tento enzym je tedy velmi důležitý v metabolismu xenobiotik, z nichž řada jsou karcinogeny. Například metabolity aromatických aminů, vzniklé za účasti CYP1A2, zvyšují riziko tvorby nádorů močového měchýře a kolorektálních nádorů. Mezi substráty CYP1A2 se počítá několik léčiv a některé prokancerogeny. K nejvýznamnějším prokancerogenům se řadí již zmíněné aromatické aminy a polycyklické aromatické uhlovodíky. Mezi léky, které jsou metabolizované tímto enzymem, patří kofein, clozapin, theofylin, imipramin, (R) - warfarin a další (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Hladina CYP1A2 je ovlivněna různými faktory a stravou. Například, rostliny z čeledi *Brassicaceae* zvyšují jeho expresi, naopak čeleď *Apiaceae* ji snižují (Lampe et al., 2000)

## 2.4.2 CYP2A6

V játrech tvoří tento enzym minoritní podíl, pouze 1 – 5% z celkového cytochromu. Mezi substráty, které jsou metabolizované CYP2A6, se řadí nikotin, kumarin, nitrosaminy a warfarin.

## 2.4.3 CYP2B6

CYP2B6 představuje pouze 1% z celkového množství jaterního cytochromu P450. Jako takový hraje relativně vedlejší roli v metabolismu xenobiotik (Smith, 1998). Nicméně, v poslední době se jeho podíl na metabolismu léků zvyšuje. Mezi hlavní substráty, které jsou metabolizovány touto formou, se zařazují bupropion, cyklofosfamid, isofosfamid a nikotin (Pelkonen, 2008).

## 2.4.4 Podrodina 2C

Mezi nejvýznamnější členy této podrodiny patří CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19. Představuje asi 20% z celkového jaterního cytochromu P450 a z celkového počtu klinicky používaných léčiv metabolizuje přibližně 11%. (Zuber et al., 2002)

Forma CYP2C8 není příliš významná pro metabolismus léčiv, metabolizuje např. kyselinu retinovou, warfarin a taxol (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Významnou formou této podrodiny je CYP2C9, která se podílí na metabolismu širokého spektra léčiv. Mezi významné substráty patří diklofenak, ibuprofen, S-warfarin, a další nesteroidní antiflogistika a antibiotika.

Další forma patřící do této podrodiny, CYP2C19, je vysoce polymorfní. Substráty by měly být neutrální nebo slabě basické a mírně lipofilní (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Mezi základní substráty, které jsou metabolizovány CYP2C19, se zařazují diazepam, propranolol, omeprazol a S-mephenytoin (Bibi, 2008)

## 2.4.5 CYP2D6

Tato forma zaujímá pouze 4% z celkového jaterního cytochromu P450, ale metabolizuje téměř 30% léčiv (Zuber et al., 2002). CYP2D6 je snad nejdiskutovanější forma mezi odbornou veřejností kvůli jeho genetickému polymorfismu (Baranová et al., 2004). Jsou kvalifikované čtyři fenotypy: pomalí, střední, normální a ultrarychlí metabolizátoři (více kapitola Cytochromy P450). Fenotyp CYP2D6 pomalých metabolizátorů je spjatý s Parkinsonovou a s Alzheimerovou chorobou, ale na druhou stranu byl měl tento fenotyp chránit před rakovinou močového měchýře. Substráty CYP2D6 obsahují bazický atom dusíku. Hlavní substráty jsou  $\beta$ -adrenoreceptorové blokátory a tricyklická antidepresiva, která mohou mít při zvýšené dávce kardiotoxické

účinky. Mezi nejvýznamnější substráty CYP2D6 se řadí bufuralol, debrisochin, spartein a dextromethorfan (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

#### **2.4.6 CYP2E1**

CYP2E1 tvoří 6% celkového jaterního cytochromu P450 a metabolizuje asi 2% léčiv (Zuber et al., 2002). Tento enzym hraje důležitou roli v metabolismu ethanolu, který je významným induktorem formy CYP2E1. Dalšími významnými induktory jsou aceton a acetaldehyd, dokonce i hladovění a cukrovka (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Látky, které jsou metabolizované tímto enzymem, jsou relativně malé neutrální molekuly, většina obsahuje jednoduchý aromatický kruh. Mezi nejvýznamnější substráty se zařazují chlorzoxazon, benzen, theofylin, N-nitrosaminy a isofluran.

#### **2.4.7 CYP3A4**

Forma CYP3A4 zaujímá 30% celkového jaterního cytochromu P450 a metabolizuje přes 52% všech léčiv (Kousalová et al., 2003). Proto patří mezi nejdůležitější a nejvíce sledované formy cytochromu P450. To může být vysvětleno tím, že enzym obsahuje asi tři vazebná místa substrátu. Aktivní místo je tedy prostorné a flexibilní (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001), to má za následek neočekávané interakce mezi léčivy. Hladiny CYP3A4 se zvyšují (jsou indukovány) po podání řady látek. Mezi ně patří např. barbituráty, rifampicin, extrakt z třezalky tečkované a některé steroidy. K významným inhibitorům patří grapefruitová šťáva, resp. favonoidy/furanokumariny v ní obsažené. Jedna sklenice džusu má za následek až pětinasobná zvýšení hodnot farmakokinetických veličin  $C_{max}$  (maximální plasmatická koncentrace) a AUC (area under the curve = plocha pod křivkou koncentrace léčiva v krvi). K substrátům, které jsou metabolizovány CYP3A4, se řadí nifedipin, testosteron, polyaromatické uhlovodíky, aflatoxiny, aromatické aminy a další.

### **3 Metabolismus xenobiotik**

Xenobiotika jsou látky, které se v organismu normálně nevyskytují, nejsou nutné pro jeho vývoj a neslouží jako zdroj energie. Proto lidský organismus má obranný enzymatický systém, který většinou xenobiotika metabolizuje na méně toxickou nebo úplně netoxickou látku. Naopak, někdy může vzniknout i látka účinnější nebo dokonce toxičtější než původní xenobiotikum.

Interakce xenobiotika s organismem probíhá v několika fázích: absorpce, distribuce, interakce s cílovou strukturou (např. receptorem), biotransformace a exkrece.

#### **3.1 Vstup látek do organismu**

Do krevního řečiště se látky mohou dostat různými způsoby. Trávicím ústrojím po požití, pokožkou a potními a mazovými žlázami, respiračním systémem při vdechnutí a při poranění.

Prostup látky biomembránami může probíhat čtyřmi mechanismy.

- Prostou difúzí u látek rozpustných v tucích, kdy rychlost je závislá na koncentračním gradientu a rozdělovacím koeficientu.
- Membránovými póry prochází látky rozpustné ve vodě a nerozpustné v tucích. Tato penetrace je limitována velikostí molekuly a jejich tvarem.
- Dalším případem je transport pomocí nosičů. Přenáší se velké molekuly nerozpustné v tucích, které se naváží na nosič a vznikne komplex. Po průniku membránou se komplex rozpadne. Zvláštním případem je aktivní transport, kdy se komplex pohybuje proti koncentračnímu gradientu a je potřeba ATP.
- Posledním příkladem je endocytosa. Přenášejí se velké molekuly, které se dostávají do buňky obalené cytoplasmatickou membránou.

#### **3.2 Biotransformace**

Většina chemických látek podléhá v organismu biotransformačním přeměnám. Xenobiotika podléhají biotransformaci a jen výjimečně se vylučují v nezměněné formě.

Při biotransformaci dochází ke změně chemické struktury původní látky, a tím ke změně jejích vlastností. Výsledný metabolit bývá hydrofilnější, a tudíž se rychleji vylučuje močí (Knejzlík et al., 2000).

Důsledkem biotransformace může být snížení nebo naopak zvýšení toxicity látky. Důležitými činiteli v biotransformaci jsou výživa, věk, tělesný stav a pohlaví.

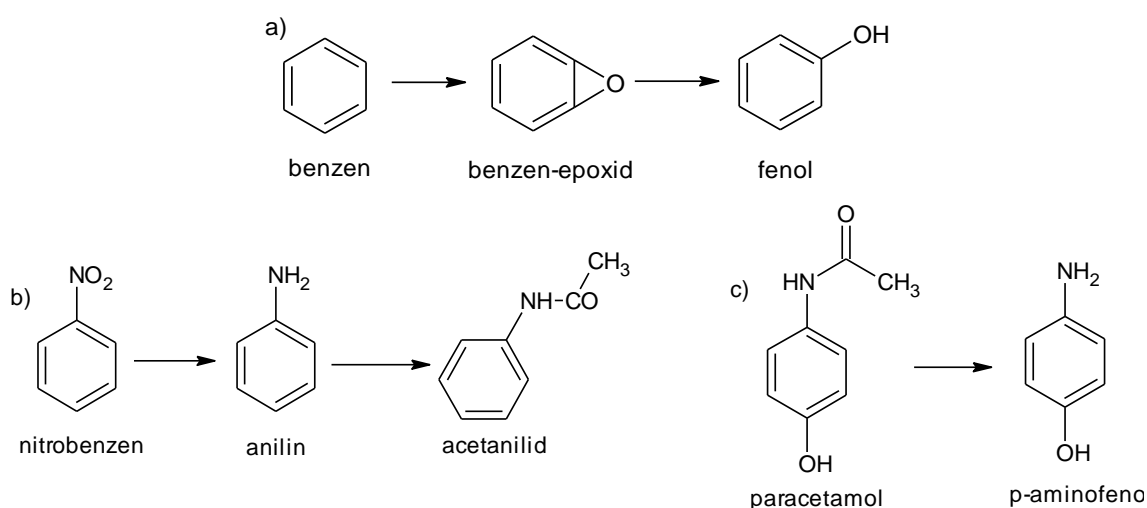


Většina metabolických přeměn je katalyzována specifickými enzymatickými systémy (cytochrom P450, flavinové monooxygenasy, alkoholdehydrogenasy, karboxylesterasy, atd.), především vázanými na endoplasmatické retikulum jater. Tento systém katalyzuje přeměnu látek lipofilních ve sloučeniny rozpustné ve vodě.

Biotransformace probíhá ve dvou fázích (I. fáze a II. fáze):

### 3.2.1 I. fáze biotransformace

Při reakcích I. fáze dochází k inkorporaci polární skupiny do původního substrátu. Tato fáze zahrnuje následující chemické pochody: oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace epoxidů a deaminace. Jedná se o reakce, které modifikují molekulu tak, aby byla schopná II. fáze detoxikace, tedy konjugace s aminy, kyselinami a alkoholy (Obr. 4). Nejdůležitějšími enzymy této fáze jsou cytochromy P450.

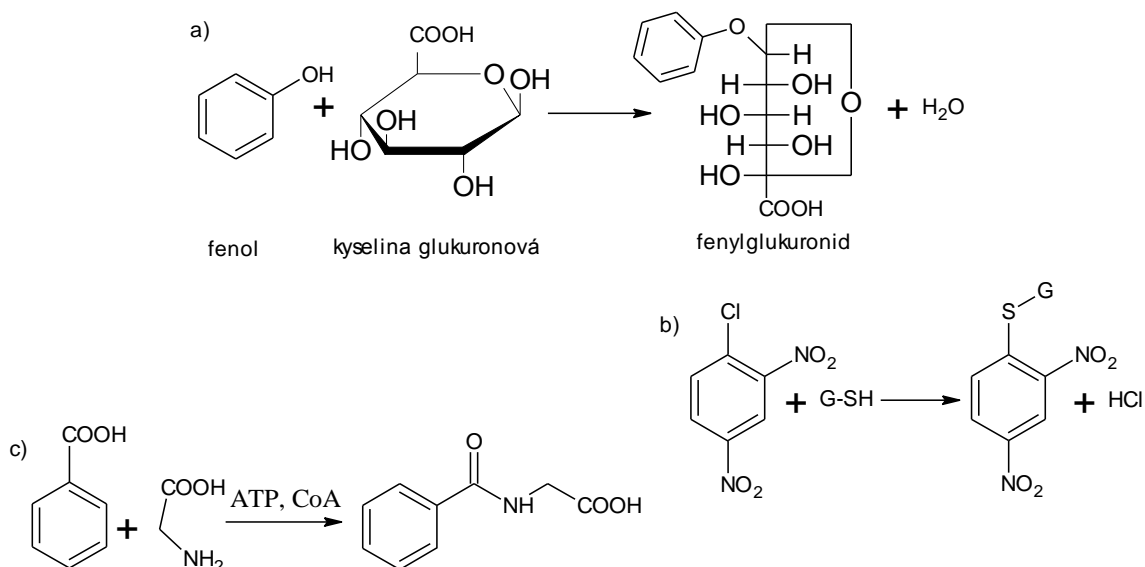


Obr. 4 Některé reakce I. fáze biotransformace – oxidace benzenu (a), redukce nitrobenzenu (b) a hydrolýza paracetamolu (c)

### 3.2.2 II. fáze biotransformace

II. fáze probíhá v cytosolu a dochází ke konjugaci molekul, které mají obsahují ve struktuře polární skupiny jako hydroxyl, amino nebo epoxid. Tyto reakce byly objeveny jako první, protože metabolity toxických látek jsou přítomny v krvi a séru. Obvykle je vzniklý konjugát látka ve vodě rozpustnější než původní látka nezměněná a tím dochází k usnadnění exkrece.

Mezi endogenní látky, které se konjugují s produkty I. fáze, patří např. kyselina glukuronová, kyselina sírová, glutathion, aminokyseliny (Obr. 5)



Obr. 5 Některé reakce II. fáze biotransformace – konjugace s kyselinou glukuronovou (a), glutathionová konjugace (b) a konjugace s glycinem (c)

### 3.3 Exkrece xenobiotik z organismu

Chemicky modifikovaná xenobiotika se vylučují z těla močí, potem a stolicí, pokud jsou to těkavé látky, vylučují se plícemi. Specifickým případem je u těhotenství a po porodu exkrece xenobiotika do mateřského mléka.

Látky, které byly biotransformovány v játrech se mohou dostat do žluče a následně do střeva. Velmi významným případem je dekonjugace a zpětná resorpce – enterohepatální oběh, při němž je metabolit udržován v organismu jako v pasti.

Nejdůležitějším orgánem exkrece jsou ledviny. Xenobiotika jsou vylučována močí společně s endogenními metabolity. Při filtraci primární moči se tvoří koncentrační gradient mezi krví a močí, proto jsou-li látky hydrofilní, mohou se zpět resorbovat. Dochází tedy k podobné situaci jako při enterohepatálním oběhu.

## 4 Lékové interakce

O lékových interakcích hovoříme, když při současném podávání dvou nebo více léčiv dojde ke změně účinků některého z nich. Dochází k vzájemnému ovlivňování jednotlivých účinků daných látek. Příčinou mohou být látky obsažené v potravě, nápoji nebo jiné chemické látky, které se vylučují např. při kouření. Lékové interakce mohou být žádoucí - buď zesilují účinek léčiva, nebo ho potlačují u léčiv, které způsobují intoxikaci. Na druhé straně mohou nastat nežádoucí interakce, které jsou nechtěné a potenciálně značně nebezpečné, protože ze zanedbatelného onemocnění může dojít až k ohrožení pacientova života.

Lékové interakce se dělí podle mechanismu na farmaceutické, farmakokinetické a farmakodynamické (Květina & Grundmann, 2003)

U farmaceutických interakcí dochází k fyzikálně – chemickému ovlivňování jednotlivých látek. Ovlivňování může nastat před podáním do organismu (např. v injekční stříkačce, v infuzním roztoku) nebo v místě podání (v GIT většinou dochází k zabránění nebo snížení absorpce).

U farmakokinetických interakcí dochází ke střetu léčiv na úrovni absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece. U distribuce dochází ke kompetici o vazbu na plasmatické proteiny. Metabolismus je lokalizovaný především v játrech, kde dochází k indukci nebo k inhibici. Exkrece je zajišťována ledvinami, přičemž může docházet k inhibici tubulární sekrece nebo tubulární reabsorpce kyselinou acetylsalicylovou.

Poslední interakce je farmakodynamická, kdy dochází k ovlivňování fyziologického systému nebo biochemické cesty metabolismu endogenních látek. Tyto interakce jsou především závažné u léčiv, u kterých je úzké rozmezí mezi terapeutickou a toxickou dávkou. Může docházet k interakcím na úrovni vazby na receptor, nebo na úrovni aktivace nebo blokády receptoru.

Aby se předešlo závažným interakcím, jsou prováděny preklinické a klinické studie. V preklinických studiích se především hodnotí inhibiční potenciál nových nebo už používaných látek screeningovými *in vitro* metodami. Podstatou je sledování enzymatických aktivit jednotlivých forem cytochromu P450 za použití markerových substrátů a studovaných inhibitorů, což poskytuje informaci o vlivu dané látky na aktivitu jednotlivých cytochromů P450, a zda jsou enzymy látkou inhibovány a v jakých koncentracích. Poté jsou tyto koncentrace porovnávány s klinicky pozorovanými plasmatickými koncentracemi.

Klinické studie se zabývají stanovením genotypu a fenotypu jedince. Sleduje se metabolický poměr, poměr koncentrací mateřská látka ku metabolitu, v moči nebo v krvi.

Mezi hlavní faktory enzymatické aktivity patří indukční a inhibiční vliv podávaných léčiv.

## **4.1 Indukce**

Při indukci dochází ke zvýšení hladin cytochromů P450 vlivem působení jedné z látek. Může docházet ke zrychlení metabolismu nebo ke snížení koncentrace druhého léčiva nebo plasmatických hladin a terapeutického účinku (Bibi, 2008). K těmto situacím dochází především v případech, kdy metabolity mají malý nebo žádný farmakologický účinek. Pokud mají metabolity větší účinek než mateřská látka, může dojít při enzymatické indukci k projevům zvýšeného farmakologického účinku a

eventuálně až k intoxikaci (např. kombinace paracetamolu a alkoholu). Nástup i trvání induktivního účinku závisí na biologickém poločase induktoru a na jeho dávce (Květina & Grundmann, 2003).

## **4.2 Inhibice**

Při inhibici dochází ke snížení aktivity enzymů díky přímé interakci s lékem. Obvykle začíná první dávkou inhibitoru a začátek a konec inhibice koreluje s poločasy rozpadů zapojených léčiv. Mezi často pozorované změny farmakokinetických parametrů patří snížená clearance léčiva, zvýšená AUC a prodloužený účinek léčiva.

Inhibice se dělí na dvě hlavní skupiny, reversibilní a ireversibilní inhibici, která nevratně blokuje enzymovou aktivitu tím, že vytváří s enzymem velmi pevný komplex enzym-inhibitor. Existují tři základní typy reversibilní inhibice enzymu, a to kompetitivní, kdy soutěží substrát s inhibitorem o vazebné místo na enzymu, nekompetitivní, při níž se inhibitor váže na jiné místo než substrát a ovlivňuje tak katalytickou reakci, a akompetitivní inhibice (Bibi, 2008)

Mezi významné inhibitory patří např. azolová antimykotika, makrolidová antibiotika, chloramfenikol, ale také grapefruitová šťáva nebo třezalkový čaj.

## 5 Platinové komplexy a jejich deriváty

Protinádorová aktivita cisplatiny (*cis* – diaminodichloroplatnatý komplex) byla objevena roku 1969 (Rosenberg et al., 1969). V současné době se cisplatina využívá k léčbě celé řady nádorů, např. nádorů prostaty, vaječníků, trávicí trubice, malobuněčných nádorů plic, močového měchýře a některých nádorů hlavy (Weiss & Christian, 1993). Nicméně je neúčinná proti nejčastějším nádorům prsu či tlustého střeva. Toxicita cisplatiny způsobuje velkou řadu vedlejších účinků léčiv, nejčastějšími komplikacemi jsou nefrotoxicita, ototoxicita, myelotoxicita či poškození krvetvorby a zažívacího traktu. Tento derivát platiny navíc má karcinogenní a mutagenní účinky. Některé typy nádorů vykazují i značnou rezistenci, tedy snižování citlivosti na cisplatinu při opakovaném podávání léčiva.

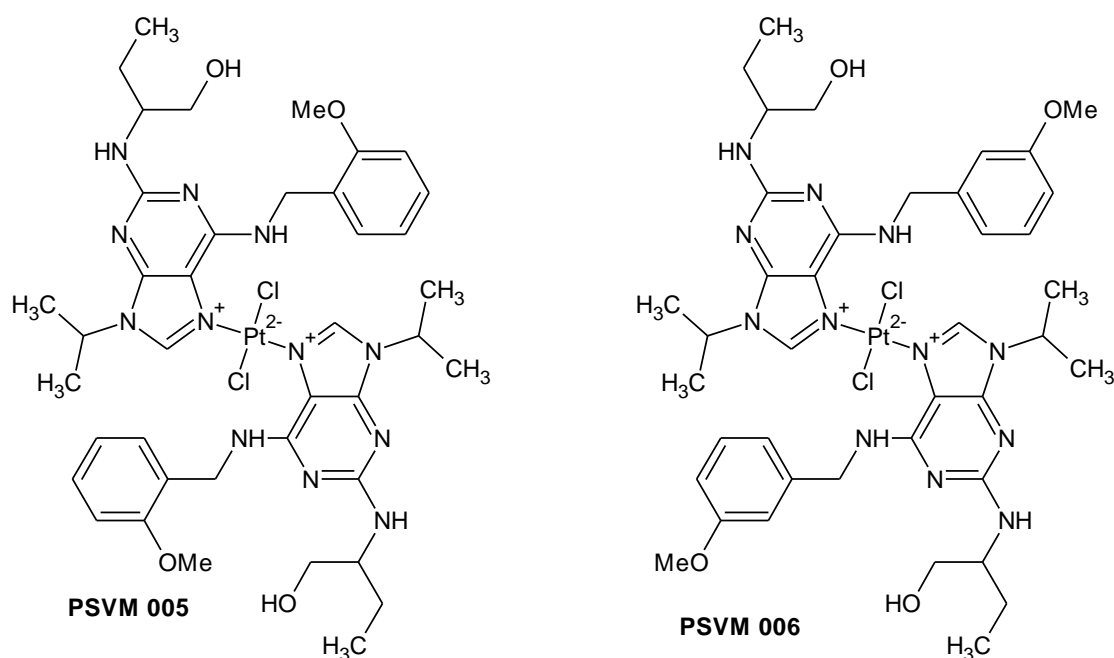
Velký úspěch cisplatiny při léčbě některých typů rakoviny vedl k rozsáhlému vývoji nových léčiv nejen odvozených od platiny. Byly objeveny nové deriváty cisplatiny – oxaliplatina (platinový komplex s 1,2–diamincyklohexanovým bifunkčním ligandem) a karboplatina (diamin-1,1-cyklobutandikarboxylato platnatý komplex). Oba dva deriváty byly zanedlouho zavedeny do klinické praxe, protože měly menší vedlejší účinky oproti cisplatině. Ovšem u některých typů nádorů je pořád cisplatina dosud nenahraditelná.

Vzhledem k tomu, že cílovým místem působení platinových komplexů je DNA, hledají se v současné době takové látky, které se vážou na DNA odlišným způsobem než „klasické“ komplexy (cisplatina,...), protože by mohlo být dosaženo i odlišného farmakologického efektu. Na počátku vývoje platinových komplexů se předpokládalo, že pouze komplexy s *cis* konfigurací mohou být protinádorově aktivní. Vycházelo se ze srovnání účinků cisplatiny a transplatiny (*trans* – diaminodichloroplatnatý komplex) na buněčné dělení *E. coli*, transplatina nevykazovala žádnou aktivitu (Reedijk, 1996; Pérez et al., 2000). Později se ukázalo, že transplatina a její deriváty, které vznikají záměnou aminoligandů, vykazují větší účinnost proti nádorům než cisplatinové komplexy.

V této práci byly předmětem studia dva deriváty transplatiny, u nichž byla změřená zvýšená biologická aktivita. Tyto deriváty jsou odvozené od transplatiny záměnou aminoligandů navázáním roskovitinu (6-(benzylamino)2-[[1-(hydroxymethyl)propyl] amino]-9-isopropylpurin) a liší se v polohách substituovaných methoxy skupinou na benzylu (Obr. 6)

Roskovitin se řadí mezi inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK), které se zařazují k proteinkinasám. Ty v dnešní době představují jednu z alternativních enzymových skupin jako cílů moderní protinádorové chemoterapie. Nejčastěji jsou tyto proteinkinasy studovány ve spojitosti s regulací buněčného cyklu, neboť exprese

cyklinů a jejich aktivita je typická pro určité fáze cyklu. Specifické inhibitory, mezi které patří roskovitin, olomoucín nebo olomoucín II, se staly novou generací potencionálních chemoterapeutik cílených zejména na nádorová onemocnění.



Obr. 6 Vzorce jednotlivých derivátů transplatiny

Roskovitin je látka odvozená z rostlinného hormonu 6-benzylaminopurinu. Protinádorové vlastnosti roskovitinu byly nejprve spojovány výhradně s buněčným cyklem, ale nebylo jasné, jak způsobují výraznou akumulaci nádorového proteinu p53, který monitoruje poškození DNA. Při velkém poškození reguluje geny podílející se na apoptoze. Další studia tuto záhadu vysvětlila. Roskovitin má schopnost inhibovat CDK7 a CDK9, které ovlivňují transkripci mRNA (Ljungman & Paulsen, 2001).

## Seznam literatury

- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737 – 747.
- Baranová J., Anzenbacher P., Kousalová L. (2004) Liekové interakcie na úrovni cytochrómov P450 – Časť II. Interakcie na úrovni CYP2D6. *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 102 – 107.
- Bibi Z. (2008) Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr. Metab.* **5**:27.
- Crespi C.L., Chang T.K.H., Waxman D.J. (1998) CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Methods Mol. Biol.* **107**, 141 – 145.
- Crespi C.L., Chang T.K.H., Waxman D.J. (2006) Determination of CYP2C9 – catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods Mol. Biol.* **320**, 109 – 113.
- Donato M.T., Jimenez N, Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (2004) Fluorescence-based assayed for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cell expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 699 – 706.
- Guengerich F.P., Martin M.V., Beaune P.H., Kremers P., Wolff T., Waxman D.J. (1986) Charakterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **261**, 5051 – 5060.
- Chang T.K.H., Waxman D.J. (2006) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as a substrate. *Methods Mol. Biol.* **320**, 85 – 90.
- Ingelman – Sundberg M. (2004) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorfisms. *Naunyn – Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **369**, 89 – 104.

- Ingelman – Sundberg M., Sim S.C., Gomez A., Rodriguez – Antona C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* **116**, 496 – 526.
- Klingenberg M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376 – 386.
- Knýzlek Z., Káš J., Ruml T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* **94**, 913 – 918.
- Kousalová L., Baranová J., Anzenbacher P. (2003) Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klin. Farmakol. Farm.* **17**, 151 – 157.
- Květina J., Grundmann M. (2003) Farmakologické interakce. *Klin. Farmakol. Farm.* **1**, 17 – 21.
- Lampe J.W., King I.B., Li S., Grate M.T., Barale K.V., Chen Ch., Feng Z., Potter J.D. (2000) Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* **21**, 1157 – 1162.
- Ljungman M., Paulsen M.T. (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol. Pharmacol.* **60**, 785 – 789.
- Lucas D., Menez J.F., Bertou F. (1996) Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1. *Methods Enzymol.* **272**, 115 – 123.
- Omura T., Sato R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**, 1375 – 1376.
- Pelkonen O., Turpein M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* **82**, 667 – 715.



- Pérez J.M., Fuertes M.A., Alonso C., Navarro – Ranninger C. (2000) Current status of the development of *trans* – platinum antitumor drugs. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **35**, 109 – 120.
- Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J. (1987) High-resolution crystal structure of Cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.* **195**, 687 – 700.
- Poulos T.L., Johnson E.F. (2005) Structures of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450. Structure, mechanism and biochemistry*, 3rd ed. (Ortiz de Montellano P.R., ed.), pp. 87 – 114, Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, USA
- Reedijk J. (1996) Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem. Commun.*, 801 – 806.
- Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E., Mansour V.H. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* **222**, 385 – 386.
- Segel I.H. (1993) Enzyme Kinetics, Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, pp. 170 – 176, Wiley Classics Library, USA
- Smith G., Stubbins M.J., Harries L.W., Wolf C.R. (1998) Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* **28**, 1129 – 1165.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229 – 237.
- Vermilion J.L., Ballou D.P., Masery V., Coon M. (1981) Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH: cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **256**, 266 – 277.
- Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S., Kim J.P. (1997) Three – dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes (x-ray crystallography flavoprotein nitric-oxide synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8411 – 8416.

Waxman D.J., Chang T.K.H. (2006) Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods Mol. Biol.* **320**, 91 – 96.

Weiss R.B, Christian M.C. (1993) New cisplatin analogs in development: a review. *Drugs* **46**, 360 – 377.

Williams P.A., Cosme J., Ward A., Angove H.C., Vinkovic D.M., Choti H. (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**, 464 – 468.

Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 189 – 198.

[www.promeega.com](http://www.promeega.com) (Technical Bulletin P450-Glo™ Assays, No 325)

## Seznam zkratk

AUC – area under the curve

CDK – cyklin - dependentní kinasa

CYP – cytochrom P450

EM – extensive metabolizers

HPLC – high – performance liquid chromatography

GIT – gastrointestinální trakt

IDH – isocitrát dehydrogenasa

IM – intermediate metabolizers

ISO – trisodná sůl kyseliny L – isocitronové

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

PCR – polymerase chain reaction

PM – poor metabolizers

UM – ultrarapid metabolizers