

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Barbora Otáhalová

**Inhibice enzymové aktivity cytochromů P450
endokrinním disruptorem 17 α -ethinylestradiolem**

Inhibition of enzyme activity of cytochromes P450
by endocrine disruptor 17 α -ethinylestradiol

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis autora

Abstrakt

17 α -ethinylestradiol (EE2), který patří mezi nejvíce předepisovaná léčiva, je syntetický hormon odvozený od tělu přirozeného hormonu 17 β -estradiolu. Řadí se mezi estrogení endokrinní disruptory, tedy látky, které jsou schopné měnit funkce endokrinního systému a způsobovat nežádoucí účinky v organismu i jeho potomstvu.

V této diplomové práci byl sledován vliv EE2 na enzymové aktivity hlavních enzymů I. fáze biotransformace xenobiotik, cytochromů P450 (CYP), *in vitro*. V potkaním organismu byly studovány isoformy 1A1, 2B1/2, 2C6, 2C11, 2E1 a 3A1/2. V lidském organismu byly studovány isoformy 1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2E1 a 3A4. Každá isoforma CYP byla inkubována s EE2 o dvou koncentracích, s 10 μ M EE2 a koncentrací EE2, která byla stejná jako koncentrace substrátu ve specifické markerové reakci CYP.

Výsledky ukázaly, že v potkaních jaterních mikrosomech byla v přítomnosti EE2 snížena aktivita všech studovaných isoform cytochromů P450 kromě isoformy CYP1A2. Nejvíce byla vlivem EE2 o koncentraci rovné koncentraci substrátu inhibována isoforma CYP2C6, jejíž aktivita byla snížena na 36%. V lidských jaterních mikrosomech došlo v přítomnosti EE2 k poklesu aktivity u isoform CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4. Nejvíce byla, stejně jako v potkaním modelu, inhibována isoforma podrodiny 2C, CYP2C9. Aktivita CYP2C9 byla po inkubaci s EE2 o koncentraci stejné jako koncentrace substrátu pouze 54%. CYP1A2 nebyl v lidských jaterních mikrosomech EE2 vůbec ovlivněn.

Dále byla stanovena koncentrace EE2 způsobující 50% inhibici (IC₅₀) lidských isoform rCYP1A1 a rCYP3A4. Pro rCYP1A1 byla hodnota IC₅₀ 25,6 μ M a pro rCYP3A4 byla hodnota IC₅₀ 4,5 μ M.

V případě potkaního rCYP1A1 byla pro určení typu inhibice 17 α -ethinylestradiolem provedena inhibiční studie. Ukázalo se, že rCYP1A1 podléhá při nízkých koncentracích substrátu 7-ethoxyresorufinu (7-ER) autoaktivaci a EE2 se při vysokých koncentracích 7-ER chová jako kompetitivní inhibitor rCYP1A1. Byl proveden odhad inhibiční konstanty K_i, jejíž hodnota byla 6,4 μ M.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, 17 α -ethinylestradiol, cytochrom P450, inhibice, IC₅₀

Abstract

17 α -ethinylestradiol (EE2) is a synthetic hormone, derivative of the natural hormone estradiol. EE2 is one of the the most prescribed drugs in the world. It belongs to the estrogenic endocrine disrupter chemicals. These compounds are able to alter functions of the endocrine system and cause adverse effects in the organism, offspring and (sub)population.

In this thesis, there are observed effects of 17 α -ethinylestradiol on enzyme activities of main enzymes involved in phase I of xenobiotic biotransformation, i.e. cytochromes P450 (CYP), *in vitro*. Isoforms of CYP subfamilies 1A, 2B, 2C, 2E and 3A were studied in rats and humans. Each CYP isoform was incubated with EE2 at two concentrations, 10 μ M EE2 and the concentration corresponding to the substrate concentration in the specific marker reactions of individual CYP isoforms.

The results indicate, that in rat liver microsomes the activity of all studied isoforms except CYP1A2 was decreased in the presence of EE2. When EE2 was added to the incubation mixture at the concentration of the reaction substrate, the greatest decrease in enzyme activity was observed for CYP2C6, with the remaining activity only 36%. In human liver microsomes, the activity of CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 was also effected by EE2. As in the case of rat model, CYP2C subfamily isoform was inhibited the most. The remaining activity of CYP2C9, after incubation with EE2 in the concentration of CYP marker reaction substrate, was only 54%. CYP1A2 was not affected by 17 α -ethinylestradiol in human liver microsomes.

The concentrations of EE2 causing 50% inhibition (IC₅₀) of human rCYP1A1 (25,6 μ M) and rCYP3A4 (4,5 μ M) were determined.

In the case of rat CYP1A1, the type of inhibition was determined by kinetic study. Results revealed that CYP1A1 is autoactivated at low concentrations of 7-ethoxyresorufin (7-ER) and that EE2 inhibits CYP1A1 in competitive manner at high concentrations of 7-ER. The inhibition constant was estimated to be 6,4 μ M.

[In Czech]

Key words: endocrine disruptors, 17 α -ethinylestradiol, cytochrome P450, inhibition, IC₅₀

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce **RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D.** za odborné vedení, laskavý přístup, ochotu a čas, které mi během vypracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za pomoc a užitečné rady při práci s HPLC.

V neposlední řadě děkuji mému příteli a rodině za podporu při vypracování této práce a během celého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
Úvod	12
1 Literární přehled	13
1.1 Estrogeny	13
1.2 17 α -ethinylestradiol	14
1.2.1 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu	15
1.3 Cytochromy P450	17
1.3.1 Mechanismus působení cytochromů P450	18
1.3.2 Cytochromy P450 podrodina 1A	20
1.3.3 Cytochromy P450 podrodina 2B	20
1.3.4 Cytochromy P450 podrodina 2C	21
1.3.5 Cytochromy P450 podrodina 2E	22
1.3.6 Cytochromy P450 podrodina 3A	22
1.3.7 Inhibice enzymové aktivity cytochromů P450	24
1.3.7.1 Reversibilní inhibice	24
1.3.7.2 Kvazi-ireversibilní inhibice	30
1.3.7.3 Ireversibilní inhibice	30
1.4 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450	31
2 Cíl práce	35
3 Materiál a metody	37
3.1 Použité chemikálie	37
3.2 Použité přístroje	39
3.3 Použité metody	41
3.3.1 Izolace mikrosomů	41
3.3.2 Stanovení množství proteinů	42
3.3.3 Stanovení aktivity CYP1A1 – O-deethylace 7-ethoxyresorufinu	44
3.3.3.1 Stanovení koncentrace IC ₅₀ lidského CYP1A1	46
3.3.3.2 Inhibiční studie potkaního CYP1A1	47
3.3.4 Stanovení aktivity CYP1A2 – O-demethylace 7-methoxyresorufinu	48

3.3.4.1	Stanovení koncentrace IC ₅₀ lidského a potkaního CYP1A2	49
3.3.5	Stanovení aktivity CYP2B1/2 – O-depentylace 7-pentoxyresorufinu	49
3.3.6	Stanovení aktivity CYP2B6 – hydroxylace bupropionu	50
3.3.7	Stanovení aktivity CYP2C6, CYP2C9 – 4'-hydroxylace diklofenaku	52
3.3.8	Stanovení aktivity CYP2C11 – 16 α -hydroxylace testosteronu	54
3.3.9	Stanovení aktivity CYP2E1 – 6-hydroxylace chlorzoxazonu	56
3.3.10	Stanovení aktivity CYP3A1/2 a CYP3A4 – 6 β -hydroxylace testosteronu	58
3.3.10.1	Stanovení koncentrace IC ₅₀ lidského CYP3A4	59
4	Výsledky	61
4.1	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních isoformů cytochromů P450 in vitro	61
4.1.1	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1	62
4.1.2	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2B1/2	63
4.1.3	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2C6 a CYP2C11	64
4.1.4	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2E1	65
4.1.5	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A1/2	66
4.2	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských isoformů cytochromů P450 in vitro	67
4.3	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaního rekombinantního cytochromu P450 1A2	69
4.4	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských rekombinantních cytochromů P450 1A1 a 1A2	70
4.5	Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidského rekombinantního cytochromu P450 3A4	71
4.6	Inhibiční studie potkaního cytochromu P450 1A1	72
5	Diskuze	79
	Závěr	89
	Seznam použité literatury	91

Seznam použitých zkratek

4'-OH-DIX	4'-hydroxylace diklofenaku
6-OH-CLZ	6-hydroxylace chlorzoxazonu
6 β -OH-TST	6 β -hydroxylace testosteronu
β -NF	β -naftoflavon
BFCOD	<i>O</i> -debenzylace 7-benzyloxy-4-trifluormethyl-kumarinu
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CTRL	kontrolní skupina
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vázající doména
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E1	estron
E2	estradiol
E3	estriol
EE2	17 α -ethinylestradiol
EDC	endokrinní disruptory
EFCOD	<i>O</i> -deethylace 7-ethoxy-4-trifluormethyl-kumarinu
EGF	epidermální růstový faktor
EI	komplex enzym-inhibitor
EIS	komplex enzym-inhibitor-substrát
ES	komplex enzym-substrát
ER α / β	estrogení receptor α / β
ERE	estrogen rozpoznávající úsek DNA
EROD	<i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu
exo-AFBO	epoxidace aflatoxinu B1
HAA	heterocyklické aromatické aminy

HLM	lidské jaterní mikrosomy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor-1
IC ₅₀	koncentrace sloučeniny způsobující 50% inhibici daného enzymu
K _M	Michaelisova konstanta
KCZ	ketokonazol
LBD	ligand vázající doména
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MIC	komplex metabolického meziproduktu
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí
MROD	<i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufinu
NADPH	nikotinamidadeninukleotid fosfát
NADPH-GS	NADPH-generující systém
OH-BUP	hydroxylace bupropionu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
PCN	pregenolon-16 α -karbonitril
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
POD	<i>O</i> -deethylace fenacetinu
PROD	<i>O</i> -depentylace 7-pentoxyresorufinu
ROH	hydroxyderivát substrátu
RPM	počet otáček za minutu
UGT	uridylglukuronosyltransferasy
V _{max}	maximální rychlost reakce

Úvod

Estrogenní sloučeniny jsou klíčové regulátory fyziologických změn spojených s ženským i mužským reprodukčním systémem (mléčná žláza, děloha, vagina, vaječníky, varlata, nadvarlata a prostata), dále hrají důležitou roli v udržení kvality kostí, centrálním nervovém systému a imunitních reakcích [1].

Za posledních 50 let se zaměřila pozornost na širokou škálu xenobiotik, které narušují endokrinní systém lidské populace a které jsou schopné s tělu přirozenými hormony interagovat. Tyto látky se označují jako endokrinní disruptory (EDC, z angl. „endocrine disrupting compounds“) [2]. Endokrinní disruptory jsou látky nebo směsi, které mění funkce endokrinního systému a způsobují nepříznivé zdravotní účinky v intaktním organismu, jeho potomstvu nebo (sub)populaci [3]. Do skupiny EDC patří exogenní i endogenní sloučeniny s estrogenní aktivitou, což jsou látky přírodní i syntetické. Mezi ně patří 17α -ethinylestradiol, syntetický derivát přirozeného hormonu 17β -estradiolu [4].

Vzhledem k tomu, že je 17α -ethinylestradiol hlavní složkou téměř všech přípravků moderní hormonální antikoncepce, řadí se mezi nejužívanější léčivo vůbec [5]. Jelikož je 17α -ethinylestradiol velmi odolný vůči biodegradacím procesům, dostává se snadno do potravního řetězce a zvyšuje riziko vzniku rakoviny varlat a prsu, snižuje kvalitu a počet spermií a způsobuje celkovou neplodnost [6].

Od roku 2013 je 17α -ethinylestradiol na seznamu sledovaných nově vznikajících látek znečišťující vodní ekosystém, který je součástí rámcové směrnice EU o vodě [7].

S ohledem na rizika, která 17α -ethinylestradiol pro člověka představuje, je jeho sledování v životním prostředí, studium jeho bioakumulace, metabolismu, biodegradace, a toxicity velmi důležité a zkoumané mnoha institucemi po celém světě [6].

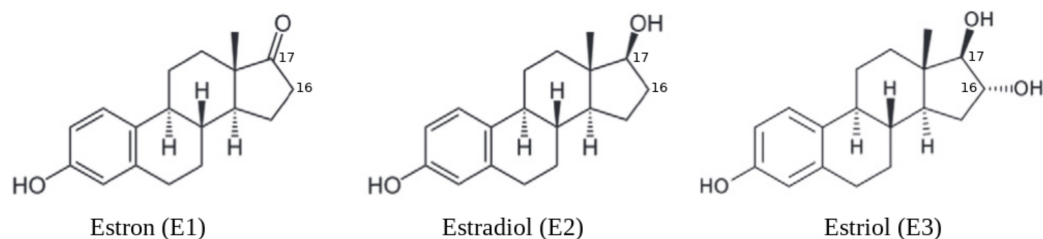
1. Literární přehled

1.1 Estrogeny

Estrogeny jsou biologicky aktivní látky, patřící do skupiny steroidních hormonů. Stejně jako progesterony, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a androgeny jsou odvozeny od cholesterolu [8]. Jsou uvolňovány kůrou nadledvin, varlaty, vaječníky a placentou v lidském i zvířecím organismu. Jedná se především o ženské pohlavní hormony, které zajišťují správnou funkci reprodukčních orgánů, prsů, pokožky a mozku [8]. Estrogeny působí na buňku především genomovým účinkem pomocí estrogenních receptorů $ER\alpha$ a $ER\beta$ [9]. Estrogenní sloučeniny se nachází i v rostlinné říši a to ve formě fytoestrogenů [10].

Biosyntéza estrogenů vychází z cholesterolu a probíhá ve vaječnicích, placentě, tukové tkáni a varlatech [11]. Biosyntézu estrogenů z cholesterolu zajišťuje systém cytochromů P450, konkrétně CYP11A1, CYP17A1 a CYP19A1 (aromatasa), který přeměňuje androgeny na estrogeny aromatizací cyklohexanového kruhu a odstraněním methylové skupiny [12].

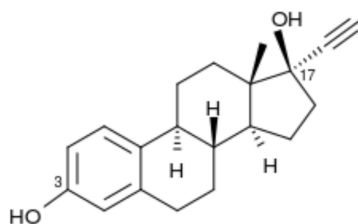
Přírodní estrogeny sdílí stejnou tetracyklickou molekulu složenou ze čtyř kruhů – aromatického, dvou cyklohexanových a jednoho cyklopentanového kruhu [8]. Strukturální rozdíl estrogenů spočívá v rozdílné konfiguraci na uhlíku 16 a 17, kde mohou být navázané různé funkční skupiny. V případě estronu (E1) je navázána karboxylová skupina na C17, 17β -estradiol (E2) obsahuje hydroxylovou skupinu na C17 a estriol (E3) má dvě hydroxylové skupiny na C16 a C17 [5, 8]. Struktura přírodních estrogenů je na obrázku 1.1. Nejsilnějším estrogenem v lidském těle je 17β -estradiol, který je prekurzorem syntetického derivátu 17α -ethinylestradiolu používaného ve většině perorálních hormonálních antikoncepcí [10].



Obrázek 1.1. Struktura přírodních estrogenních hormonů (převzato a upraveno z [8]).

1.2 17 α -ethinylestradiol

Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol je derivátem přirozeného hormonu estradiolu [13]. Od estradiolu se liší tím, že má na uhlíku C-17 navázanou ethinylovou skupinu, která je velmi výhodná pro použití EE2 v přípravcích hormonální antikoncepce (obrázek 1.2). Důvod, proč je v přípravcích hormonální antikoncepce nahrazován estradiol syntetickým 17 α -ethinylestradiolem je ten, že 17 α -ethinylestradiol má díky ethinylové skupině dvakrát delší poločas rozpadu než E2, čímž je odolnější vůči biodegradaci a rychlé inaktivaci v játrech. Ethinylová skupina v poloze C-17 blokuje potenciální tvorbu ketonu a stericky brání přístupu hydroxylové skupiny na C-17 β . Přestože má EE2 velmi podobnou strukturu jako E2, obsahuje EE2 díky ethinylové skupině dva kvartérní uhlíky, čímž je vůči biodegradaci odolnější [14].



Obrázek 1.2. Struktura 17 α -ethinylestradiolu (vytvořeno v programu BKchem).

Díky ethinylové skupině na C-17 je 17 α -ethinylestradiol mnohem aktivnější než jeho prekurzor 17 β -estradiol [15]. Ethinylová skupina brání oxidaci 17 β -hydroxyskupiny, která je oxidována při přeměně estradiolu na estron. 17 α -ethinylová skupina může být navíc oxidována, což vede k tvorbě velmi reaktivních meziproductů, které mohou nevratně inhibovat cytochromy P450 (CYP) zapojené do metabolismu EE2 [15].

Dříve než je EE2 vyloučen z těla močí a stolicí, je metabolizován na biologicky inaktivní formy hydroxylací a následnou methylací nebo konjugací se sulfáty a glukuronidy na C-3 a/nebo C-17 [13].

17 α -ethinylestradiol je terapeuticky využíván od roku 1960, kdy byly prokázány příznivé účinky na regulaci plodnosti žen v produktivním věku [12]. EE2 je používán téměř ve všech přípravcích kombinované hormonální antikoncepce a je také předepisován v rámci substituční hormonální léčby, při léčbě rakoviny

prostaty a prsu a osteoporózy [5]. EE2 je zároveň používán ke zvýšení produktivity hospodářských zvířat podporou růstu, prevencí a léčbou reprodukčních poruch. V chovu ryb se EE2 používá k vývoji jednopohlavních rybích populací, aby byl optimalizován jejich růst [5, 12].

Ačkoliv je užívání ethinylestradiolu relativně bezpečné, byly zjištěny rozdíly v rychlosti metabolismu EE2, kdy nízké i vysoké hodnoty EE2 mohou vést ke klinickým problémům [16]. Interakce léčiv a EE2 se rozděluje do dvou skupin [17]. V prvním případě se EE2 chová jako „oběť“. Souběžně podávaná léčiva inhibují nebo indukují enzymy metabolizující EE2 a tím ovlivňují jeho farmakokinetiku. Tyto lékové interakce jsou nežádoucí. Inhibice vede ke zvýšení koncentrace EE2 a tím ke vzniku vaskulárních onemocnění a hypertenze. Indukce vede ke snížení plazmatické koncentrace EE2 a tím k průlomovým krvácením a neplánovaným těhotenstvím. V druhém případě se EE2 chová jako „pachatel“ a inhibuje nebo indukuje enzymy metabolizující souběžně podávaná léčiva [17].

Biologický účinek 17 α -ethinylestradiolu je zprostředkovaný interakcí s estrogenními receptory a je analogický působení přirozených estrogenů (zejména E2) [12]. Na základě tohoto mechanismu bylo prokázáno, že EE2 je 100 \times více účinný ve srovnání s E2 a pro dosažení stejného stupně biologického účinku jsou vyžadovány nižší dávky orálně podávaného EE2 než E2 [12].

EE2 se řadí mezi estrogenní endokrinní disruptory, tedy látky schopné měnit funkce endokrinního systému a následně způsobovat nepříznivé zdravotní účinky ve zdravém organismu, potomstvu nebo (sub)populaci [3].

1.2.1 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

17 α -ethinylestradiol je jeden z mála léčiv, které prochází předsystémovým metabolismem, a je z větší míry metabolisován ve střevě než v játrech [12].

Nejvýznamnějšími reakcemi metabolismu, kterými EE2 prochází jsou oxidační reakce na různých pozicích steroidního jádra [12]. Kvantitativně nejvýznamnější reakcí metabolismu EE2 je hydroxylace na C-2 (obrázek 1.3 na straně 17). Narozdíl od estradiolu nemůže být EE2 hydroxylován v pozici C-16 kvůli sterickému bránění ethinylové skupiny na C-17 α . Prozatím není zámo, jestli je nepřítomnost 16 α -hydroxylace EE2 nějak farmakologicky významná. Hydroxylace v pozici 4, 6

a 16 β byly prokázány také, ale k metabolismu ethinylestradiolu ve značné míře nepřispívají [12].

Hydroxylační reakce jsou katalyzované cytochromy P450 [16]. Bylo prokázáno, že hlavními lidskými cytochromy, které hydroxylují EE2 v pozici C-2, jsou CYP3A4, CYP2C9 a CYP2E1 [15]. Další isoformy přispívající k 2-hydroxylaci EE2 v lidském organismu jsou CYP2C8, CYP2C19 a CYP1A2, zatímco příspěvek CYP2A6, CYP2B6 a CYP2D6 k 2-hydroxylaci EE2 je zanedbatelný [19]. V potkaním organismu jsou do 2-hydroxylace EE2 zapojeny především jaterní CYP1A1, CYP2C a CYP2E [18]. Další studie potvrdila, že EE2 je efektivně hydroxylován v pozici C-2 pomocí CYP2C6 a CYP2C11, zatímco CYP2A a CYP3A katalyzují přeměnu EE2 na jeho minoritní metabolit X-OH-EE2, jehož struktura zatím nebyla identifikována [20]. Následně může docházet pomocí katechol-*O*-methyltransferasy k methylaci 2-OH-EE2 a vzniku sekundárního metabolitu 2-methoxyethinylestradiolu [21].

Jak 17 α -ethinylestradiol, tak jeho hydroxylované metabolity podléhají konjugaci v játrech (obrázek 1.3 na straně 17) [12]. EE2 může být přeměňován na sulfáty (ethinylestradiol-3-sulfát, ethinylestradiol-17-sulfát), které cirkulují krví v koncentracích 10 \times vyšších než samotný EE2. EE2 je sulfatován především v 3-*O* a 17-*O*-pozici, přičemž 3-*O*-sulfatace je častější. Sulfatace EE2 je katalyzovaná sulfotransferasami (SULT), které jsou exprimované především v gastrointestinálním traktu a játrech [15].

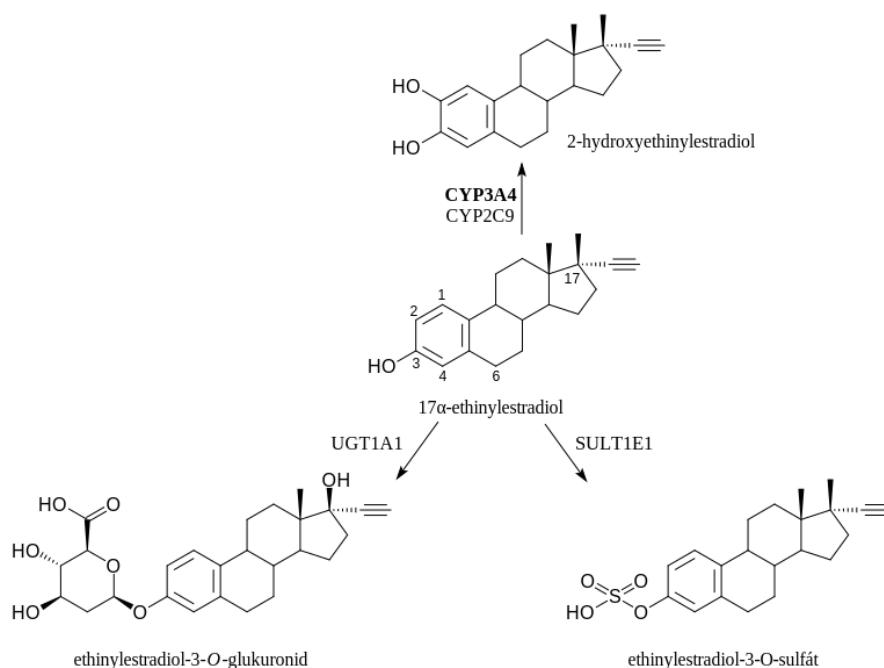
17 α -ethinylestradiol je částečně přeměňován také na glukuronidy (ethinylestradiol-3-glukuronid a ethinylestradiol-17-glukuronid), které jsou biologicky inaktivní [22]. Glukuronizace probíhá stejně jako sulfatace v gastrointestinálním traktu a játrech na 3-*O* a 17-*O*-pozici pomocí uridylglukuronosyltransferas (UGT) [23]. Inaktivované glukuronidy prochází velmi rychlou renální clearance, kdy je krev v ledvinách očištěna a glukuronidy odchází močí [12].

Během enterohepatální recirkulace jsou sulfáty částečně dekonjugovány na EE2 (EE2-3-sulfát až 12% a EE2-17-sulfát až 20%), což přispívá k cirkulujícímu nekonjugovanému EE2 [22].

Konečná eliminační fáze EE2 je charakterizována poločasem rozpadu EE2, který

činí 5 – 30 hodin [12]. Přibližně 62 % EE2 a jeho metabolitů je vylučováno stolicí a 38 % močí. Močí je vylučováno 6 % nekonjugovaného EE2, 80 % glukuronidů a 8 – 10 % sulfátů a 9 % nekonjugovaného EE2 odchází stolicí. Metabolizovaný EE2 odchází z těla přítomný také ve žluči [12].

Konjugovaný a nemetabolizovaný EE2 přechází do odpadních vod [24]. V čističkách odpadních vod je uvolněn z konjugátů hydrolýzou, není zde však dostatečně zachycován a přechází tak dále do životního prostředí [24].



Obrázek 1.3. Hlavní metabolické dráhy EE2 u člověka (převzato a upraveno z [17]).

1.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny, které patří mezi enzymy katalyzující oxidační, peroxidační a redukční reakce [25]. CYP jsou součástí monoxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxidases), kde CYP funguje jako terminální oxidasa. Součástí MFO je také NADPH:cytochrom P450 reduktasa, která s CYP spolupůsobí [25].

Cytochromy P450 dostaly své jméno podle svých neobvyklých spektrálních vlastností, díky kterým vykazují typické absorpční maximum (450 nm) při vazbě CO na redukovaný komplex [26].

Cytochromy P450 jsou rozděleny do rodin a podrodin na základě procentuální identity aminokyselinové sekvence [27]. CYP, které sdílí více než 40% identitu aminokyselinové sekvence, se řadí do jedné rodiny, ta je označena číslem za zkratkou CYP. Do jedné podrodiny se řadí ty CYP, které vykazují více než 55% identitu aminokyselinové sekvence. Podrodiny se označují velkým písmenem za číslem rodiny. Jednotlivé isoenzymy jsou označeny číslem za písmenem podrodiny [27].

CYP jsou přítomny téměř v celém těle a to především v játrech, plicích, tenkém střevě, ledvinách, nadledvinkách, mozku a kůži [25]. V rámci buňky se vyskytují převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula a membránách mitochondrií [25].

CYP jsou intracelulární hemoproteiny, obsahující přibližně 500 aminokyselin [28]. Obsahují protoporfyrinový skelet (protoporfyrin IX), který je hydrofobními silami a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu vázán v aktivním centru enzymu. Sulfhydrylová skupina cysteinu mění elektronovou hustotu porfyrinového kruhu hemu a díky tomu poskytuje elektronové centrum pro aktivaci molekulárního kyslíku. [28]

1.3.1 Mechanismus působení cytochromů P450

Na počátku reakce je hemové železo ve ferri formě a hexakoordinované (nizkospinový stav). Katalytický cyklus zahrnuje řadu následujících kroků (obrázek 1.4 na straně 19) [25, 28–30].

Prvním krokem je vazba substrátu, která vede ke konformačním změnám hemoproteinového systému. Dojde k posunutí absorpčního pásu hemu, zvýšení redoxního potenciálu a železo je pentakoordinováno (vysokospinový stav).

Druhým krokem je jednoelektronová redukce, kdy je hemové železo redukováno díky redoxnímu potenciálu z předchozího kroku na ferro formu jedním elektronem z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, se kterou CYP spolupůsobí. Tato forma je pak schopna vázat molekulární kyslík.

Třetím krokem je vazba molekuly kyslíku poskytující superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinováno a v nizkospinové formě.

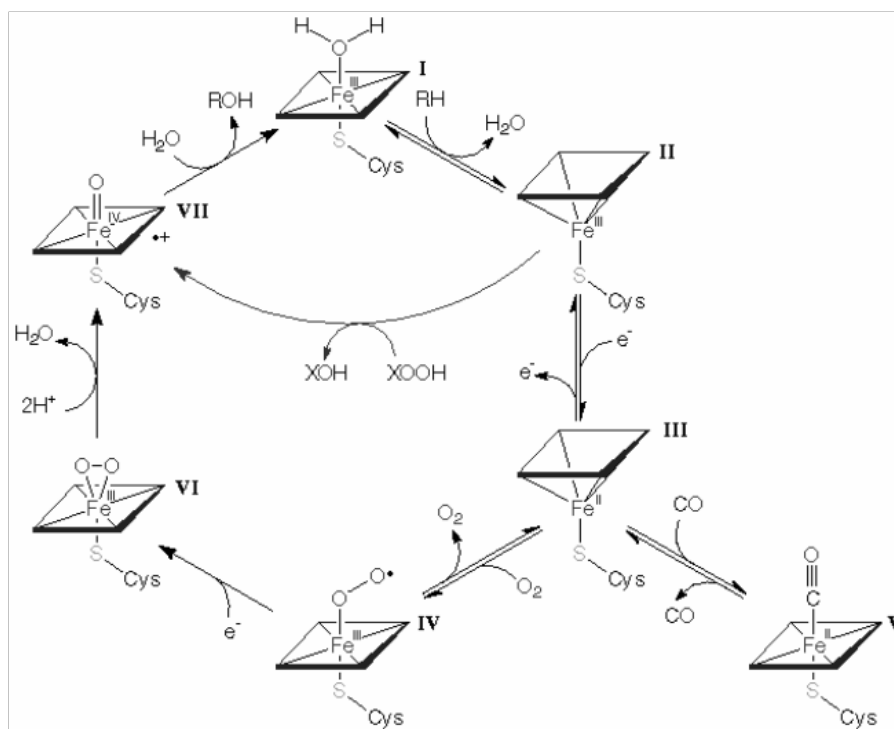
Ve čtvrtém kroku dochází k druhému redukčnímu kroku, kdy se na nestabilní

superoxidový komplex přenáší druhý elektron NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b5 reduktasou, čímž dojde k aktivaci kyslíku na peroxidový ion.

V pátém kroku dochází ke štěpení vazby O–O. Na jednom atomu kyslíku dochází k protonaci dvěma H^+ a uvolnění molekuly vody. Druhý kyslík však zůstává vázaný na hemovém železu a vzniká ferrioxenový komplex.

V šestém kroku je ferrioxenový komplex stabilizován posunem elektronů z thiolátové síry cysteinu na kyslík. Vzniká kyslíkový radikál, který vytrhne vodíkový atom z molekuly substrátu a vzniká substrátový radikál a hydroxylový radikál navázaný na hemovém železu.

Nakonec dochází k rekombinaci radikálů a tím vzniku hydroxyderivátu substrátu (ROH) a nativního cytochromu P450.



Obrázek 1.4. Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato a upraveno z [26]. **I – II:** Hemové železo je v klidové formě hexakoordinováno (ferri forma) a po vazbě substrátu RH pentakoordinováno. **II – III:** Redukce železa jednoelektronovou redukcí na ferro formu. **III – IV:** Po vazbě molekulárního kyslíku je železo opět hexakoordinováno. **III – V:** Vazba oxidu uhelnatého. **IV – VI:** Redukce NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b5 reduktasou. **VI – VII:** Štěpení vazby O–O za současného uvolnění vody. **VII – I:** Vznik nativního CYP a vznik hydroxyderivátu substrátu (ROH).

1.3.2 Cytochromy P450 podrodina 1A

Lidské cytochromy P450 podrodiny 1A jsou nejvýznamější cytochromy P450 v rámci aktivace prokarcinogenů na karcinogeny, protože aktivují až 90 % všech doposud známých karcinogenů [25]. CYP1A katalyzují oxygenaci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH, z angl. polyaromatic hydrocarbon), heterocyklických aromatických aminů (HAA, z angl. heterocyclic aromatic amines), demethylaci azobarviv, dealkylaci fenacetinu a kofeinu a dalších terapeutických látek [31]. Ačkoliv oxygenací substrátů CYP1A dochází k tvorbě polárních metabolitů, které jsou snáze vylučitelné, vede oxygenace PAH a HAA také k tvorbě arenoxidů, diolepoxidů a jiných elektrofilních reaktivních meziproductů, které mohou způsobit vzniku DNA aduktů, přispívajících ke karcinogenezi a tím vzniku nádorů [32].

Hlavní lidské isoformy cytochromů P450 podrodiny 1A jsou CYP1A1 a CYP1A2. CYP1A1 je exprimovaný v extrahepatálních tkáních, především v tkáni plic, kůže, gastrointestinálním traktu, ale také v tkáni placenty, plodu a embrya [33]. CYP1A2 je narozdíl od CYP1A1 typickým jaterním enzymem. CYP1A2 tvoří 13 % veškerých CYP v játrech a metabolisuje 4 % všech podávaných léčiv [35].

Ačkoliv CYP1A1 a CYP1A2 sdílí 70% sekvenční homologii, jejich substráty jsou rozdílné. CYP1A1 preferuje planární aromatické uhlovodíky a CYP1A2 aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny [36].

Potkaní CYP1A1 je exprimován především v tenkém střevě, dále v játrech, ledvinách, plicích a placentě [35]. S potkaním CYP1A1 sdílí lidský CYP1A1 79% aminokyselinovou sekvenci [37]. Potkaní CYP1A2 je exprimován stejně jako lidský CYP1A2 výhradně v játrech [35] a s lidským CYP1A2 sdílí 72% aminokyselinovou identitu [38].

1.3.3 Cytochromy P450 podrodina 2B

Mezi lidské cytochromy P450 podrodiny 2B patří CYP2B6 a CYP2B7. CYP2B6 je exprimován v játrech, zatímco minoritní isoforma CYP2B7 je exprimována v plicní tkáni [35].

Ačkoliv je množství CYP2B6 v lidském organismu velmi nízké (0,2 % celkového množství CYP), je tento cytochrom P450 velmi důležitý z hlediska participace na

karcinogenezi [25] a metabolismu až 25 % předepisovaných léčiv [35]. Hraje důležitou roli v metabolismu protinádorových léčiv jako jsou cyklofosfamid, ifosfamid [25] a tamoxifen [35], v metabolismu anestetik ketaminu a propofolu a environmentálních polutantů aflatoxinu B1 a dibenzanthracenu [35].

V potkanech jsou exprimované 3 isoformy: CYP2B1, CYP2B2 a CYP2B3 [37]. CYP2B1 a CYP2B2 jsou strukturně velmi podobné a sdílí 97% identitu [35]. CYP2B1/2 jsou exprimovány v játrech a extrahepatálních tkáních (tenké střevo, plíce). Expres potkaních CYP2B je sexuálně dimorfní, přičemž samci potkanů exprimují vyšší hladiny CYP2B než samice [35]. CYP2B1 sdílí s lidským CYP2B6 76% aminokyselinovou identitu [37].

1.3.4 Cytochromy P450 podrodina 2C

Cytochromy P450 podrodiny 2C jsou u člověka hojně zastoupeny a mají velmi širokou substrátovou specifitu [25]. Podrodina 2C je komplexní podrodinou, jejíž proteiny vykazují 80% homologii [34].

Hlavní lidské isoformy CYP2C jsou CYP2C8 a CYP2C9, které tvoří 35 a 60 % celkového množství CYP, zatímco minoritní isoformy CYP2C18 a CYP2C19 tvoří 4 a 1 % celkového množství CYP [35]. CYP2C18 není exprimován v játrech téměř vůbec, ale je hlavní isoformou epidermis. CYP2C8 je exprimován především v játrech, ledvinách, nadledvinkách, mozku, děloze, mléčných žlázách, vaječníku a dvanáctníku. CYP2C9 je exprimován především v játrech, ledvinách, varlatech, nadledvinkách, prostatě, vaječnicích a dvanáctníku. CYP2C19 je exprimován v játrech a dvanáctníku [35].

Cytochromy P450 2C jsou zapojeny do metabolismu 16 % předepisovaných léčiv [35]. Pro isoformu CYP2C19 je významný genetický polymorfismus, který způsobuje, že u určitých skupin lidské populace (afroameričané, asiáté) jsou účinky některých léčiv dependentní na polymorfně exprimovaném CYP2C19 [25, 35]. CYP2C8 je zapojen do metabolismu retinolu a kyseliny retinové, kyseliny arachidonové, benzo[a]pyrenu a protinádorového léčiva paclitaxelu [35]. CYP2C9 je hlavní jaterní isoformou CYP2C a je zapojen do metabolismu řady klinicky významných látek jako je phenytoin, *S*-warfarin a několika protizánětlivých léčiv - ibuprofen, diklofenak, piroxicam, tenoxicam, kyselina mefenamová [39]. CYP2C19 je

zapojen do metabolismu omeprazolu, některých tricyklických antidepresiv, jako je imipramin, barbiturátů, je odpovědný za metabolismus β -blokátorů - propranolol a za metabolismus antimalarika proguanil [39].

Hlavní potkaní isoformy CYP2C jsou CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C13, CYP2C22 a CYP2C23 [35]. CYP2C je hlavní podrodinou CYP v potkaních játrech. Mezi potkaními isoformami je významný sexuální dimorfismus. Potkaní samice exprimují vyšší hladiny CYP2C7 a CYP2C12 než samci. Potkaní samci exprimují vyšší hladiny CYP2C11 a CYP2C13. Ostatní isoformy sexuálně dimorfní nejsou [35].

1.3.5 Cytochromy P450 podrodina 2E

Podrodina 2E zahrnuje jedinou isoformu cytochromů P450. Jedná se o isoformu CYP2E1, která vykazuje velkou podobnost mezi jednotlivými organismy [37]. Lidský CYP2E1 sdílí 80% aminokyselinovou identitu s potkaním, myším a psím CYP2E1 a s opičím CYP2E1 sdílí 96% aminokyselinovou identitu [35]. V potkaním organismu se nachází ještě CYP2E2, který je však exprimován pouze v neonatálním období [37].

CYP2E1 je exprimován především v nosní sliznici, hltanu, plicích a játrech [35]. Dále se CYP2E1 vykytuje v játrech plodu a jeho aktivita je shodná s aktivitou CYP2E1 v játrech dospělých jedinců [40]. Jelikož CYP2E1 oxiduje ethanol a acetaldehyd, předpokládá se, že je CYP2E1 hlavní ethanol-metabolisující systém lidského plodu [40].

Cytochrom P450 ze všech organismů katalyzuje oxidaci ethanolu a jiných alkoholů, krátkých alifatických řetězců *N*-nitrosaminů [37] a jiných organických sloučenin jako jsou benzen, styren, akrylonitril [35]. CYP2E1 zajišťuje metabolismus řady léčiv jako je acetaminofen (paracetamol), kofein, chlorzoxazon, enfluran [35].

1.3.6 Cytochromy P450 podrodina 3A

Cytochromy P450 podrodiny 3A jsou nejvýznamější cytochromy P450 v lidském organismu. Jedná se o podrodinu cytochromů P450, které katalyzují biotransformaci 50 % veškerých předepisovaných léčiv [35].

Hlavní lidské isoformy CYP3A jsou CYP3A4, CYP3A5. CYP3A4 a CYP3A5 sdílí z 88% stejnou aminokyselinovou sekvenci [37]. CYP3A4 a CYP3A5 jsou exprimovány v játrech, žaludku, plicích, tenkém střevě a ledvinách. CYP3A7 je exprimován pouze v játrech plodu [35].

CYP3A4 je nejvíce zastoupenou lidskou isoformou [41]. CYP3A4 je lokalizován především na vrcholu klků v enterocytech, kde hraje důležitou úlohu v metabolismu xenobiotik při prvním průchodu [35]. CYP3A4 katalyzuje především přeměnu řady léčiv, ale participuje i na karcinogenesi některých sloučenin jako jsou přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a steroidní sloučeniny (17 β -estradiol, testosteron, progesteron, kortisol) [25]. Substrátová specifita CYP3A5 je velmi podobná substrátové specifitě CYP3A4, ačkoliv je role CYP3A5 v metabolismu léčiv v játrech významně nižší v porovnání s CYP3A4 [41]. CYP3A7 je hlavní isoformou CYP3A v játrech plodu, kde katalyzuje hydroxylaci steroidních hormonů, *N*-demethylaci ethylmorfinu, kodeinu a dextromethorfanu a aktivaci aflatoxinu B1 [40].

V potkanech se vyskytují isoformy CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18, CYP3A23 a CYP3A62 [35]. Expres těchto potkaních isoform je sexuálně dimorfní. CYP3A2 a CYP3A18 jsou výhradně samčí isoformy, zatímco CYP3A9 je exprimována pouze u samic. CYP3A1 a CYP3A2 jsou exprimovány v játrech a CYP3A62 je dominantní formou střevního traktu. CYP3A9 a CYP3A18 jsou exprimovány v játrech a tenkém střevě [35].

1.3.7 Inhibice enzymové aktivity cytochromů P450

Cytochromy P450 jsou enzymy obsahující hem, které katalyzují převážně oxidační biotransformaci strukturně různorodých xenobiotik včetně léčiv [42]. Podávání více léčiv, které jsou metabolisovány CYP, může představovat riziko klinických lékových interakcí, zvláště pokud jeden lék inhibuje nebo indukují CYP, který je odpovědný za metabolismus druhého léku. Inhibice CYP se podílí na většině hlášených lékových interakcí [42]. Mechanismus inhibice CYP se dělí do tří skupin: (I) reversibilní inhibice, (II) kvazi-ireversibilní inhibice a (III) ireversibilní inhibice [43].

1.3.7.1 Reversibilní inhibice

Při reversibilní inhibici dochází k rychlé asociaci a disociaci enzymu a léčiva [42]. Inhibitor se na enzym váže nekovalentní vazbou a tvorba komplexu enzym-inhibitor (EI) nebo enzym-inhibitor-substrát (EIS) není trvalá [42]. Reversibilní inhibice rozdělujeme do 4 skupin, kompetitivní, nekompetitivní, akomeptitivní a smíšená [44].

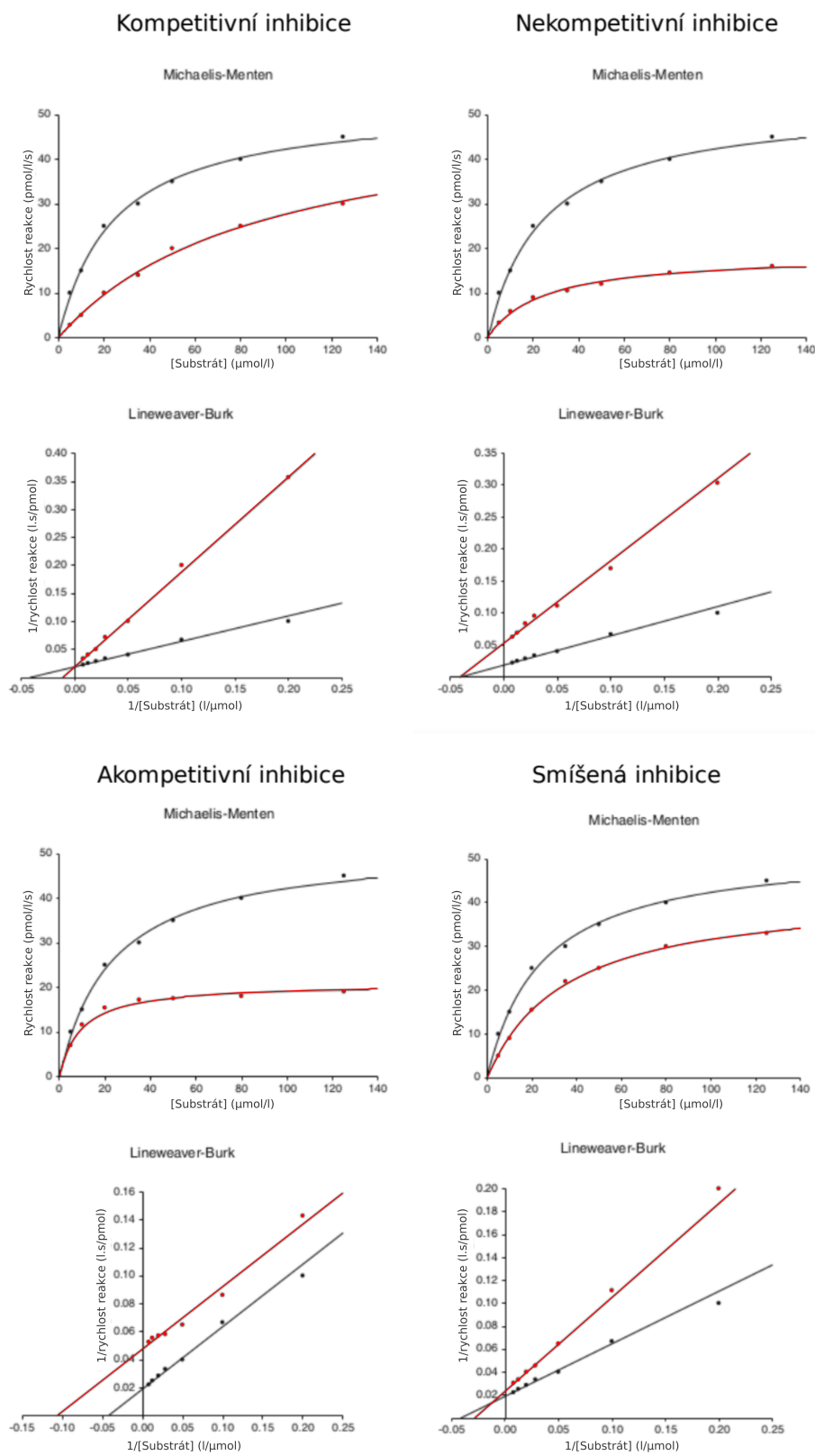
Při kompetitivní inhibici soutěží inhibitor se substrátem o aktivní místo na enzymu [39]. Dochází ke zvýšení Michaelisovy konstanty K_M a maximální reakční rychlost V_{max} se nemění [42].

Při akomeptitivní inhibici se inhibitor reversibilně váže pouze na komplex enzym-substrát (ES) a vznikající komplex EIS se nemůže přeměnit na produkt [45]. Rozsah akomeptitivní inhibice je závislý na koncentraci komplexu ES a je charakterizován snížením K_M i V_{max} [42].

Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na enzym tak, že nebrání substrátu se na enzym navázat [42]. Vazba inhibitoru na enzym však způsobí konformační změnu, která nedovolí přeměnu navázaného substrátu na produkt. Dochází k poklesu V_{max} a K_M se nemění [42].

Smíšená inhibice je speciálním typem inhibice nekompetitivní, zde vazba substrátu ovlivňuje vazbu inhibitoru a naopak [45]. Dochází ke zvýšení K_M a snížení V_{max} .

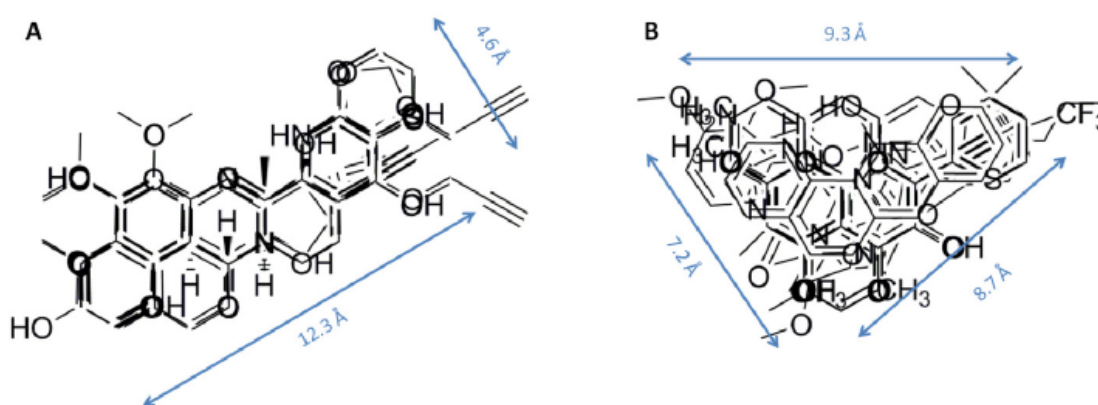
Grafické znázornění všech typů reversibilní inhibice je na obrázku 1.5 na straně 25.



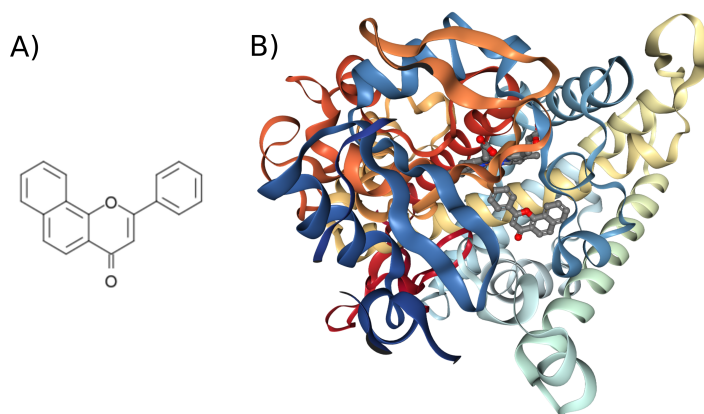
Obrázek 1.5. Reprezentace kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené inhibice. Vynesení dle Lineweavera-Burka a Michaelise-Mentenové. Červené body a křivky představují průběh reakce po přidání inhibitoru (převzato a upraveno z [42]).

Mezi silné reversibilní inhibitory CYP patří léčiva obsahující dusík, imidazol, pyridin a chinoliny [43]. Tyto látky se neváží pouze na prosthetický hem, ale také na lipofilní úseky proteinu. Inhibitory, které se simultánně váží na obě místa jsou ve své podstatě nejsilnějšími inhibitory. Účinnost inhibitoru je určena jeho lipofilitou a pevností vazby mezi volným elektronovým párem dusíku a prosthetickým hemem [43].

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 mají velmi podobnou strukturu a jejich inhibitory se velmi často překrývají [46]. Jako selektivní inhibitory CYP1A1 bylo stanoveno 27 sloučenin [46]. Jako reversibilní inhibitory CYP1A1 působí například berberin (nekompetitivní), palmatin (smíšená) a jatrorhizin (smíšená) [47], 17α -ethinylestradiol (kompetitivní) [48], resveratrol (smíšená) [49], 7-hydroxyflavon (kompetitivní) [50] a kanabidiol (kompetitivní) [51]. Mezi selektivní inhibitory CYP1A2 se řadí 23 sloučenin, například furafylin (nekompetitivní) [52], fluvoxamin (kompetitivní) [53], tanshinon IIA (kompetitivní), α -naftoflavon (kompetitivní) [54], kanabiol (kompetitivní) [51]. Ze struktur selektivních inhibitorů CYP1A1 a CYP1A2 proložených přes sebe (obrázek 1.6) je patrná strukturní charakteristika inhibitorů CYP1A i rozdíl v jejich dutinách aktivního místa [46]. Struktura CYP1A2 s α -naftoflavonem je znázorněna na obrázku 1.7 na straně 27.

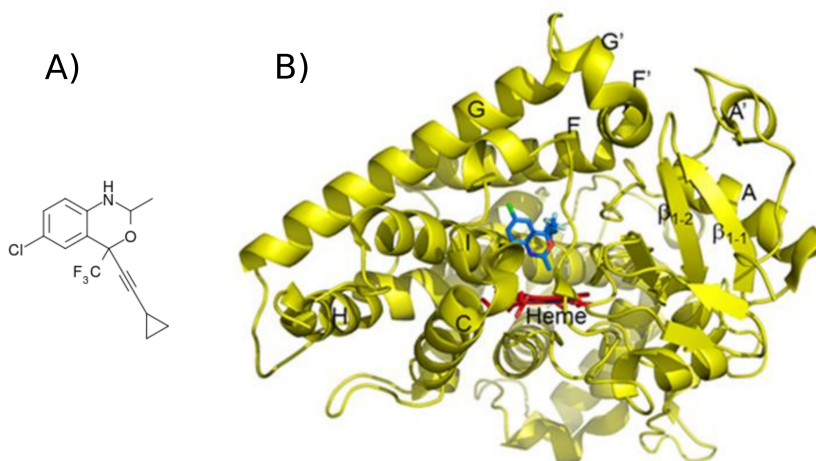


Obrázek 1.6. Struktury selektivních inhibitorů CYP1A1 (A) a CYP1A2 (B) proložené přes sebe (převzato a upraveno z [46]).



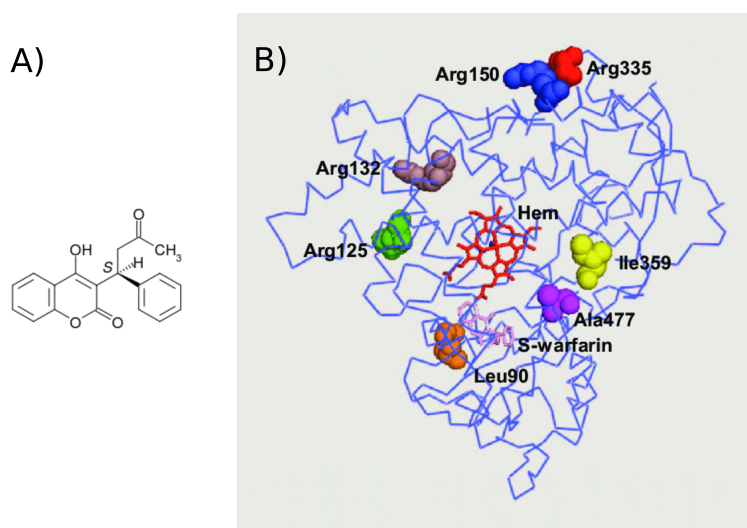
Obrázek 1.7. Inhibitor CYP1A2 α -naftoflavon. A) Strukturální vzorec α -naftoflavonu (vytvořeno v programu BKchem). B) Krystalová struktura CYP1A2 v komplexu s α -naftoflavonem (převzato z [55] a upraveno v programu NGL Viewer).

Mezi selektivní reversibilní inhibitory CYP2B6 se řadí tiklopidin (smíšená), triethylthiofosforamid (thioTEPA) (kompetitivní) [56]. Jako velmi silné kompetitivní inhibitory CYP2B6 byly stanoveny 4-(4-chlorobenzyl)pyridin, 4-(4-nitrobenzyl)pyridin a 4-benzylpyridin [57] a antivirotika nelfinavir (kompetitivní), ritonavir (kompetitivní) a efavirenz (kompetitivní) [58]. Struktura CYP2B6 s 2-desoxo-2-methylem (analogem antivirotika efavirenz) je znázorněna na obrázku 1.8.



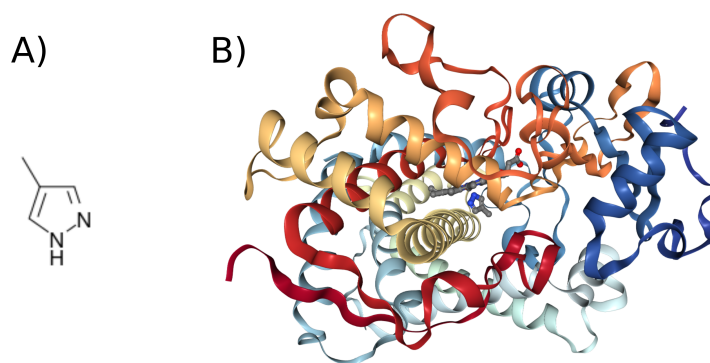
Obrázek 1.8. Inhibitor CYP2B6 2-desoxo-2-methyl-efavirenz (analog antivirotika efavirenz). A) Strukturální vzorec 2-desoxo-2-methyl-efavirenz (vytvořeno v programu BKchem). B) Krystalová struktura CYP2B6 v komplexu s 2-desoxo-2-methyl-efavirenz – v krystalové struktuře je znázorněn modrou barvou (převzato a upraveno z [59]).

Hlavní lidská isoforma cytochromů P450 podrodiny 2C, CYP2C9, je inhibována různými sloučeninami [60]. Mezi reversibilní inhibitory CYP2C9 patří velmi mnoho sloučenin jako například amiodaron a jeho analoga (nekompetitivní), antagonisté receptoru angiotensinu II - olmesartan (kompetitivní), látky proti HIV - delavirdin a jeho analoga (nekompetitivní), benzbromaron a jeho analoga (kompetitivní), cimetidin (kompetitivní), ethanol (kompetitivní), mastné kyseliny - kyselina palmitová, stearová, linolová, linolenová, arachidonová (kompetitivní), fibráty - bezafibrát, ciprofibrát, gemfibrozil (kompetitivní), sulfonamidy - sulfafenazol, sulfapyridin (kompetitivní), analoga warfarinu (kompetitivní) [60]. Struktura CYP2C9 v komplexu s *S*-warfarinem je znázorněna na obrázku 1.9.



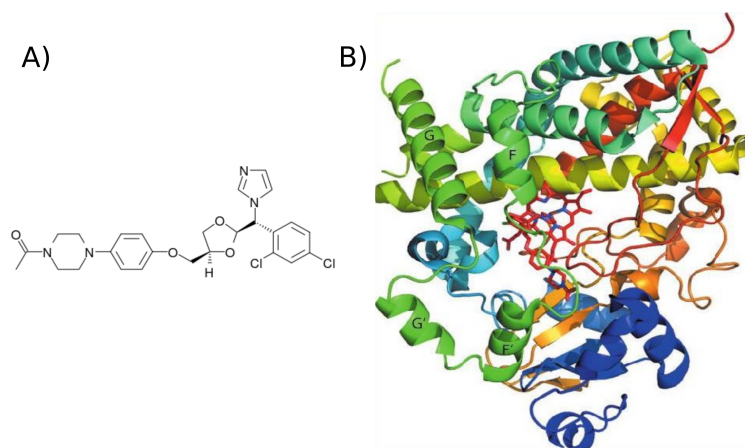
Obrázek 1.9. Inhibitor CYP2C9 *S*-warfarin. A) Strukturální vzorec *S*-warfarinu (vytvořeno v programu BKchem). B) Krystalová struktura CYP2C9 v komplexu s *S*-warfarinem – struktura znázorněna růžovou barvou (převzato a upraveno z [61]).

Mezi reversibilní inhibitory cytochromu P450 2E1 patří například klomethiazol (nekompetitivní) [62], 4-methylpyrazol (smíšená) [63], friedelin (kompetitivní) [64]. Struktura CYP2E1 v komplexu s 4-methylpyrazolem je znázorněna na obrázku 1.10 na straně 29.



Obrázek 1.10. Inhibitor CYP2E1 4-methylpyrazol. A) Strukturní vzorec 4-methylpyrazol (vytvořeno v programu BKchem). B) Krystalová struktura CYP2E1 v komplexu s 4-methylpyrazolem (převzato z [65] a upraveno v programu NGL Viewer).

Inhibitory CYP3A4 jsou strukturně různorodé látky [66]. Skupiny látek působící jako inhibitory CYP3A4 jsou látky proti HIV, např. nelfinavir (kompetitivní) [67], ritonavir (smíšená) [68], antidepresiva, např. fluvoxamin (kompetitivní) [69], steroidy a jejich modulátory, např. ketokonazol (kompetitivní) [70] a několik bylinných a potravinových složek, např. bergamotin (kompetitivní) [71]. Struktura CYP3A4 v komplexu s ketokonazolem je znázorněna na obrázku 1.11.



Obrázek 1.11. Inhibitor CYP3A4 ketokonazol. A) Strukturní vzorec ketokonazolu (vytvořeno v programu BKchem). B) Krystalová struktura CYP3A4 v komplexu s ketokonazolem (převzato z [72]).

1.3.7.2 Kvazi-ireversibilní inhibice

Mnoho léčiv, včetně methylenedioxybenzenů, alkylaminů, makrolidových antibiotik a hydrazinů, podléhá metabolické aktivaci CYP, čímž vznikají metabolity, které mohou inhibovat CYP [43].

Tyto metabolity mohou tvořit stabilní katalyticky neaktivní komplexy s prostetickým hemem CYP, takový komplex se nazývá komplex metabolického meziprojektu MIC (z angl. metabolite intermediate complex) [42]. Tyto neaktivní MIC komplexy mohou být znovu aktivovány, proto se tato inhibice nazývá „kvazi-ireversibilní“ [42].

Tvorba komplexu MIC může být *in vitro* zvrácena a katalytická funkce CYP může být navracena inkubací s vysoce lipofilními sloučeninami, které nahrazují MIC v aktivním místě [43]. Jiné metody, kterými může být MIC narušen, zahrnují ozařování při 400-500 nm nebo oxidaci MIC na železitý stav. Disociace nebo odstranění komplexu MIC z aktivního místa vede k reaktivaci funkční aktivity CYP. *In vivo* je situace náročnější. Komplex MIC je velmi stabilní a CYP v komplexu není dostupný léčivům, jeho aktivita může být obnovena pouze syntézou nových enzymů. Povaha tvorby komplexu je tedy kvazi-ireversibilní [43].

1.3.7.3 Ireversibilní inhibice

Léčiva obsahující různé funkční skupiny mohou být CYP oxidovány na reaktivní meziprojektu [43]. Tyto meziprojektu způsobují nevratnou inaktivaci enzymu před uvolněním meziprojektu z aktivního místa. Tato léčiva inhibující aktivitu CYP označujeme jako sebevražedné substráty [43].

Inaktivace může být způsobena nevratnou změnou hemu, proteinu nebo obojího [73]. Změna hemu vede ke stálé inaktivaci CYP, zatímco změna proteinu je stálá, pouze pokud jsou modifikovány esenciální aminokyseliny, které jsou důležité pro vazbu substrátu, přenos elektronu nebo aktivaci kyslíku [73].

Léčiva, která obsahují dvojné (olefiny) a trojné vazby (acetyleny) mohou být CYP oxidovány na reaktivní meziprojektu, které reagují s dusíky porfyrinového kruhu, čímž alkylují nebo arylují prostetickou skupinu hemu a inaktivují enzym [74]. Studie 17 α -ethinyloestradiolu ukazují, že ačkoliv je EE2 substrátem CYP3A4, chová se také jako ireversibilní inhibitor (sebevražedný substrát) CYP3A4 [75].

Kovalentní vazba na apoenzym je způsobena vazbou reaktivních metabolitů na nukleofilní aminokyselinové zbytky v aktivním místě enzymu [43]. Experimentálně můžeme určit zcela inaktivovaný enzym podle afinity k CO. Pokud je inaktivovaný apoenzym, schopnost vázat CO není ovlivněna, což naznačuje, že hem není modifikován. Zatímco v případě inaktivace hemu, schopnost vázat hem je snížena [43].

1.4 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450

Ethinylestradiol je ženský exogenní pohlavní hormon vyskytující se v moderních přípravcích hormonální antikoncepce [76]. Látky obsažené v hormonální antikoncepci mohou ovlivnit metabolismus mnoha klinicky významných látek řízený cytochromy P450 a tím ovlivnit jejich plasmatické koncentrace a působení [77].

EE2 obsahuje ve své struktuře ethinylovou skupinu, která, jak se ukázalo, způsobuje inaktivaci CYP [78]. Studie mechanismu působení EE2 naznačují, že oxidace ethinylové skupiny EE2 cytochromy P450 vede ke tvorbě nestabilního reaktivního ethinyloxidu. Ten se váže na CYP a způsobuje jeho inaktivaci, což zahrnuje destrukci hemu nebo modifikaci apoproteinu [79]. 17α -ethinylestradiol působí také jako reversibilní inhibitor CYP [20, 48, 82].

Vzhledem k rostoucímu používání 17α -ethinylestradiolu v medicíně a hospodářství se zvyšuje jeho výskyt v životním prostředí [5]. 17α -ethinylestradiol ovlivňuje díky znečištěným zdrojům vody nejen volně žijící živočichy, ale i lidské zdraví. Dlouhodobá expozice EE2 vede ke zdravotním problémům jako je snížení plodnosti a vznik nádorových onemocnění [5]. Proto je důležité studovat výskyt, chování a účinky 17α -ethinylestradiolu na exponované organismy v životním prostředí. Toxický potenciál 17α -ethinylestradiolu byl rozsáhle studován a experimenty dokazují, že je EE2 toxický pro velké množství organismů [1].

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)

V organismu pstruha duhového byl studován vliv EE2 *in vitro*. Studie ukázaly, že EE2 je silným inhibítozem aktivity CYP1A1, aktivita byla snížena o 90 % a hodnota IC₅₀ byla 4,61 μM [80]. *In vivo* byl sledován vliv EE2 a léčiva na mykotické infekce ketokonazolu (KCZ). KCZ je inhibítozem CYP3A, což je isoforma zodpovědná za metabolismus EE2. Studován byl vliv samotného EE2 a KCZ nebo jejich kombinace na aktivitu CYP1A a CYP3A. Výsledky ukázaly, že samotný EE2 *in vivo* aktivitu CYP1A neovlivňuje, zatímco v kombinaci s ketokonazolem byla aktivita CYP1A 5× zvýšena. V případě CYP3A taktěž samotný EE2 aktivitu neovlivnil, ale v kombinaci s ketokonazolem (KCZ) byla aktivita snížena [81].

Treska obecná (*Gadus morhua*)

V organismu tresky obecné byl sledován *in vivo* vliv EE2 na aktivitu CYP1A a CYP3A [82]. V obou případech došlo ke snížení aktivity vlivem EE2, aktivita CYP1A byla snížena o 72 % a CYP3A o 46 %. Studie *in vitro* prokázala, že EE2 snižuje aktivitu CYP1A (IC₅₀ 20 μM) i CYP3A (IC₅₀ 40 μM). EE2 byl označen jako nekompetitivní inhibítozem CYP1A a akompetitivní inhibítozem CYP3A.

Platýs bradavičnatý (*Platichthys flesus*)

V organismu platýse bradavičnatého byl prokázán inhibiční vliv EE2 na aktivitu CYP1A1 *in vivo*. Platýsové byly po dobu 10 dnů vystaveny EE2 o koncentraci 20 ng/l a 66 ng/l. V případě EE2 o koncentraci 20 ng/l byla aktivita snížena o 50 % a při podání EE2 o koncentraci 66 ng/l byla aktivita CYP1A1 zcela inhibována [83].

Losos obecný (*Salmo salar*)

V organismu lososa obecného byl studován *in vitro* vliv EE2 na aktivitu aromatasy CYP19A. Aromatasa CYP19A je převážně exprimovaná ve vaječnicích a hraje významnou roli v sexuální diferenciaci a tvorbě vajíček. Z výsledků vyplývá, že aktivita CYP19A byla po 3 dnech expozice EE2 (50 ng/l) 2,4× zvýšena, ale po 7 denní expozici EE2 (50 ng/l) se 0,6× snížila [84].

Dánio pruhoané (*Danio rerio*)

17α-ethinylestradiol způsobuje feminizaci samců ryb. Parametrem hodnotícím stupeň feminizace živozodek je aktivita mozkové aromatasy CYP19B. CYP19B byla

vlivem EE2 (25 ng/l) *in vivo* snížena, ale ne ve značné míře [85]. CYP19B je exprimován v mozku a oční sítnici a ovlivňuje centrální nervový systém a sexuální chování [84].

Pakaprovec Hubbsův (*Moxostoma hubbsi*)

V organismu pakaprovice byl sledován *in vivo* vliv EE2 na aktivitu CYP1A a CYP19B [86]. V případě aktivity CYP1A nebyl zaznamenán žádný vliv EE2 (10 ng/l), zatímco aktivita CYP19B byla vlivem EE2 (10 ng/l) zvýšena o 80 %.

Drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*)

V organismu drápatky tropické, byl sledován *in vivo* vliv EE2 na aktivitu aromatasu CYP19 v mozku, gonádách a ledvinách [87]. Aktivita mozkové CYP19 nebyla EE2 (100 nM) příliš ovlivněna, zato aktivita CYP19 v ledvinách a gonádách byla vlivem EE2 značně snížena.

Makak jávský (*Macaca fascicularis*)

V případě makaka jávského byl sledován *in vitro* vliv EE2 na aktivitu CYP3A4/5 [88]. I zde byl prokázán inhibiční účinek EE2. Hodnota IC_{50} byla bez preinkubace $31\mu\text{M}$ a po 30-minutové preinkubaci $4,5\mu\text{M}$.

Myš (*Mus musculus*)

V organismu myši byl sledován *in vivo* vliv EE2 na aktivitu CYP2D6 [89]. Ukázalo se, že EE2 ($5\mu\text{g/kg}$) aktivitu CYP2D6 o 20 % snižuje.

Potkan (*Rattus norvegicus*)

Ve studii *in vivo* byla aktivita potkaních CYP1A1 vlivem EE2 (20 mg/kg) mírně zvýšena [4], zatímco *in vitro* byla aktivita CYP1A1 vlivem EE2 ($10\mu\text{M}$) velmi výrazně snížena (o 80 %) [90].

Aktivita potkaního CYP2B1 (homolog lidského CYP2B6) byla účinkem EE2 ($50\mu\text{M}$) *in vitro* silně inhibována a EE2 byl označen jako ireversibilní inhibitor CYP2B1, zatímco aktivita CYP2B2 byla EE2 ($80\mu\text{M}$) snížena pouze o 8 % [91].

In vivo je inhibován také potkaní CYP2C11 a CYP3A [20, 92]. V případě CYP3A byly sledovány dvě markerové reakce CYP3A [20]. Pro stanovení aktivity CYP3A byly použity 2 markerové reakce – 6β -hydroxylace progesteronu a 6β -hydroxylace testosteronu. V případě 6β -hydroxylace progesteronu byl EE2 ($50\mu\text{M}$) označen jako

reversibilní inhibitor CYP3A. 6 β -hydroxylace testosteronu byla vlivem EE2 (50 μ M) také snížena, avšak EE2 byl označen jako sebevražený substrát. Zatímco aktivita CYP2C11 je vlivem EE2 (20 mg/ml) snížena a EE2 byl označen jako ireversibilní inhibitor CYP2C11 [92], aktivita CYP2C6 je vlivem EE2 (20 mg/kg) *in vivo* zvýšena [93].

Člověk (*Homo sapiens sapiens*)

Také v lidském organismu byl 17 α -ethinylestradiol vyhodnocen jako *in vitro* inhibitor 11 isoforem cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP3A4 a CYP3A5) [48].

In vivo byl sledován vliv hormonální antikoncepce (HA) obsahující EE2 a gestoden. Po podání těchto léčiv byla aktivita CYP3A4 snížena o 36 % [76]. Dále byl sledován *in vivo* vliv přípravků obsahující EE2 a levonogestrel. I v tomto případě byl potvrzen inhibiční vliv na aktivitu CYP3A4 [94], pozdější experimenty *in vitro* ukázaly, že se EE2 chová jako ireversibilní inhibitor CYP3A4 [95].

Přípravky hormonální antikoncepce obsahující estrogenovou složku (EE2) mají inhibiční vliv na aktivitu CYP2C19 a CYP2D6 (snížení aktivity o 29 %) *in vivo* [96]. Zatímco aktivita CYP2C9 *in vivo* ovlivněna není [97], *in vitro* je vlivem EE2 (100 μ M) snížena o 67 % [98].

U žen užívajících HA s estrogenovou složkou (EE2) bylo *in vivo* prokázáno zvýšení aktivity CYP2A6 o 29 % [99], zatímco *in vitro* byla aktivita rCYP2A6 vlivem EE2 (100 μ M) snížena o 31 % [100].

Další studií, která se věnovala *in vivo* vlivu HA s estrogení složkou (EE2) na aktivitu CYP2B6, bylo prokázáno, že se vlivem EE2 aktivita CYP2B6 snížila o 47 % [101], zatímco *in vitro* byla aktivita rCYP2B6 vlivem EE2 (100 μ M) snížena o 67 % [100].

V případě CYP1A1 a CYP1A2, byly identifikovány metabolity EE2 inhibující aktivitu obou cytochromů [48]. Jedná se o EE2-3-*O*-sulfát, EE2-3-*O*-glukuronid, 2-hydroxy-EE2 a 3-methoxy-EE2. 2-hydroxy-EE2 a 2-methoxy-EE2 snížili aktivitu rCYP1A1 a rCYP1A2 stejně jako parentální molekula EE2. EE2-3-*O*-sulfát a EE2-3-*O*-glukuronid snížili aktivitu rCYP1A1 a rCYP1A2 o 30 % více než parentální molekula EE2. Což znamená, že méně estrogeně aktivní metabolity vzniklé přeměnou EE2, mohou neblahým způsobem působit na aktivitu CYP [48].

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium vlivu exogenního endokrinního disruptoru 17 α -ethinylestradiolu na specifické aktivity potkaních a lidských isoformů cytochromů P450 *in vitro*.

Hlavní cíle diplomové práce:

- Izolace vybraných mikrosomálních frakcí z jater kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných specifickým induktorem cytochromu P450 3A.
- Stanovení specifické aktivity isoformů CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2E1 a CYP3A1/2 v jaterních mikrosomech z kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných specifickými induktory jednotlivých isoformů cytochromů P450, a to bez a za přítomnosti 17 α -ethinylestradiolu.
- Stanovení specifické aktivity lidských isoformů CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4 v lidských mikrosomech bez a za přítomnosti 17 α -ethinylestradiolu.
- Určení koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici (IC₅₀) rCYP1A2 v potkaních SupersomechTM.
- Určení koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici (IC₅₀) rCYP1A1, rCYP1A2 a rCYP3A4 v lidských SupersomechTM.
- Určení typu inhibice a K_i pro potkaní a lidský rCYP1A1 v SupersomechTM.

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, ve které byla stanovena koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici (IC₅₀) potkaních rCYP1A1 a rCYP3A1 exprimovaných v SupersomechTM.

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité v předkládané diplomové práci pochází z následujících zdrojů:

Biomol GmbH, Německo:

NADPH

Cayman Chemicals, USA:

6 β -testosteron

Fluka, Švýcarsko:

testosteron, tokoferol (vit. E)

Gentest BD Bioscience, USA:

potkaní rekombinantní CYP1A2 v SupersomechTM, lidské rekombinantní CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A1 v SupersomechTM, lidské jaterní mikrosomy (mužské) od různých dárců („slité“) (HLM male „pooled“)

Lach:NER, ČR:

difosforečnan tetrasodný, dihydrogenfosforečnan sodný, dichlormethan, dimethylsulfoxid (DMSO), ethylacetát, hexahydrát chloridu hořečnatého, hydrogenfosforečnan draselný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, 7-methoxyresorufin, 7-penthoxyresorufin, sacharosa, trihydrát octanu sodného

Lachema, ČR:

uhličitan sodný

Linde, ČR:

kapalný dusík

P-LAB, ČR:

fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF)

Penta, ČR:

hydroxid draselný, kyselina o-fosforečná

Serva, Německo:

dithiotreitol (DTT)

Sevapharma, ČR:

bovinní sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA:

bupropion hydrochlorid, diklofenak, 17 α -ethinylestradiol, 7-ethoxyresorufin, fenacetin, *N*-fenylanthranilová kyselina, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, (2S,3S)-hydroxybupropion hydrochlorid, 4'-hydroxydiklofenak, 16 α -hydroxytestosteron, NADP⁺, resorufin, triprolidin hydrochlorid, Tris-base

Státní Zdravotní Úřad v Praze, RNDr. Radka Václavíková, Ph.D.:

6-hydroxychlorzoxazon, chlorzoxazon

ThermoFisher Scientific, USA:

Microplate BCA Protein Assay Kit

VWR Chemicals, Francie:

methanol (HPLC), acetonitril (HPLC)

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

Precisa 40SM-200A, Pesa (Švýcarsko)

Discovery, Ohaus (USA)

Automatické pipety:

Automatické pipety, Eppendorf (Německo)

Automatické pipety Nichiryo, Nichipet ex (Japonsko)

Centrifugy:

Centrifuga 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo)

Minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor, Labnet (USA)

Centrifuga Allegra X-30, úhlový rotor F0630, Beckman Coulter (USA)

Centrifuga Z 383 K, výkyvný rotor, Hermle Labortechnik (Německo)

Ultracentrifuga Optima XPN-90, úhlový rotor 45Ti, Beckman Coulter (USA)

Filtrační zařízení na mobilní fáze:

Millipore StericupTM filtration system, Sigma-Aldrich (USA)

HPLC systém:

HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies (USA)

Pumpa: Agilent 1200 Series Quaternary Pump

Autosampler: Automated Sample Injector ALS G1329A

Detektor: Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)

Odplyňovač: Vakuový odplyňovač G1322

Termobox pro kolonu: LCO 101, ECOM (ČR)

Předkolona: Nucleosil 8×4 mm, 100–5, C₁₈, Macherey-Nagel (Německo)

Kolona: Nucleosil 250×4 mm, 100–5, C₁₈, Macherey-Nagel (Německo)

Kolona: Nucleosil 250×4 mm, 100–5, C₁₈ HD, Macherey-Nagel (Německo)

Program: ChemStation Online 1

Inkubátor:

Thermomixer Compact, Eppendorf (Německo)

Magnetická míchačka:

C-MAG MS 4, IKA (Německo)

Variomag, Monotherm (Německo)

Předvážky:

EW 600-2M, Kern (Německo)

pH-metr:

pH metr ATI Orion 211 s kombinovanou elektrodou, ATI Orion (USA)

pH metr HI2211-02, Hanna Instrument (USA)

Spektrofotometr:

Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader, TECAN (Švýcarsko)

Vakuová odparka:

CentriVap Benchtop vacuum concentrator, Labconco (USA)

Vortex:

MS1 Minishaker, IKA (Německo)

Vortex Mixer VX-200, Labnet (USA)

GV Lab, Gilson (USA)

3.3 Použité metody

3.3.1 Izolace mikrosomů

Mikrosomální frakce byla izolována z potkaních jater postupem popsaným v práci Lindström-Seppa [102]. Celý postup práce byl prováděn v chlazené místnosti při teplotě 5°C a všechny materiály i roztoky byly předem vychlazeny.

Použité roztoky:

- **Pufř 1 (P1)** – 153 mM KCl, 10 mM EDTANa₂, 0,5 mM PMSF, 50 μM vit. E; pH 7,5
- **Pufř 2 (P2)** – 0,1 M Na₄P₂O₇·10H₂O, 0,1 M KCl, 1mM EDTANa₂; pH 7,5
- **Pufř 3 (P3)** – 0,25 M sacharosa, 1 mM EDTANa₂, 1 mM PMSF, 1mM dithiotreitol, 250 μM vit. E; pH 7,5

Jaterní mikrosomy používané v této diplomové práci byly izolovány z potkanů premedikovaných specifickými induktory cytochromů P540 [25].

- **β-naftoflavon (β-NF)** – indukce CYP1A
- **fenobarbital (PB)** – indukce CYP2B
- **pregnenolon-16α-karbonitril (PCN)** – indukce CYP3A
- **ethanol (EtOH)** – indukce CYP2E1

V této diplomové práci byla izolována mikrosomální frakce z potkanů premedikovaných pregnenolon-16α-karbonitrem (PCN). Zároveň byla izolována mikrosomální frakce z kontrolních potkanů, kteří nebyli premedikováni žádnou látkou indukující cytochromy P450. V této frakci je přirozeně nejvíce zastoupená podrodina CYP2C.

Zmražená potkaní játra byla nejemno nastříhána do předem zchlazeného ledového roztoku pufřu P1. Z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Nastříhaná tkáň byla několikrát roztokem pufřu P1 promyta. Odkrvená tkáň byla po malých dávkách homogenizována nejprve ve volnějším a poté v těsnějším

homogenizátoru na motorový pohon. Objem roztoku pufru P1 určený pro homogenizaci činil čtyřnásobek hmotnosti jaterní tkáně. Vzniklý homogenát byl přefiltrován přes 4× složenou gázu a centrifugován při 4°C po dobu 10 minut při 600 g (Hermle Z 383 K, výkyvný rotor 4× 50 ml). Supernatant byl uchován na ledu pro další použití. Sediment byl rehomogenizován v těsnějším homogenizátoru s objemem pufru P1 odpovídající 1/4 původního objemu pufru P1 a zpracován za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly odstředovány po dobu 20 minut při 15000 g (Beckman Allegra X-30R, úhlový rotor F0630). Supernatant byl následně odlit přes sediment lehce sedlé vrstvy mitochondrií bez kontaminace a centrifugován po dobu 65 minut při 55000 g (Beckman Optima XPN-90, úhlový rotor 45Ti). Po této centrifugaci byl získán supernatant, který představoval cytosolární frakci. Cytosolární frakce byla rozpipetována na alikvoty (1 ml), které byly zamrazeny v kapalném dusíku a uchovány v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

Peleta byla resuspendována v objemu pufru P2, který odpovídal přibližně 1/2 původního objemu homogenátu, tedy dvojnásobku hmotnosti tkáně. Homogenní suspenze byla odstředěna po dobu 65 minut při 55000 g (Beckman Optima XPN-90, úhlový rotor 45Ti). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a peleta představující mikrosomální frakci byla pod roztokem pufru P3 odškrábnuta. Odškrábnutá peleta byla resuspendována v objemu roztoku pufru P3 o objemu odpovídajícím 1/20 homogenátu tkáně, tedy 1/4 hmotnosti tkáně. Izolovaná mikrosomální frakce byla rozpipetována na alikvoty (100 µl), které byly následně zamrazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

3.3.2 Stanovení množství proteinů

Stanovení množství proteinů v mikrosomální frakci bylo provedeno podle návodu komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Tento komerční set obsahoval dvě činidla – **činidlo A** (2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,95 % NaHCO_3 , 0,4 % NaOH , 0,16 % vnan sodno-draselný) a **činidlo B** (4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Při tomto stanovení se využívá bicinchoninová kyselina (BCA, z angl. bicinchonin acid), která při alkalické redukci Cu^{2+} na Cu^+ poskytuje s Cu^+ fialový komplex [103]. Tento fialový komplex je spektrofotometricky stanoven při vlnové délce 562 nm. Při provádění reakce při 37°C je za redukci Cu^{2+} zodpovědná peptidová vazba a aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Získaná hodnota absorbance je tedy přímo úměrná koncentraci proteinů.

Jaterní mikrosomy byly 50× ředěny destilovanou vodou. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo v tripletech pipetováno 9 μl 50× ředěných mikrosomů, destilované vody (blank) a různé koncentrace standardů BSA (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml).

Do každé jamky bylo přidáno 260 μl roztoku činidla. Tento roztok byl připraven smícháním 50 dílů činidla A a 1 dílu činidla B. Vzorky v mikrotitrační destičce byly po dobu 30 minut inkubovány při 37°C. Po inkubaci byly vzorky ponechány 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm na přístroji Tecan Sunrise pomocí programu KIM.

Pomocí kalibrační křivky sestavené z hodnot absorbance standardů BSA byly vypočítány koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních frakcích (Tabulka 3.1).

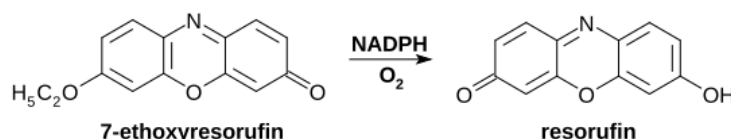
Tabulka 3.1. Koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních frakcích potkanů premedikových specifickými induktory P450 a v kontrolních mikrosomech.

β -NF – β -naftoflavon, PB – fenobarbital, PCN – pregnenolon-16 α -karbonitril, EtOH – ethanol.

Jaterní mikrosomy	Indukovaná isoforma	c_{prot} [mg/ml]
Kontrolní	—	32,3
β -NF	CYP1A1	54,3
PB	CYP2B1	35,9
EtOH	CYP2E1	21,5
PCN	CYP3A1	25,7

3.3.3 Stanovení aktivity CYP1A1 – *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu

Pro stanovení aktivity cytochromu P450 1A1 byla použita markerová reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu [104]. Cytochrom P450 1A1 (částečně také cytochrom P450 1A2 a 1B1) katalyzuje přeměnu 7-ethoxyresorufinu na fluorescenční produkt resorufin (obrázek 3.1).



Obrázek 3.1. *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu – markerová reakce CYP1A1 (vytvořeno v programu BKchem).

Pomocí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1 v potkaních a lidských mikrosomech. Pro toto stanovení byl použit 17 α -ethinylestradiol o koncentracích 10 μM ; 2 μM (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu 7-ethoxyresorufinu) a 0 μM . 0 μM koncentraci představovalo přidání stejného objemu rozpouštědla DMSO místo zásobního roztoku EE2. Objem DMSO však nepřesahoval 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Stanovení aktivity CYP1A1 bylo provedeno ve čtyřech paralelních měřeních. Připraveny byly inkubační směsi o objemu 200 μl a složení:

- 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 2 μM 7-ethoxyresorufin (zásobní roztok 0,4 mM v DMSO)
- 17 α -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztok v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobní roztok v pufru)
- vhodně ředěné jaterní mikrosomy

Izolované jaterní mikrosomy byly ředěny fosfátovým pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence způsobený

vznikem fluorescenčního produktu resorufinu byl lineární. Stanovení vlivu EE2 v potkaních mikrosomech probíhalo na mikrosomech z potkanů premedikovaných β -naftoflavonem a na kontrolních mikrosomech. Koncentrace mikrosomálních proteinů z jater potkanů vystavených β -NF byla v inkubační směsi 0,005 mg/ml a koncentrace mikrosomálních proteinů z jater kontrolních potkanů byla v inkubační směsi 0,5 mg/ml. Vliv EE2 na lidský CYP1A1 byl sledován pouze v „pooled“ mikrosomech, které byly použity o koncentraci 0,25 mg/ml.

Inkubační směs připravená pro čtyři paralelní stanovení obsahovala všechny složky kromě NADPH a byla inkubována na termobloku 10 minut při 37°C a 400 RPM (Thermomixer compact). Inkubační směs byla pipetována po 180 μ l do 4 jamek mikrotitrační destičky. Ve třech jamkách byla reakce zahájena přidáním 20 μ l NADPH, do čtvrté jamky, která sloužila jako blank, bylo přidáno 20 μ l pufru.

Intenzita fluorescence byla měřena 5 minut v intervalech 30 vteřin při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Z výsledných hodnot intenzity fluorescence a kalibrační přímky vyjadřující závislost intenzity fluorescence na látkovém množství resorufinu (0 – 160 pmol), byla vypočtena specifická aktivita CYP1A1 vyjádřená jako látkové množství vznikajícího resorufinu za minutu na mg proteinu. Následně byla porovnána aktivita CYP1A1 po přidání EE2 s aktivitou CYP1A1 po přidání DMSO, která představovala 100% aktivitu CYP1A1. Díky tomuto porovnání byla vypočtena procentuální inhibice CYP1A1 vlivem EE2.

3.3.3.1 Stanovení koncentrace IC₅₀ lidského CYP1A1

Pomocí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1 v lidských SupersomechTM (hmyzí buňky infikované bakulovirem exprimující CYP1A1). Pro toto stanovení byl použit 17 α -ethinylestradiol o koncentracích odpovídajících 100 \times ; 10 \times ; 5 \times ; 2 \times ; 1 \times ; 0,5 \times ; 0,2 \times a 0,1 \times koncentraci substrátu. Paralelně byla měřena aktivita CYP1A1 bez přídavku EE2, kde byl místo roztoku EE2 do inkubační směsi přidáván stejný objem rozpouštědla DMSO.

Složení inkubační směsi:

- 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4
- 2 μ M 7-ethoxyresorufin (zásobní roztok 0,4 mM v DMSO)
- 17 α -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztok v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobní roztok v pufru)
- 1,25 pmol/ml cytochrom P450 1A1 (2 nmol/ml v SupersomechTM)

Postup byl analogický k měření aktivity CYP1A1 v kapitole 3.3.3 na straně 51.

Intenzita fluorescence byla měřena 5 minut v intervalech 30 vteřin při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Z výsledných hodnot intenzity fluorescence a kalibrační přímky vyjadřující závislost intenzity fluorescence na látkovém množství resorufinu (0-160 pmol), byla vypočtena aktivita CYP1A1 vyjádřená jako látkové množství vznikajícího resorufinu za minutu na 1 pmol cytochromu P450 1A1.

Následně byla porovnána aktivita CYP1A1 po přidání EE2 s aktivitou CYP1A1 po přidání DMSO, která představovala 100% aktivitu CYP1A1. Díky tomuto porovnání byla vypočtena procentuální inhibice CYP1A1 vlivem EE2.

Z výsledných hodnot aktivit CYP1A1 byla vytvořena závislost procentuální inhibice CYP1A1 na logaritmu koncentrace EE2. Tato závislost byla proložena křivkou popsanou rovnicí pro výpočet IC₅₀ [105]. Z této křivky byla odečtena hodnota koncentrace 17 α -ethinylestradiolu odpovídající 50% inhibici CYP1A1.

3.3.3.2 Inhibiční studie potkaního CYP1A1

Pro určení typu inhibice cytochromu P450 1A1 bylo použito stanovení aktivity CYP1A1 při různých koncentracích substrátu a různých koncentracích inhibitoru (EE2).

Nejprve byly připraveny inkubační směsi o objemu 200 μ l a složení:

- 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 μ M 7-ethoxyresorufin (zásobní roztoky v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 0; 0,2; 1; 5; 10 μ M 17 α -ethinylestradiol (zásobní roztoky v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobní roztok v pufru)
- 5 pmol/ml cytochrom P450 1A1 (2 nmol/ml v SupersomechTM)

Supersomy byly naředěny fosfátovým pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence způsobený vznikem fluorescenčního produktu resorufinu byl lineární.

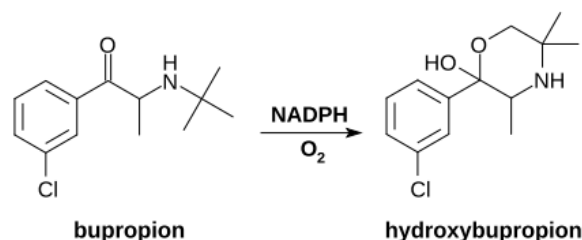
Inkubační směs byla připravena pro šest paralelních stanovení a obsahovala všechny složky kromě NADPH a EE2. Poté byla tato směs pipetována po 175 μ l do mikrotitrační destičky a do každé jamky bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku EE2 ředěného fosfátovým pufrům na koncentraci 40 \times vyšší než je výsledná koncentrace v inkubační směsi. Následně byla mikrotitrační destička 10 minut inkubována při 37°C. Do pěti jamek destičky bylo přidáno 20 μ l NADPH, čímž byla zahájena enzymová reakce a do šesté jamky, která sloužila jako blank bylo pipetováno stejné množství pufru. Takto bylo provedeno měření vždy pro jednu koncentraci substrátu 7-ethoxyresorufinu a pět koncentrací 17 α -ethinylestradiolu.

Intenzita fluorescence byla měřena 3 minuty v intervalech 10 vteřin při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Z výsledných hodnot intenzity fluorescence a kalibrační přímky byla vypočtena rychlost enzymové reakce vyjadřující látkové množství vzniklého resorufinu v litru za sekundu ($\text{mol}_{\text{res}}/\text{l/s}$).

3.3.6 Stanovení aktivity CYP2B6 – hydroxylace bupropionu

Ke stanovení aktivity lidského cytochromu P450 2B6 byla použita markerová reakce hydroxylace bupropionu. Metoda byla upravena dle metody Hesse 2000 [108] (obrázek 3.4).



Obrázek 3.4. Hydroxylace bupropionu – markerová reakce CYP2B6 (vytvořeno v programu BKchem).

Reakční směsi o celkovém objemu 250 μ l byly připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 200 μ M bupropion (zásobní roztok 20 mM v dH_2O)
- 17 α -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztok v DMSO o 100 \times vyšší koncentraci)
- 1 mM NADPH-generující systém – NADPH-GS (zásobní roztok: 10mM NADP^+ , 100 mM D-glukosa-6-fosfát, 10 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- lidské „pooled“ mikrosomy o koncentraci proteinů 0,25 mg/ml

Pro toto stanovení byl použit 17 α -ethinylestradiol o koncentracích 200 μ M (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu bupropionu); 10 μ M; 0 μ M. 0 μ M koncentraci představovalo přidání stejného objemu rozpouštědla DMSO místo zásobního roztoku EE2. Objem DMSO však nepřesahoval 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Připraveny byly reakční směsi obsahující různé koncentrace EE2 a kontrolní reakční směsi. První kontrolní reakční směs neobsahovala NADPH-generující systém

a ve druhé kontrolní reakční směsi byla reakce ihned zastavena 50 μ l 1M HCl a vortexována. Reakční směsi byly preinkubovány 5 minut při 37°C bez přítomnosti NADPH-GS.

Reakce byla po preinkubaci zahájena přidávkem 25 μ l NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 20 minut při 37°C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 1M HCl a vzorky byly 15 sekund vortexovány. Následně bylo do reakční směsi přidáno 10 μ l triprolidinu jako vnitřního standardu (1,25 mM v dH₂O). Po intenzivním třepání (3 minuty, 1400 RPM) byly vzorky centrifugovány při 16000 RPM (Centrifuge 5418) po dobu 10 minut. Supernatanty byly odebrány do vialek a připraveny pro analýzu.

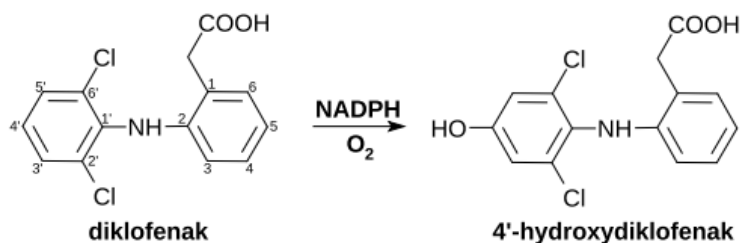
Separace hydroxybupropionu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Metabolit bupropionu hydroxybupropion, který vzniká enzymovou reakcí v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC s isokratickou elucí po dobu 20 minut. Mobilní fáze byla složena z 50mM KH₂PO₄ (pH 2,8, upraveno HCl) a 100% acetonitrilu v poměru 79:21. Separace byla provedena na koloně Nucleosil 250 \times 4 mm, C₁₈, 100–5, HD při laboratorní teplotě s konstantní průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Nástřik na kolonu činil 100 μ l supernatantu. Hydroxybupropion byl detekován při vlnové délce 214 nm a kvantifikován vztažením jeho plochy píku k ploše píku vnitřního standardu (triprolidin).

Vyhodnocení bylo provedeno za použití sedmibodové kalibrační přímky o rozsahu 2 – 100 μ M hydroxybupropionu, plochy píků byly opět vztaženy k ploše píku vnitřního standardu. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství vznikajícího hydroxybupropionu za minutu na mg proteinu, tedy specifická aktivita CYP2B6. Vždy byla porovnána aktivita CYP2B6 po přidání EE2 s aktivitou CYP2B6 po přidání DMSO, tato aktivita představovala 100% aktivitu CYP2B6. Díky ní mohla být vypočítána procentuální inhibice CYP2B6 vlivem 17 α -ethinylestradiolu.

3.3.7 Stanovení aktivity CYP2C6, CYP2C9 – 4'-hydroxylace diklofenaku

Ke stanovení aktivity potkaního cytochromu P450 2C6 a lidského cytochromu P450 2C9 byla použita markerová reakce 4'-hydroxylace diklofenaku [109] (obrázek 3.5).



Obrázek 3.5. 4'-hydroxylace diklofenaku – markerová reakce CYP2C6 a CYP2C9 (vytvořeno v programu BKchem).

Reakční směsi o celkovém objemu 500 μl byly připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4
- 50 μM diklofenak (zásobní roztok 10 mM v dH_2O)
- 17α -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztok v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 1 mM NADPH-generující systém (zásobní roztok: 10mM NADP^+ , 100 mM D-glukosa-6-fosfát, 10 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- potkaní kontrolní mikrosomy nebo lidské „pooled“ mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Pro toto stanovení byl použit 17α -ethinylestradiol o koncentracích 50 μM (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu diklofenaku); 10 μM a 0 μM . 0 μM koncentraci představovalo přidání stejného objemu rozpouštědla DMSO místo zásobního roztoku EE2. Objem DMSO však nepřesahoval 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Připraveny byly reakční směsi obsahující různé koncentrace EE2 a kontrolní reakční směsi. První kontrolní reakční směs neobsahovala NADPH-generující systém a ve druhé kontrolní reakční směsi byla reakce ihned zastavena přidáním 100 μ l ledového 100% acetonitrilu a vortexována. Reakční směsi byly preinkubovány 5 minut při 37°C bez přítomnosti NADPH-GS.

Reakce byla po preinkubaci zahájena přidávkem 50 μ l NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37°C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l ledového 100% acetonitrilu a vzorky byly 15 sekund vortexovány. Následně bylo do reakční směsi přidáno 5 μ l *N*-fenylanthranilové kyseliny (1 mM v methanolu) a 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (3 minuty, 1400 RPM) byly vzorky centrifugovány při 15000 RPM (Centrifuge 5418) po dobu 5 minut. Organická fáze byla odebrána do vialky a odpařena do sucha ve vakuové odparce. Extrakce byla provedena dvakrát. Před separací na HPLC byly odparky rozpuštěny v 40 μ l methanolu.

Separace 4'-hydroxydiklofenaku vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

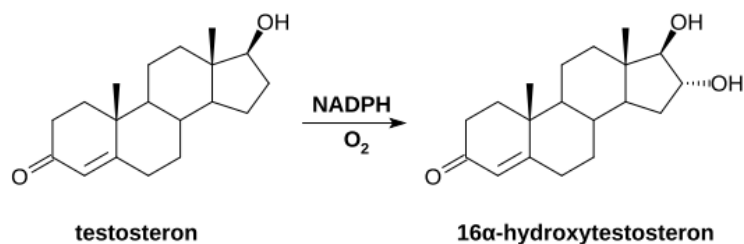
Metabolit diklofenaku 4'-hydroxydiklofenak, který vzniká enzymovou reakcí katalyzovanou CYP2C6/9 v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC s isokratickou elucí po dobu 16 minut. Mobilní fáze byla složena z 75mM CH₃COONa (pH 5, upraveno CH₃COOH) a 100% acetonitrilu v poměru 48:52. Separace byla provedena na koloně Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100–5, při teplotě 35°C s konstantní průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Nástřik na kolonu činil 20 μ l [109]. 4'-hydroxydiklofenak byl detekován při vlnové délce 272 nm a kvantifikován vztažením jeho plochy píku k ploše píku vnitřního standardu (*N*-fenylanthranilová kyselina).

Vyhodnocení bylo provedeno za použití šestibodové kalibrační přímky o rozsahu 10 – 500 μ M 4'-hydroxydiklofenaku, plochy píků byly opět vztaženy k ploše píku vnitřního standardu. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství vznikajícího 4'-hydroxydiklofenaku za minutu na mg proteinu, tedy specifická aktivita CYP2C6 nebo CYP2C9. Vždy byla porovnána aktivita CYP2C6/9 po přidání EE2 s aktivitou CYP2C6/9 po přidání DMSO, tato aktivita představovala 100% aktivitu CYP2C6/9. Díky ní mohla být vypočítána

procentuální inhibice CYP2C6/9 vlivem 17 α -ethinylestradiolu.

3.3.8 Stanovení aktivity CYP2C11 – 16 α -hydroxylace testosteronu

Ke stanovení aktivity potkaního cytochromu P450 2C11 byla použita markerová reakce 16 α -hydroxylace testosteronu [110] (obrázek 3.6).



Obrázek 3.6. 16 α -hydroxylace testosteronu – markerová reakce CYP2C11 (vytvořeno v programu BKchem).

Reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4
- 50 μ M testosteron (zásobní roztok 10 mM v dH₂O)
- 17 α -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztok v DMSO o 200 \times vyšší koncentraci)
- 1 mM NADPH-generující systém (zásobní roztok: 10mM NADP⁺, 100 mM D-glukosa-6-fosfát, 10 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 100 mM MgCl₂·6H₂O)
- potkaní kontrolní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Pomocí 16 α -hydroxylace testosteronu byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2C11. Pro toto stanovení byl použit 17 α -ethinylestradiol o koncentracích 50 μ M (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu testosteronu); 10 μ M a 0 μ M. 0 μ M koncentraci představovalo přidání stejného

objemu rozpouštědla DMSO místo zásobního roztoku EE2. Objem DMSO však nepřesahoval 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Připraveny byly reakční směsi obsahující různé koncentrace EE2 a kontrolní reakční směsi. První kontrolní reakční směs neobsahovala NADPH-generující systém a ve druhé kontrolní reakční směsi byla reakce ihned zastavena 100 μ l 1M Na₂CO₃/2M NaCl a rychlým vortexováním. Reakční směsi byly preinkubovány 5 minut při 37°C bez přítomnosti NADPH-GS.

Reakce byla po preinkubaci zahájena přidávkem 50 μ l NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37°C a 400 RPM za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 1M Na₂CO₃/2M NaCl a vzorky byly 15 sekund vortexovány. Následně bylo do reakční směsi přidáno 5 μ l fenacetinu (1 mM v methanolu) a 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (3 minuty, 1400 RPM) byly vzorky centrifugovány při 15000 RPM (Centrifuge 5418) po dobu 5 minut. Organická fáze byla odebrána do vialky a odpařena do sucha ve vakuové odparce. Extrakce byla provedena dvakrát. Před separací na HPLC byly odparky rozpuštěny v 30 μ l methanolu.

Separace 16 α -hydroxytestosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Metabolit testosteronu 16 α -hydroxytestosteron, který vzniká enzymovou reakcí katalyzovanou CYP2C11 v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC s lineární gradientovou elucí po dobu 35 minut dle tabulky 3.2. Mobilní fáze A byl 50% methanol a mobilní fáze B 75% methanol.

Tabulka 3.2. Gradientová eluce separace 16 α -hydroxylace testosteronu. Lineární (spojitý) gradient: mobilní fáze A – 50% methanol, mobilní fáze B – 75% methanol.

Čas (min)	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
00:00	100 %	0 %
27:00	0 %	100 %
30:00	100 %	0 %
35:00	100 %	0 %

Pomocí 6-hydroxylace chlorzoxazonu byl sledován vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2E1. Pro toto stanovení byl použit 17α -ethinylestradiol o koncentracích 100 μM ; 10 μM a 0 μM . 0 μM koncentraci představovalo přidání stejného objemu rozpouštědla DMSO místo zásobního roztoku EE2. Objem DMSO však nepřesahoval 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Připraveny byly reakční směsi obsahující různé koncentrace EE2 a kontrolní reakční směsi. První kontrolní reakční směs neobsahovala NADPH-generující systém a ve druhé kontrolní reakční směsi byla reakce ihned zastavena 25 μl 43% H_3PO_4 a vortexována. Reakční směsi byly preinkubovány 5 minut při 37°C bez přítomnosti NADPH-GS.

Reakce byla po preinkubaci zahájena přidavkem 50 μl NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37°C a 400 RPM za přístupu vzduchu (Thermomixer Compact). Reakce byla zastavena přidáním 25 μl 43% H_3PO_4 a vzorky byly 15 sekund vortexovány. Následně bylo do reakční směsi přidáno 5 μl fenacetinu (1 mM v methanolu) a 1 ml dichlormethanu. Následně byly vzorky 20 vteřin vortexovány a centrifugovány při $3000\times g$ (Centrifuge 5418) po dobu 5 minut. Organická fáze byla odebrána do vialky a odpařena do sucha ve vakuové odparce. Extrakce byla provedena dvakrát. Před separací na HPLC byly odparky rozpuštěny v 30 μl 50% methanolu.

Separace 6-hydroxychlorzoxazonu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Metabolit chlorzoxazonu 6-hydroxychlorzoxazon, který vzniká enzymovou reakcí katalyzovanou CYP2E1 v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC s gradientovou elucí po dobu 33 minut dle tabulky 3.3 na straně 58. Mobilní fázi A byl 50% methanol a mobilní fázi B 100% methanol.

Separace byla provedena na koloně Nucleosil 250×4 mm, C_{18} , 100–5, při teplotě 35°C s konstantní průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Nástřik na kolonu činil 20 μl [113]. 6-hydroxychlorzoxazon byl detekován při vlnové délce 287 nm a kvantifikován vztahem jeho plochy píku k ploše píku vnitřního standardu (fenacetin).

Tabulka 3.3. Gradientová eluce separace 6-hydroxylace chlorzoxazonu.

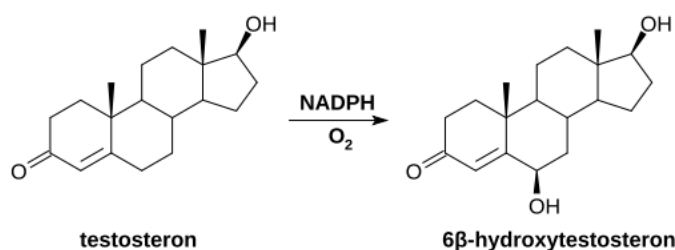
Lineární (spojitý) gradient: mobilní fáze A – 50% methanol, mobilní fáze B – 100% methanol.

Čas (min)	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
00:00	100 %	0 %
14:00	100 %	0 %
14:30	0 %	100 %
20:00	0 %	100 %
20:30	100 %	0 %
33:00	100 %	0 %

Vyhodnocení bylo provedeno analogicky k vyhodnocení v kapitole 3.3.6 za použití šestibodové kalibrační přímky o rozsahu 10 – 500 μM 6-hydroxychlorzoxazonu, plochy píků byly opět vztaženy k ploše píku vnitřního standardu.

3.3.10 Stanovení aktivity CYP3A1/2 a CYP3A4 – 6 β -hydroxylace testosteronu

Ke stanovení aktivity potkaního cytochromu P450 3A1/2 a lidského cytochromu P450 3A4 byla použita markerová reakce 6 β -hydroxylace testosteronu [114] (obrázek 3.8).



Obrázek 3.8. 6 β -hydroxylace testosteronu – markerová reakce CYP3A1 a CYP3A4 (vytvořeno v programu BKchem).

Reakční směsi o celkovém objemu 500 μl byly připraveny v tripletech analogicky k postupu v kapitole 3.3.8.

Rozdíl byl pouze v použitých mikrosomech:

- potkaní mikrosomy (kontrolní a indukované PCN) nebo lidské „pooled“ mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Separace 6 β -hydroxytestosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Metabolit testosteronu 6 β -hydroxytestoteron, který vzniká enzymovou reakcí katalyzovanou CYP3A1 a CYP3A4 v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC popsanou v kapitole 3.3.8.1.

Vyhodnocení bylo provedeno analogicky k vyhodnocení v kapitole 3.3.6 za použití šestibodové kalibrační přímky o rozsahu 10 – 500 μ M 6 β -hydroxytestosteronu, plochy píků byly opět vztahy k ploše píku vnitřního standardu.

3.3.10.1 Stanovení koncentrace IC₅₀ lidského CYP3A4

Pomocí 6 β -hydroxylace testosteronu byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A4 v lidských SupersomechTM. Pro toto stanovení byl použit 17 α -ethinylestradiol o koncentracích odpovídajících 4 \times ; 3 \times ; 2 \times ; 1 \times ; 0,5 \times ; 0,2 \times ; 0,1 \times ; 0,04 \times ; 0,02 \times a 0,01 \times koncentraci substrátu. Paralelně byla měřena aktivita CYP3A4 bez přídavku EE2, kde byl místo roztoku EE2 do inkubační směsi přidáván stejný objem rozpouštědla DMSO.

Reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny v tripletech analogicky k postupu v kapitole 3.3.8.

Rozdíl byl pouze v použitých SupersomechTM:

- 50 pmol/ml cytochrom P450 3A4 (2 nmol/ml v SupersomechTM)

6 β -hydroxytestoteron, který vzniká enzymovou reakcí katalyzovanou CYP3A4 v inkubačních směsích, byl separován a kvantifikován metodou HPLC popsanou v kapitole 3.3.8.1.

Vyhodnocení bylo analogické k stanovení koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici lidského CYP1A1 popsaného v kapitole 3.3.3.1.

4. Výsledky

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem estrogenního endokrinního disruptoru 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních a lidských isoform cytochromů P450.

4.1 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních isoform cytochromů P450 *in vitro*

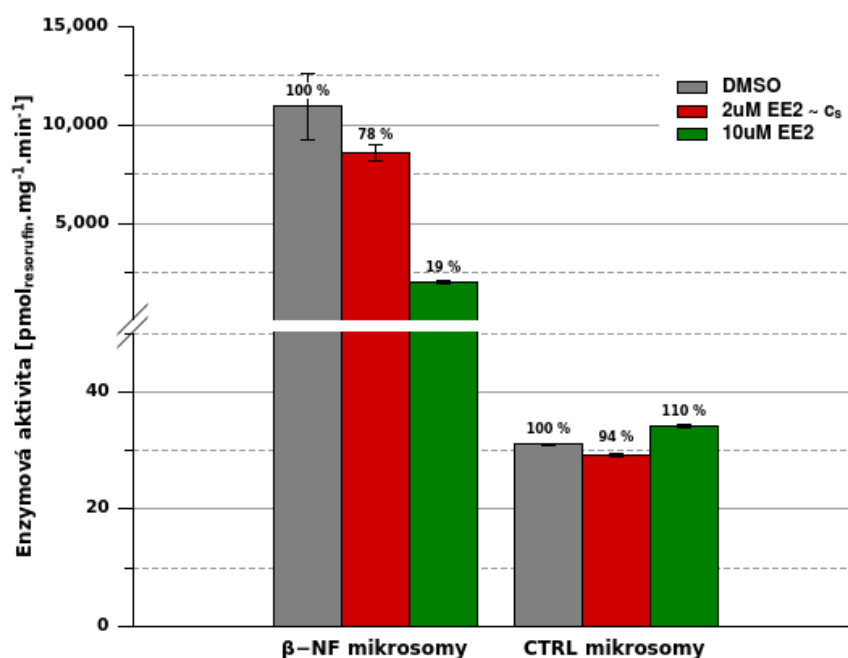
Specifická aktivita cytochromů P450 1A1, 2B1, 2E1 a 3A1 byla stanovena v mikrosomech indukovaných specifickými induktory CYP a v kontrolních mikrosomech. Specifická aktivita cytochromů P450 2C6 a 2C11 byla stanovena pouze v kontrolních mikrosomech, ve kterých jsou tyto isoformy nejvíce zastoupeny.

Účinek 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu vybraných isoform cytochromů P450 *in vitro* byl sledován při koncentracích 10 μ M a koncentraci odpovídající saturační koncentraci substrátu a porovnán s aktivitou studovaných isoform CYP v inkubačních směsích bez přídavku EE2.

4.1.1 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1

Specifická aktivita cytochromu P450 1A1 byla stanovena specifickou markerovou reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu [104].

Z grafu na obrázku 4.1 je patrné, že specifická aktivita CYP1A1 byla po přidání 17α -ethinylestradiolu výrazně snížena v případě zprostředkování reakce jaterními mikrosomy potkanů vystavených β -NF. Při použití $2\mu\text{M}$ EE2, což odpovídá koncentraci substrátu 7-ethoxyresorufinu, byla aktivita CYP1A1 snížena o 22 % a při použití $10\mu\text{M}$ EE2 byla aktivita CYP1A1 snížena o 81 %. V kontrolních mikrosomech, ve kterých CYP1A1 není exprimován, nebyla inhibice CYP1A1 vlivem EE2 pozorována.

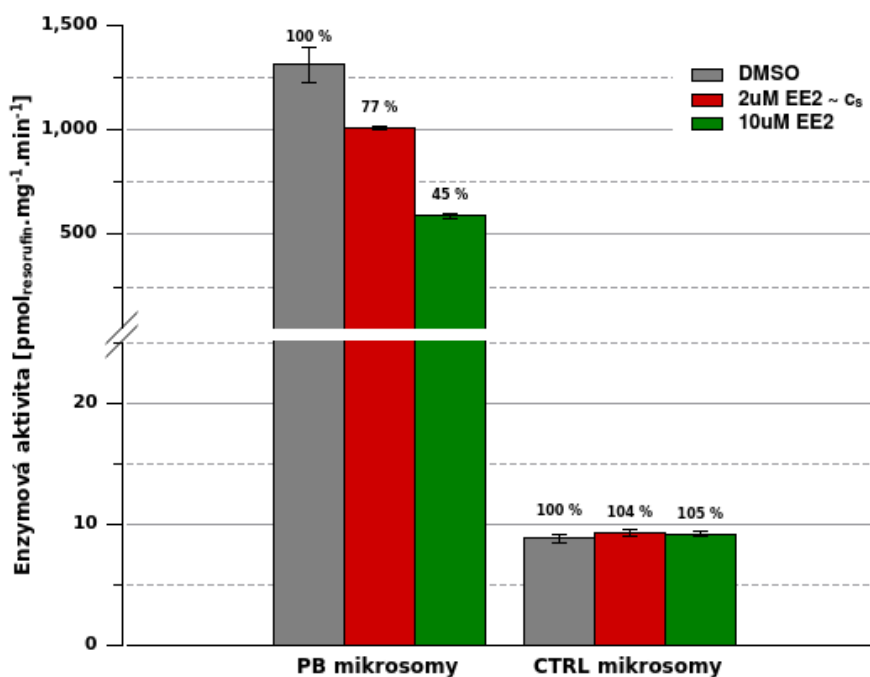


Obrázek 4.1. Vliv 17α -ethinylestradiolu na *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP1A1 z jaterních mikrosomů potkanů po indukci β -naftoflavonem (β -NF) a kontrolních potkanů (CTRL). Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu (c_s) byla $2\mu\text{M}$. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP1A1 po přidání EE2 vztahenou k aktivitě CYP1A1 bez přídavku EE2.

4.1.2 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2B1/2

Vliv 17α -ethinylestradiolu na specifickou aktivitu cytochromu P450 2B1/2 byl stanoven specifickou markerovou reakcí *O*-depentylace 7-pentoxyresorufinu [107].

Aktivita CYP2B1/2 (obrázek 4.2) v jaterních mikrosomech potkanů vystavených PB, byla po přidání 17α -ethinylestradiolu také značně snížena. Při použití $2\mu\text{M}$ EE2 byla aktivita CYP2B1/2 snížena o 23 % a při použití $10\mu\text{M}$ EE2 byla aktivita CYP2B1/2 snížena o 55 %. V kontrolních mikrosomech, ve kterých CYP2B1/2 indukován nebyl, nebyla inhibice CYP2B1/2 vlivem EE2 pozorována.



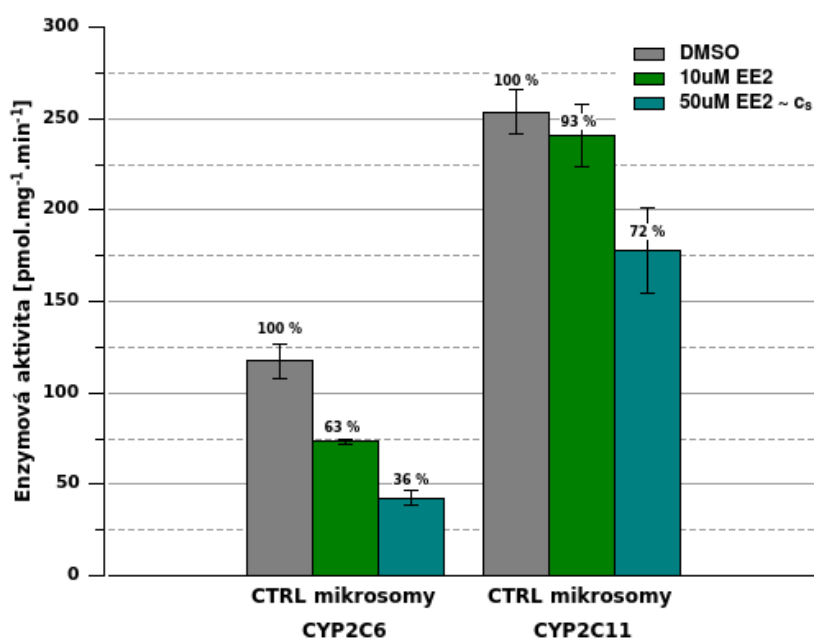
Obrázek 4.2. Vliv 17α -ethinylestradiolu na *O*-depentylaci 7-pentoxyresorufinu, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP2B1/2 z jaterních mikrosomů potkanů po indukci fenobarbitalem (PB) a kontrolních potkanů (CTRL). Koncentrace substrátu 7-pentoxyresorufinu (c_s) byla $2\mu\text{M}$. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP2B1/2 po přidání EE2 vztahenou k aktivitě CYP2B1/2 bez přídavku EE2.

4.1.3 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2C6 a CYP2C11

Specifická aktivita cytochromu P450 2C6 byla stanovena specifickou markerovou reakcí 4'-hydroxylace diklofenaku [109].

Specifická aktivita cytochromu P450 2C11 byla stanovena specifickou markerovou reakcí 16 α -hydroxylace testosteronu [110].

Specifická aktivita CYP2C6 a CYP2C11 byla stanovena v jaterních mikrosomech kontrolních potkanů, ve kterých je obsah CYP2C významný a není potřeba je indukovat [25]. Z grafu na obrázku 4.3 je patrné, že specifická aktivita CYP2C6 byla po přidání 17α -ethinylestradiolu v kontrolních mikrosomech snížena více než specifická aktivita CYP2C11. V případě CYP2C6 došlo vlivem EE2 (50 μ M) ke snížení aktivity až na 36% a aktivita CYP2C11 byla snížena pouze na 72 %.



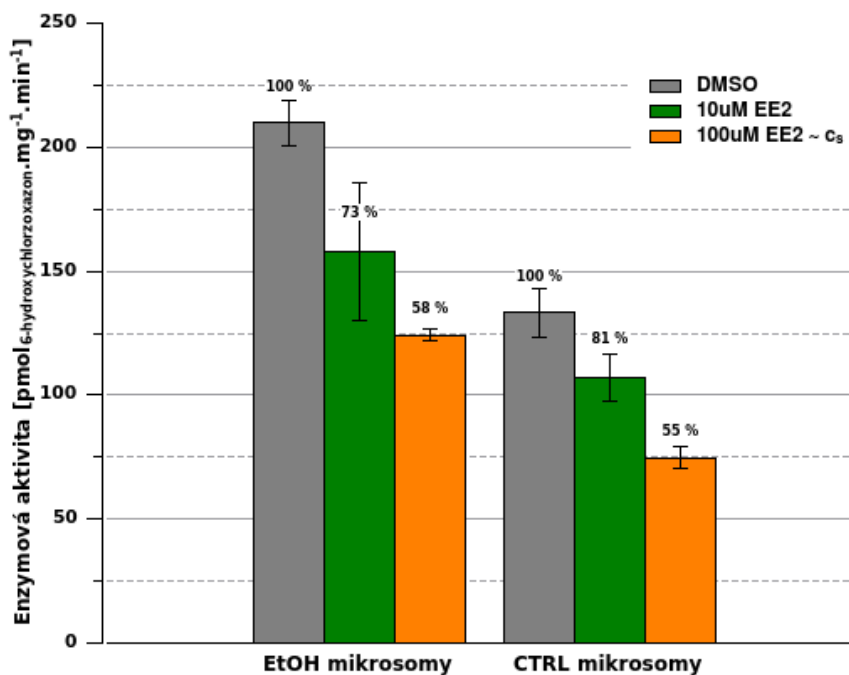
Obrázek 4.3. Vliv 17α -ethinylestradiolu na 4'-hydroxylaci diklofenaku, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP2C6, a 16 α -hydroxylaci testosteronu, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP2C11, zprostředkované jaterními mikrosomy kontrolních potkanů (CTRL). Koncentrace substrátu diklofenaku (c_s) byla 50 μ M. Koncentrace substrátu testosteronu (c_s) byla 50 μ M. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP2C6/11 po přidání EE2 vztahenou k aktivitě CYP2C6/11 bez přídavku EE2.

4.1.4 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2E1

Specifická aktivita cytochromu P450 2E1 byla stanovena specifickou markerovou reakcí 6-hydroxylace chlorzoxazonu [112].

V případě CYP2E1 (obrázek 4.4) došlo také po přidání 17α -ethinylestradiolu ke snížení specifické aktivity CYP2E1 v případě zprostředkování reakce jaterními mikrosomy potkanů vystavených EtOH i v případě zprostředkování reakce jaterními mikrosomy kontrolních potkanů.

V obou případech došlo k přibližně stejné inhibici CYP2E1. Při použití $10\mu\text{M}$ EE2 a $100\mu\text{M}$ EE2 (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu chlorzoxazonu) byl inhibiční vliv EE2 v obou vzorcích srovnatelný.

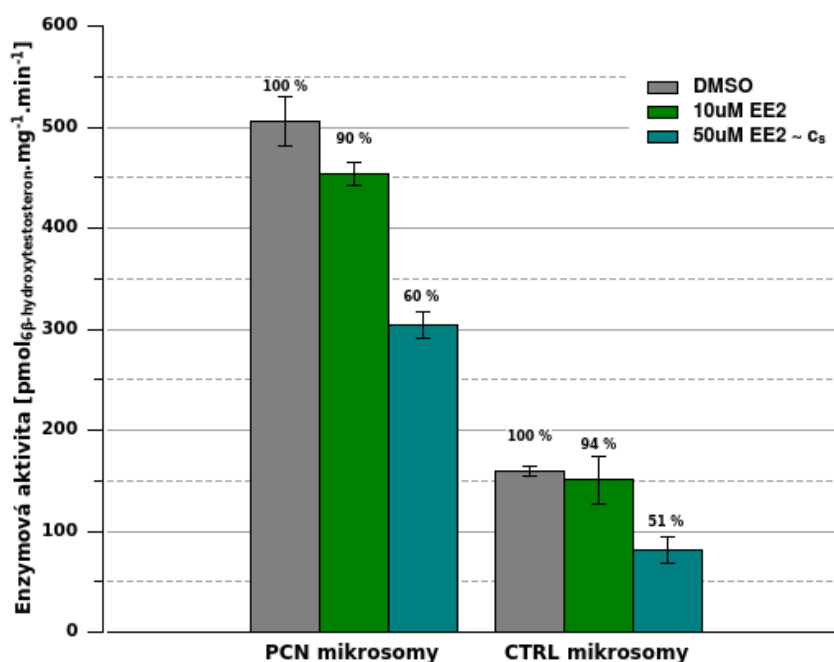


Obrázek 4.4. Vliv 17α -ethinylestradiolu na 6-hydroxylaci chlorzoxazonu, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP2E1 z jaterních mikrosomů potkanů po indukci ethanolem (EtOH) a kontrolních potkanů (CTRL). Koncentrace substrátu chlorzoxazonu (c_s) byla $100\mu\text{M}$. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP2E1 po přidání EE2 vztaženou k aktivitě CYP2E1 bez přidavku EE2.

4.1.5 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A1/2

Specifická aktivita cytochromu P450 3A1/2 byla stanovena specifickou markerovou reakcí 6β -hydroxylace testosteronu [114].

V jaterních mikrosomech potkanů vystavených PCN a v mikrosomech kontrolních potkanů byla 6β -hydroxylace TST katalyzovaná CYP3A1 vlivem EE2 inhibována (obrázek 4.5). V obou případech, jak v jaterních mikrosomech z potkanů indukovaných pregnenolon- 16α -karbonitrilem (PCN), tak v jaterních mikrosomech potkanů kontrolní skupiny, byla inhibice přibližně stejná. Při použití $10\mu\text{M}$ EE2 byla aktivita CYP3A1/2 snížena přibližně o 10 % a při použití $50\mu\text{M}$ EE2 (koncentrace odpovídající koncentraci substrátu testosteronu) byla inhibice 40 – 50%.



Obrázek 4.5. Vliv 17α -ethinylestradiolu na 6β -hydroxylaci testosteronu, markerovou reakci katalyzovanou převážně CYP3A1/2 z jaterních mikrosomů potkanů po indukci pregnenolon- 16α -karbonitrilem (PCN) a kontrolních potkanů (CTRL). Koncentrace substrátu testosteronu (c_s) byla $50\mu\text{M}$. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP3A1/2 po přidání EE2 vztaženou k aktivitě CYP3A1/2 bez přidavku EE2.

4.2 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských isoformů cytochromů P450 *in vitro*

Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských isoformů cytochromů P450 byl sledován ve vzorku lidských jaterních mikrosomů spojených od různých dárců (HLM, z angl. human liver microsomes). V těchto komerčně dodávaných izolovaných mikrosomech byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na specifické aktivity cytochromů P450 1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2E1 a 3A4.

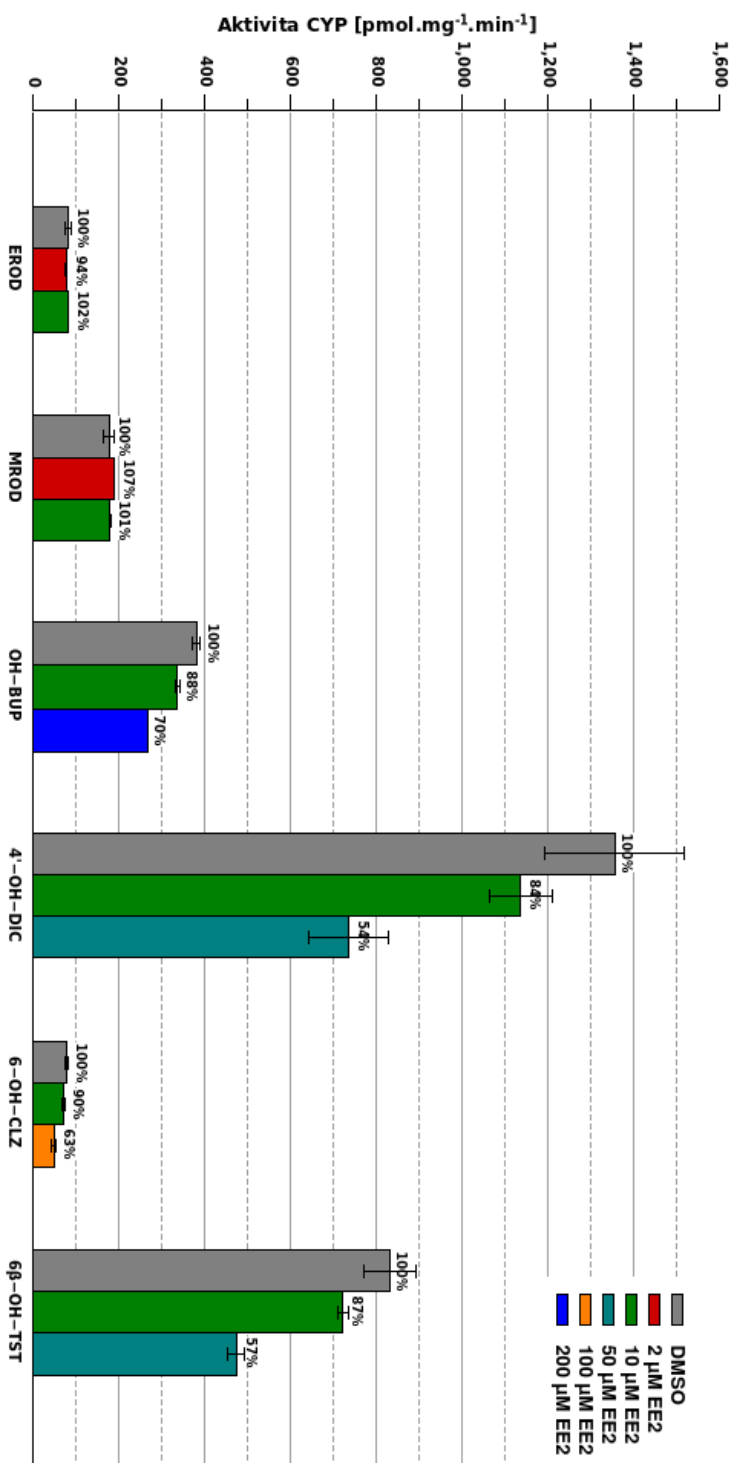
Účinek 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu vybraných isoformů cytochromů P450 byl sledován při koncentracích 10 μ M a koncentraci odpovídající saturační koncentraci substrátu a porovnán s aktivitou studovaných isoformů CYP v inkubačních směsích bez přídavku EE2.

Aktivity lidských cytochromů P450 byly stanoveny pomocí specifických markerových reakcí. Pro CYP1A1 byla použita specifická markerová reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu [104], pro CYP1A2 *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu [106], pro CYP2B6 hydroxylace bupropionu [108], pro CYP2C9 4'-hydroxylace diklofenaku [109], pro CYP2E1 6-hydroxylace chlorzoxazonu [112], pro CYP3A4 6 β -hydroxylace testosteronu [114].

Ze souhrnného grafu na obrázku 4.6 na straně 68 je patrné, že ve všech případech, kromě CYP1A1 a CYP1A2, byla specifická aktivita CYP vlivem EE2 snížena.

Při použití 10 μ M EE2 byly aktivity sníženy víceméně stejnou měrou. V případě CYP2C9 byla aktivita snížena o 16 %, u ostatních isoformů byla aktivita snížena méně. V případě CYP3A4 byla aktivita snížena o 13 %, u CYP2B6 o 12 % a u CYP2E1 o 10 %.

Při použití koncentrace 17 α -ethinylestradiolu odpovídající saturační koncentraci substrátu, byla nejvíce inhibována isoforma CYP2C9. V tomto případě byla použita 50 μ M koncentrace EE2 a aktivita byla snížena o 46 %, tedy téměř na polovinu. V případě CYP3A4 (50 μ M koncentrace EE2) byla snížena o 43 %. Aktivita CYP2E1 byla vlivem 100 μ M EE2 snížena o 37 % a aktivita CYP2B6 byla vlivem 200 μ M EE2 snížena o 30 %.



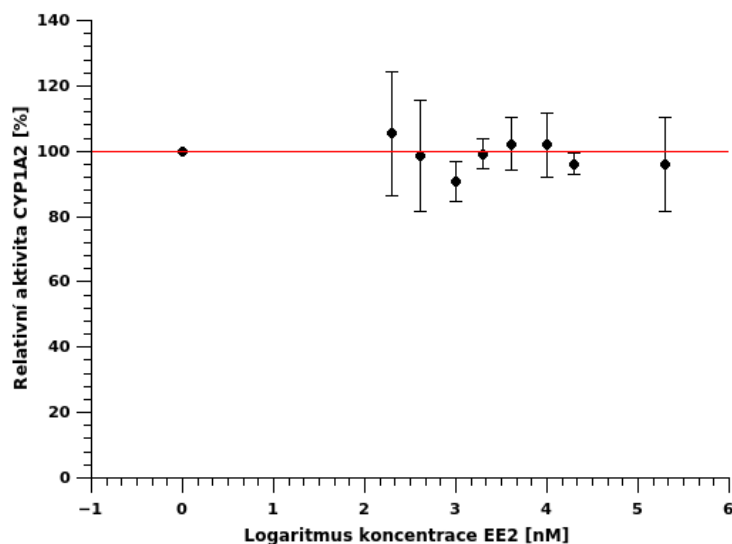
Obrázek 4.6. Vliv 17 α -ethinyloestradiolu na markerové reakce cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech. Specifická aktivita CYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD), koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 2 μ M. Specifická aktivita CYP1A2 byla stanovena reakcí *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD), koncentrace substrátu 7-methoxyresorufinu byla 2 μ M. Specifická aktivita CYP2B6 byla stanovena reakcí hydroxylace bupropionu (OH-BUP), koncentrace substrátu bupropionu byla 200 μ M. Specifická aktivita CYP2C9 byla stanovena reakcí 4'-hydroxylace diklofenaku (4'-OH-DIC), koncentrace substrátu diklofenaku byla 50 μ M. Specifická aktivita CYP2E1 byla stanovena reakcí 6 β -hydroxylace chlorzoxazonu (6-OH-CLZ), koncentrace substrátu chlorzoxazonu byla 100 μ M. Specifická aktivita CYP3A4 byla stanovena reakcí 6 β -hydroxylace testosteronu (6 β -OH-TST), koncentrace substrátu testosteronu byla 50 μ M. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Procenta vyjadřují aktivitu CYP po přidání EE2 vztahenou k aktivitě CYP bez přídavku EE2.

4.3 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaního rekombinantního cytochromu P450 1A2

V mé bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje, byl sledován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaní isoformy CYP1A1 v SupersomechTM [115]. Protože CYP1A2 sdílí s CYP1A1 75% sekvenční homologii [116] a je také schopný katalyzovat markerovou reakci CYP1A1 *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu, bylo zjišťováno, zda je CYP1A2 17 α -ethinylestradiolem inhibován také.

Pro stanovení schopnosti 17 α -ethinylestradiolu inhibovat aktivitu potkaního rCYP1A2 v SupersomechTM byla měřena míra *O*-demethylasové aktivity rCYP1A2 [106] pro různé koncentrace EE2. Použité koncentrace EE2 byly v rozmezí 0,2 – 200 μ M.

Specifická aktivita rCYP1A2 po přidání EE2 byla porovnána se specifickou aktivitou rCYP1A2 bez přídavku EE2. Z obrázku 4.7 je patrné, že potkaní rCYP1A2 17 α -ethinylestradiolem inhibován nebyl a hodnota IC₅₀ nemohla být stanovena.



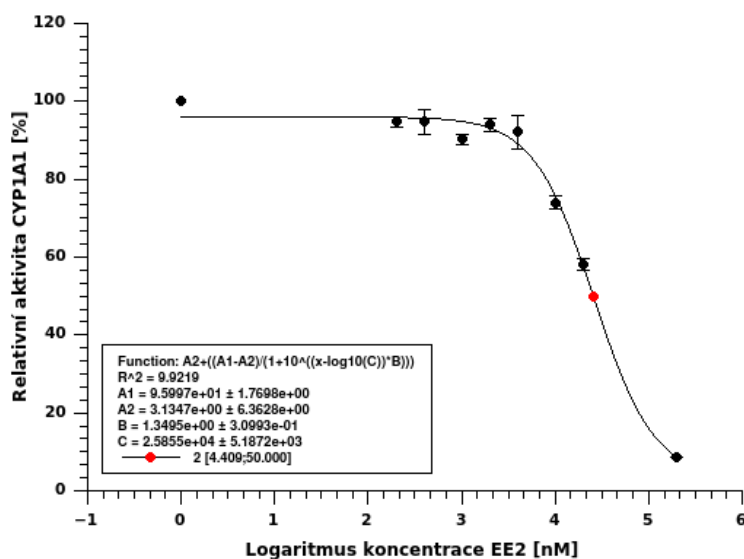
Obrázek 4.7. Vliv 17 α -ethinylestradiolu na specifickou aktivitu potkaního rekombinantního CYP1A2 v SupersomechTM. Závislost aktivity rCYP1A2 na logaritmu koncentrace EE2 (0,2 – 200 μ M). Aktivita rCYP1A2 byla stanovena reakcí *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu, koncentrace substrátu 7-methoxyresorufinu byla 2 μ M. Relativní aktivita v procentech vyjadřuje aktivitu rCYP1A2 po přidání EE2 vztahenou k aktivitě rCYP1A2 bez přídavku EE2. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

4.4 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských rekombinantních cytochromů P450 1A1 a 1A2

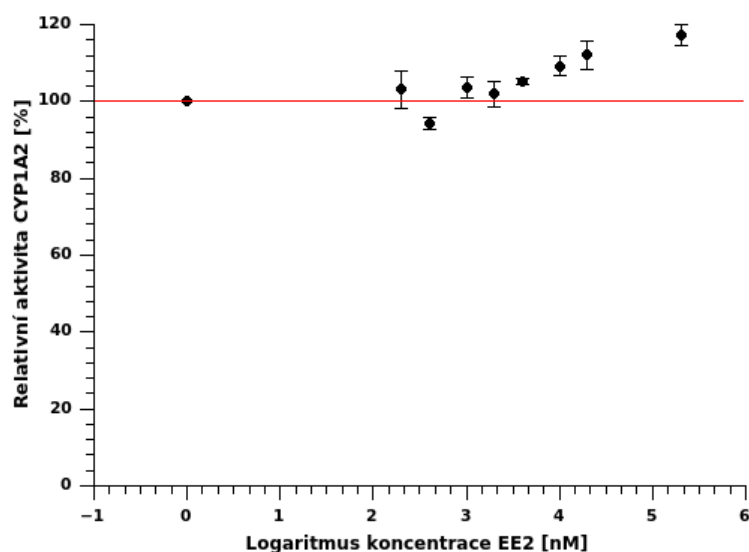
Pro stanovení schopnosti 17α -ethinylestradiolu inhibovat aktivitu lidského rCYP1A1 a rCYP1A2 v SupersomechTM byla měřena míra *O*-deethylasové aktivity rCYP1A1 [104] a míra *O*-demethylasové aktivity rCYP1A2 [106] pro různé koncentrace EE2. Použité koncentrace EE2 byly v rozmezí 0,2 – 200 μ M.

Specifická aktivita rCYP1A1/2 po přidání EE2 byla porovnána se specifickou aktivitou rCYP1A1/2 bez přídavku EE2. V případě rCYP1A1 byla závislost proložena křivkou pro vyhodnocení koncentrace IC_{50} [105] (Obrázek 4.8). Koncentrace ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici rCYP1A1, $IC_{50}(CYP1A1)$, byla 25,6 μ M.

Z grafu na obrázku 4.9 na straně 71 je patrné, že lidský rCYP1A2 17α -ethinylestradiolem inhibován nebyl a hodnota IC_{50} nemohla být stanovena.



Obrázek 4.8. Vliv 17α -ethinylestradiolu na specifickou aktivitu lidského rekombinantního CYP1A1 v SupersomechTM. Závislost aktivity rCYP1A1 na logaritmu koncentrace EE2 (0,2 – 200 μ M). Aktivita rCYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu, koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 2 μ M. Relativní aktivita v procentech vyjadřuje aktivitu rCYP1A1 po přidání EE2 vztaženou k aktivitě rCYP1A1 bez přídavku EE2. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.



Obrázek 4.9. Vliv 17α -ethinylestradiolu na specifickou aktivitu lidského rekombinantního CYP1A2 v SupersomechTM. Závislost aktivity rCYP1A2 na logaritmu koncentrace EE2 (0,2 – 200 μ M). Aktivita rCYP1A2 byla stanovena reakcí *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu, koncentrace substrátu 7-methoxyresorufinu byla 2 μ M. Relativní aktivita v procentech vyjadřuje aktivitu rCYP1A2 po přidání EE2 vztaženou k aktivitě rCYP1A2 bez přídavku EE2. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

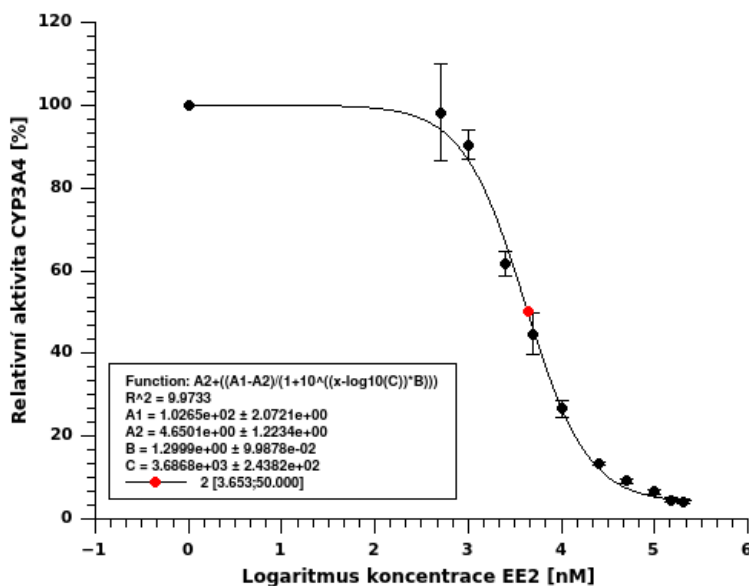
4.5 Vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu lidského rekombinantního cytochromu P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 je významný biotransformační enzym účastnící se metabolismu 50 % předepisovaných léčiv. CYP3A4 je spolu s CYP2C9 hlavní isoformou katalyzující přeměnu 17α -ethinylestradiolu na 2-hydroxyethinylestradiol [15] a prozatím neznámý X-hydroxyethinylestradiol [20].

V mé bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje, byl již sledován vliv 17α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaní isoformy CYP3A1/2 v SupersomechTM [115]. Pro stanovení schopnosti 17α -ethinylestradiolu inhibovat aktivitu lidského rCYP3A4 v SupersomechTM byla měřena míra tvorby 6β -hydroxytestosteronu při různých koncentracích EE2. Použité koncentrace EE2 byly v rozmezí 0,05 – 200 μ M.

Specifická aktivita rCYP3A4 po přidání EE2 byla porovnána se specifickou aktivitou rCYP3A4 bez přídavku EE2. Závislost relativní aktivity rCYP3A4 na

logaritmu koncentrace EE2 byla proložena křivkou pro vyhodnocení koncentrace IC_{50} [105] (obrázek 4.10). Koncentrace 17α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici rCYP3A4, IC_{50} (rCYP3A4), byla $4,5 \mu\text{M}$.



Obrázek 4.10. Vliv 17α -ethinylestradiolu na specifickou aktivitu lidského rekombinantního CYP3A4 v SupersomechTM. Závislost aktivity rCYP3A4 na logaritmu koncentrace EE2 (0,05 – 200 μM). Aktivita rCYP3A4 byla stanovena reakcí 6β -hydroxylace testosteronu, koncentrace substrátu testosteronu byla $50\mu\text{M}$. Relativní aktivita v procentech vyjadřuje aktivitu rCYP3A4 po přidání EE2 vztáženou k aktivitě rCYP3A4 bez přídatku EE2. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

4.6 Inhibiční studie potkaního cytochromu P450 1A1

K poznání typu inhibice potkaního rCYP1A1 17α -ethinylestradiolem byla provedena inhibiční studie vlivu 17α -ethinylestradiolu na aktivitu rCYP1A1 exprimovaném v SupersomechTM.

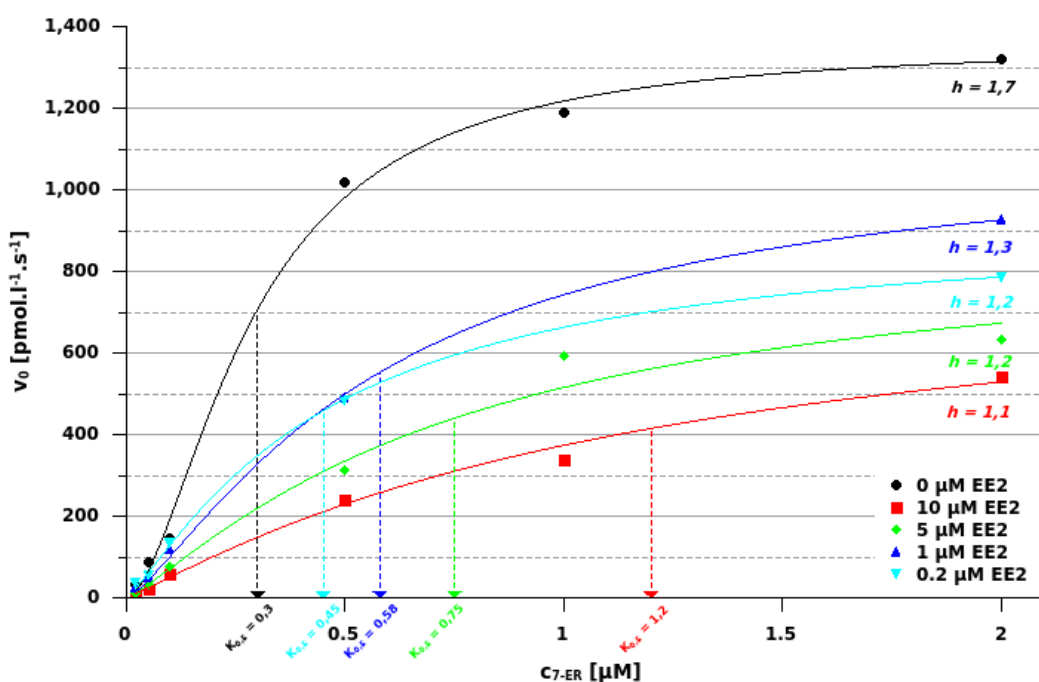
Účinek různých koncentrací 17α -ethinylestradiolu (0; 0,2; 1; 5; 10 μM) na aktivitu potkaního rCYP1A1 byl sledován při použití různých koncentrací substrátu 7-ethoxyresorufinu (0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2).

Pro určení konkrétního typu inhibice byly vytvořeny diagnostické grafy příslušných závislostí – Michaelis-Menten (obrázek 4.11 na straně 73), Lineweaver-Burk (obrázek 4.12 na straně 75), Eadie-Hofstee (obrázek 4.13 na

straně 75), Hanes-Woolf (obrázek 4.14 na straně 76), Dixon (obrázek 4.15 na straně 77).

Z grafu na obrázku 4.11 je patrné, že závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu (7-ethoxyresorufin) nevykazuje kinetiku Michaelise a Mentenové. Ani dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka ($1/v$ vs. $1/c_s$) nevykazuje lineární závislost, ale křivka má v oblasti vyšších koncentrací 7-ethoxyresorufinu konkávní tvar (graf na obrázku 4.12, strana 75). Žádné z dalších provedených vynesení nevykazovalo klasickou lineární závislost.

Sigmoidální závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu byla proložena naměřenými body v programu QtiPlot za použití Hillovy rovnice [117]. Hillův koeficient byl nejvyšší při reakci, která nebyla ovlivněna 17α -ethinylestradiolem. S rostoucí koncentrací 17α -ethinylestradiolu se snižovala hodnota Hillova koeficientu, což ukazuje na to, že se 17α -ethinylestradiol chová jako negativní heterotropní modulátor. Kinetické parametry vyhodnocené v programu QtiPlot jsou shrnuty v tabulce 4.1 na straně 74.



Obrázek 4.11. Závislost rychlosti reakce katalyzované potkaním rCYP1A1 na koncentraci substrátu. Vliv EE2 na rychlost reakce byl stanoven pomocí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM . Použité koncentrace 17α -ethinylestradiolu byly 0; 0,2; 1; 5; 10 μM . $K_{0,5}$ – hodnota koncentrace substrátu, při které je rychlost rovna polovině limitní rychlosti; h – Hillův koeficient.

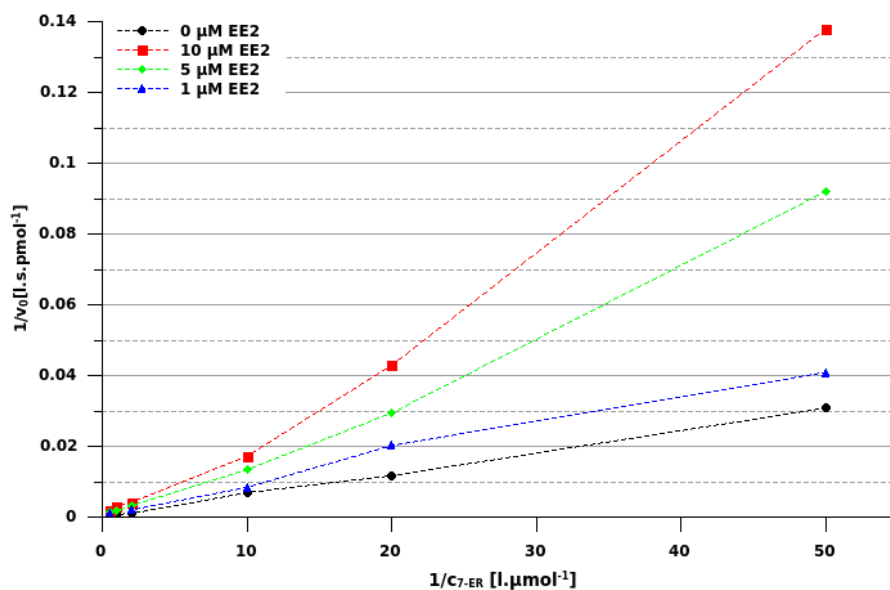
Tabulka 4.1. Kinetické parametry CYP1A1 určené ze závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM . Použité koncentrace 17 α -ethinylestradiolu (0; 0,2; 1; 5; 10 μM). V_{lim} – limitní rychlost, h – Hillův koeficient, $K_{0,5}$ – hodnota koncentrace substrátu, při které je rychlost rovna polovině limitní rychlosti, Q – index kooperativity.

c_{EE2} (μM)	V_{lim} (pmol/1/s)	h	$K_{0,5}$ (μM)	Q
0	1360	1,7	0,3	13
0,2	920	1,2	0,45	39
1	1110	1,3	0,58	28
5	880	1,2	0,75	40
10	830	1,1	1,2	54

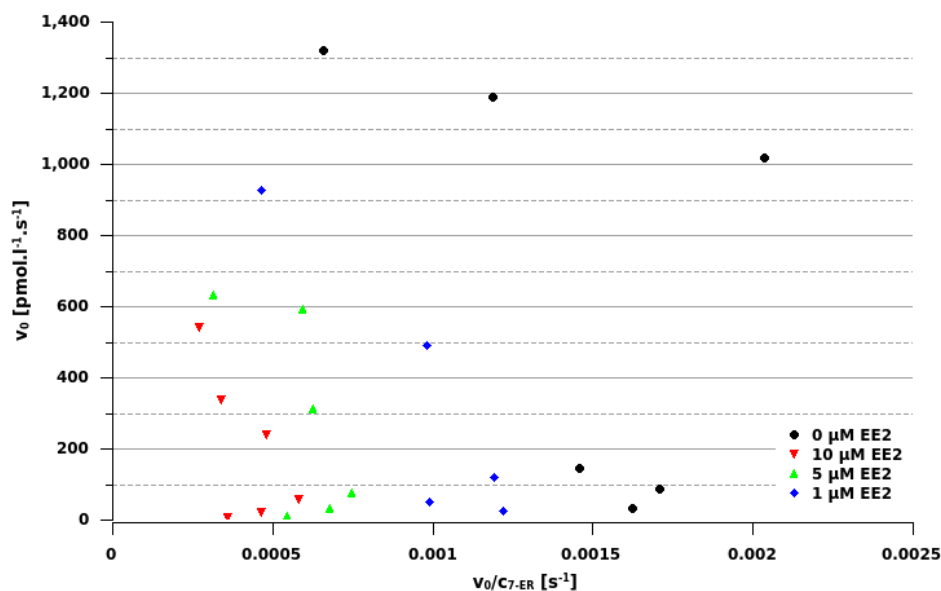
Z hodnoty Hillova koeficientu (h) 1,7 a indexu kooperativity (Q) 13, je patrné, že samotný 7-ethoxyresorufin je pozitivním homotropním modulátorem rCYP1A1. Hodnota indexu kooperativity roste se zvyšující se koncentrací 17 α -ethinylestradiolu, což potvrzuje fakt, že je 17 α -ethinylestradiol inhibitorem CYP1A1.

Měření vlivu 0,2 μM EE2 na *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu (světle modrá křivka na obrázku 4.11 na straně 73) nebylo, dle průběhu křivky, provedeno zcela správně. Kinetické parametry uvedené v tabulce 4.1 neodpovídají trendu účinku 17 α -ethinylestradiolu, a proto nebylo nadále s hodnotami 0,2 μM EE2 počítáno.

Ani vynesení dle Lineweavera-Burka (obrázek 4.12 na straně 75) nebylo lineární a nevykazovalo klasické kinetické chování. Z naměřených křivek je patrné, že při vyšších koncentracích 7-ER se 7-ER chová jako inhibitor CYP1A1 a je viditelná inhibice substrátem. Vynesení dle Eadie-Hofsteeho (obrázek 4.13 na straně 75) také nebylo lineární, ale průběh křivek ukazuje na „sigmoidální“ kinetiku [118], která odpovídá autoaktivaci rCYP1A1 7-ethoxyresorufinem.

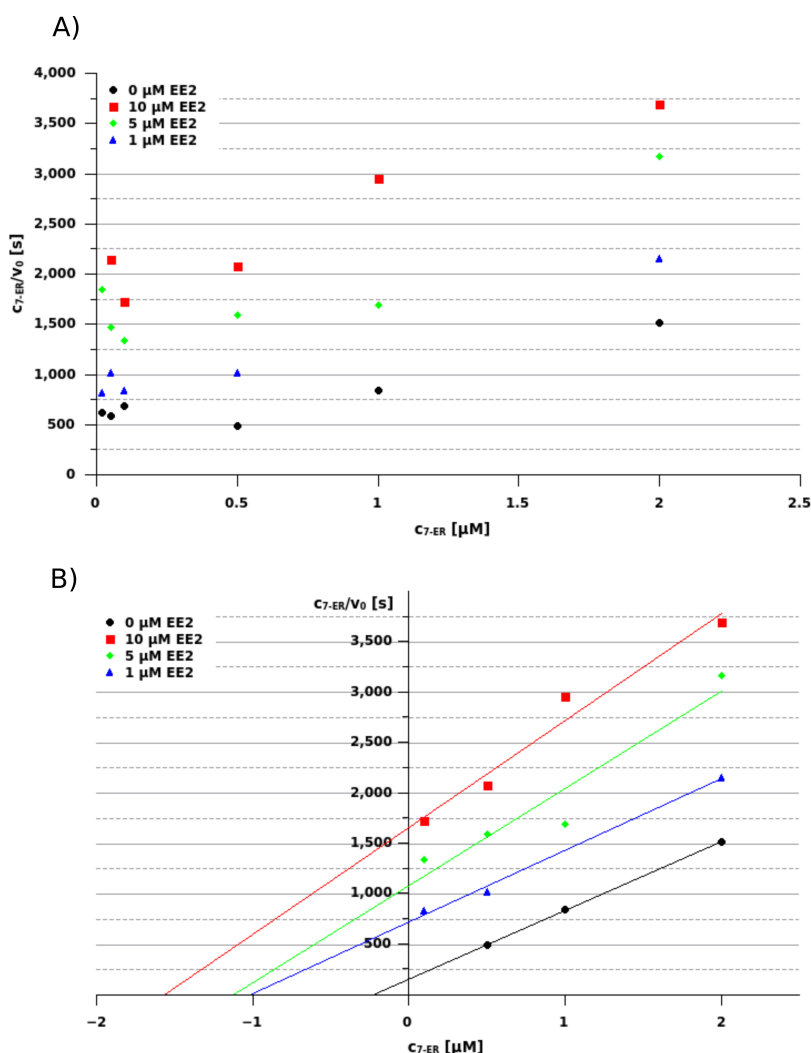


Obrázek 4.12. Dvojité reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka – grafické znázornění závislosti $1/v$ na $1/c_{7-ER}$ při různých koncentracích EE2. Aktivita rCYP1A1 byla stanovena pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM .



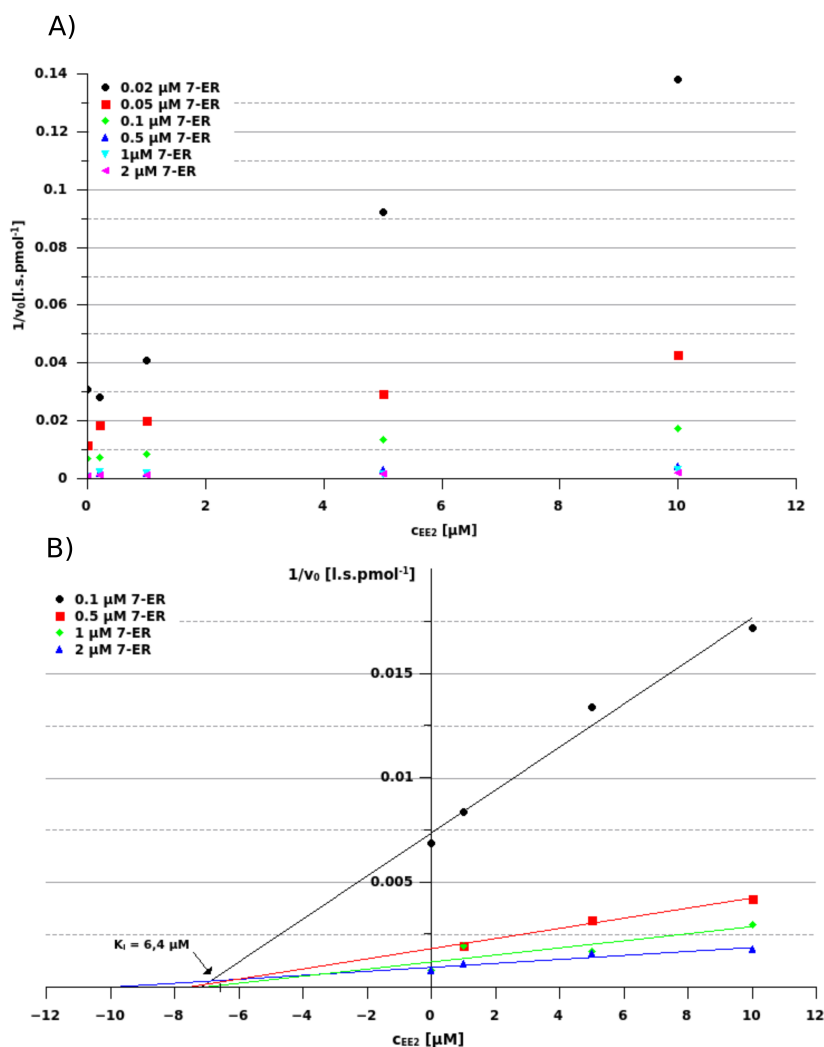
Obrázek 4.13. Vynesení dle Eadie-Hofsteeho – grafické znázornění závislosti v na v/c_{7-ER} při různých koncentracích EE2. Aktivita rCYP1A1 byla stanovena pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM .

Dále bylo z naměřených hodnot sestrojeno vynesení dle Hanese-Woolfa (závislost c_{7-ER}/v na c_{7-ER}). Dle grafu A na obrázku 4.14 vynesení nevykazovalo lineární závislost, ale mělo konkávní tvar. Pro vyhodnocení typu inhibice byly hodnoty odpovídající vyšším koncentracím substrátu (0,1 – 2 μM) proloženy lineární regresí (Graf B na obrázku 4.14). Proložené křivky jsou téměř rovnoběžné. Použití koncentrací substrátu (7-ethoxyresorufinu) vyšších než 0,1 μM ($K_M \sim 0,43 \mu\text{M}$ [119]), značí kompetitivní inhibici potkaního rCYP1A1 17 α -ethinylestradiolem. To je v souladu s literaturou, která prokazuje kompetitivní inhibici lidského rCYP1A1 17 α -ethinylestradiolem [48].



Obrázek 4.14. A) Vynesení dle Hanese-Woolfa – grafické znázornění závislosti c_{7-ER}/v na c_{7-ER} při různých koncentracích EE2. B) Proložení hodnot vyšších koncentrací 7-ER (0,1 – 2 μM) lineární regresí. Aktivita rCYP1A1 byla stanovena pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM .

Pro určení inhibiční konstanty (K_i) 17 α -ethinylestradiolu bylo sestrojeno vynesení dle Dixona (graf A na obrázku 4.15). Ani v tomto případě nebyly závislosti lineární, ale měly hyperbolický charakter. Pro odhad konstanty K_i byly použity závislosti reciproké rychlosti reakce na koncentraci EE2 při vysokých koncentracích 7-ethoxyresorufinu. Závislosti byly proloženy rovnicí lineární regrese (graf B na obrázku 4.15). Proložení přímek, které se stýkaly v II. kvadrantu grafu, značilo kompetitivní inhibici, což je v souladu s literaturou [48]. Pro odhad K_i byl uvažován medián průsečíků jednotlivých křivek. Odhad hodnoty inhibiční konstanty, K_i , byl 6,4 μM .



Obrázek 4.15. A) Vynesení dle Dixona – grafické znázornění závislosti $1/v$ na C_{EE2} pro různé koncentrace substrátu 7-ER. B) Proložení hodnot naměřených pro vyšší koncentrace 7-ER (0,1 – 2 μM) lineární regrese. Aktivita rCYP1A1 byla stanovena pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 2 μM .

5. Diskuze

17 α -ethinylestradiol je syntetický hormon řadící se mezi estrogení endokrinní disruptory [4]. Tyto látky jsou schopné narušovat endokrinní systém populace a interagovat s tělu přirozenými hormony [2]. Vzhledem k tomu, že se 17 α -ethinylestradiol nachází téměř ve všech přípravcích hormonální antikoncepce, je řazen mezi nejužívanější léčivo vůbec [5]. Proto je jeho působení jako endokrinní disruptor v rámci EU od roku 2013 sledováno [7] a studium jeho bioakumulace, metabolismu, biodegradace a toxicity je velmi významné [6].

V této diplomové práci byl studován vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních (CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1/2) a lidských (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4) isoformem cytochromů P450 *in vitro*. Cytochromy P450 jsou klíčové enzymy biotransformace xenobiotik katalyzující převážně oxidační, peroxidační a redukční reakce [25]. Pro studium účinku 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 byly vybrány tyto isoformy, neboť se jedná o významné CYP účastníky se metabolismu řady léčiv a hrají významnou roli v metabolismu samotného 17 α -ethinylestradiolu a to především v přeměně EE2 na 2-hydroxyethinylestradiol [16, 18–20].

Vliv 17 α -ethinylestradiolu na specifické aktivity CYP byl nejprve zkoumán v potkaních mikrosomech indukovaných specifickými induktory cytochromů P450 a v kontrolních mikrosomech, ve kterých hladina CYP není indukována.

Výsledky v této diplomové práci ukázaly, že *in vitro* má 17 α -ethinylestradiol inhibiční vliv na aktivitu potkaního CYP1A1 v jaterních mikrosomech indukovaných specifickým induktorem tohoto enzymu β -naftoflavonem (obrázek 4.1 na straně 62). Enzymová aktivita byla při použití 10 μ M EE2 výrazně snížena o 81 %, což je v naprostém souladu s literaturou, kde byla, za použití stejné markerové reakce (EROD), aktivita CYP1A1 v jaterních mikrosomech při použití 10 μ M EE2 snížena o 80 % [90]. V bakalářské práci [115], na kterou tato práce navazuje, byla při stejné koncentraci substrátu (2 μ M 7-ER) markerové reakce EROD stanovena koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici rCYP1A1 (IC₅₀). Tato hodnota byla 7,9 μ M, což řádově odpovídá hodnotám naměřeným v diplomové práci. Ačkoliv je CYP1A1 extrahepatální

enzym, nezanedbatelná rychlost reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu byla naměřena i v kontrolních jaterních mikrosomech, kde CYP1A1 indukovaný nebyl. Je tomu zřejmě proto, že EROD je katalyzována také CYP1A2, který je v játrech konstitutivně přítomný [104]. Žádná inhibice EROD však v kontrolních mikrosomech pozorována nebyla.

Vzhledem k tomu, že potkaní CYP1A2 sdílí s CYP1A1 75% sekvenční homologii [116], bylo možné, že bude 17α -ethinylestradiol inhibovat také potkaní rCYP1A2. Dle výsledků je však patrné, že EE2 nemá na specifickou aktivitu CYP1A2 žádný vliv (obrázek 4.7 na straně 69). To odpovídá výsledku měření *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu v kontrolních mikrosomech, kde byla EROD katalyzována pravděpodobně CYP1A2 a žádný inhibiční efekt EE2 pozorován nebyl. CYP1A1 a CYP1A2 jsou vysoce konzervované enzymy, které se vyskytují v různých organismech s vysokou podobností [35]. Ačkoliv mají CYP1A1 a CYP1A2 výraznou aminokyselinovou podobnost, jejich substráty, induktory a inhibitory se velmi často liší. To je zřejmě způsobeno odlišností aminokyselin v aktivním centru enzymů, která však nebyla prozatím zcela vyřešena [120, 121].

V případě cytochromu P450 2B1 bylo již dříve ve studii Kent a kol. (2002) [91] prokázáno, že je 17α -ethinylestradiolem *in vitro* ireversibilně inhibován ($K_i \sim 11\mu\text{M}$). V experimentech provedených v laboratoři molekulární karcinogenese a vývoje léčiv na katedře biochemie byla *in vivo* aktivita CYP2B1 po jednorázovém podání EE2 (20 mg/kg hmotnosti potkana) o 70 % snížena [122]. V našem případě se *in vitro* inhibice EE2 potvrdila (obrázek 4.2 na straně 63). V mikrosomech indukovaných fenobarbitalem (specifický induktor isoformy CYP2B1) byla aktivita CYP2B1/2 po použití $10\mu\text{M}$ EE2 snížena o 55 %.

Cytochromy P450 2C jsou nejvíce zastoupené cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech, a proto nebyly v mikrosomech indukované žádným specifickým induktorem. V této diplomové práci byly cytochromy P450 2C6 a 2C11 v potkaních jaterních mikrosomech *in vitro* inhibované 17α -ethinylestradiolem také (obrázek 4.3 na straně 64). Již v dřívějších studiích se ukázalo, že se EE2 kovalentně váže na CYP2C11 a je jeho ireversibilním inhibitorem [92]. V této diplomové práci byla 16α -hydroxylace testosteronu (markerová reakce CYP2C11) z 28 % inhibována $50\mu\text{M}$ EE2 (odpovídající koncentraci substrátu). V případě

CYP2C6 je prozatím známý pouze vliv EE2 na aktivitu CYP2C6 *in vivo* [93]. EE2 *in vivo* indukoval aktivitu CYP2C6, což je naprosto odlišné od výsledku v této diplomové práci. V této diplomové práci byl CYP2C6 výrazně inhibován a při použití 50 μ M EE2 (odpovídající koncentraci substrátu) byla aktivita CYP2C6 snížena na 36 %. Tento rozdíl potvrzuje, že je velmi důležité při porovnávání výsledků rozlišovat experimenty prováděné *in vivo* a *in vitro*, neboť velmi často poskytují nesrovnatelné výsledky [123].

Cytochrom P450 2E1 se velmi výrazně uplatňuje v metabolismu toxikologicky významných látek [25], ale vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaního CYP2E1 prozatím studován nebyl. Dle výsledků experimentů diplomové práce byla specifická aktivita CYP2E1 vlivem EE2 (100 μ M) v jaterních mikrosomech indukovaných ethanolem snížena o 42 % (obrázek 4.4 na straně 65). V kontrolních jaterních mikrosomech probíhala 6-hydroxylace chlorzoxazonu také, ačkoliv zde CYP2E1 indukován nebyl. To je zřejmě způsobeno tím, že CYP2E1 tvoří 11 % celkového množství CYP v játrech [124] a proto mohla být 6-hydroxylace chlorzoxazonu katalyzovaná i v kontrolních mikrosomech. Tomu odpovídají i hodnoty inhibice 17 α -ethinylestradiolem, neboť 6-hydroxylace chlorzoxazonu byla vlivem EE2 (100 μ M) snížena o 45 %, tedy velmi podobně jako v jaterních mikrosomech indukovaných ethanolem.

Cytochrom P450 3A1/2 byl v potkaních jaterních mikrosomech, indukovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem, 17 α -ethinylestradiolem inhibován (obrázek 4.5 na straně 66). Aktivita CYP3A1/2 byla účinkem EE2 (50 μ M) snížena o 40 %. Rychlost 6 β -hydroxylace testosteronu (markerová reakce CYP3A1/2) nebyla snížena pouze v mikrosomech indukovaných PCN, ale také v kontrolních mikrosomech, kde CYP3A1/2 indukovaný nebyl a tvorba 6 β -hydroxytestosteronu byla vlivem EE2 (50 μ M) snížena o 49 %. Vzhledem k tomu, že CYP3A1 tvoří 30 – 37% celkového množství CYP v játrech [125], mohl být pokles tvorby 6 β -hydroxytestosteronu způsoben inhibicí CYP3A1 i v kontrolních mikrosomech. Další důvodem mohla být inhibice jiného cytochromu P450. 6 β -hydroxylace testosteronu je katalyzovaná také cytochromem P450 2A2 [119], což však nemůže být potvrzeno, neboť vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2A2 nebyl prozatím studován.

V této diplomové práci byly dále studovány účinky 17 α -ethinylestradiolu

na specifické aktivity lidských isoform cytochromů P450 *in vitro*. Díky velmi častému používání ethinylestradiolu v lékařství a hospodářství jsou lidé čím dál více vystavováni negativním účinkům EE2 a studium jeho účinků na aktivitu cytochromů P450, kterými je metabolisován, je důležité.

Lidské cytochromy P450 1A1 a 1A2 sdílí 70% sekvenční homologii [36], avšak jejich výskyt v lidských játrech je značně rozdílný. CYP1A1 je typickým extrahepatálním enzymem a v játrech tvoří méně než 0,7 % celkového množství CYP [126]. To může vysvětlovat i výsledek stanovení inhibice CYP1A1 v HLM, ve kterých vlivem EE2 nedošlo ke snížení rychlosti EROD, stejně jako v případě potkaních kontrolních mikrosomů (obrázek 4.6 na straně 68). Ačkoliv je CYP1A1 v játrech zastoupen ve velmi malém množství, *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu v lidských kontrolních mikrosomech probíhala, protože v lidských játrech je katalyzována především cytochromem P450 1A2. Stejně jako u potkaní isoformy byla stanovena míra inhibice rCYP1A1 17 α -ethinylestradiolem. Ukázalo se, že lidský rCYP1A1 inhibován 17 α -ethinylestradiolem byl a hodnota IC₅₀ byla 25,6 μ M (obrázek 4.8 na straně 70). Oproti hodnotě uvedené v literatuře (IC₅₀ 2,7 \pm 0,3 μ M) [48] je námi stanovená hodnota vysoká. Rozdíl může být způsoben tím, že byla použita jiná markerová reakce (*O*-deethylace fenacetinu, která není specifickou markerovou reakcí CYP1A1, ale CYP1A2 [127]). Měřením vlivu EE2 na *O*-demethylaci 7-methoxyresorufinu zprostředkovanou CYP1A2, bylo zjištěno, že CYP1A2 v lidských jaterních mikrosomech nebyl inhibován (obrázek 4.6 na straně 68). Jelikož CYP1A2 tvoří 13 % celkového množství CYP v játrech [35], nemohla být důvodem nízká exprese CYP1A2 v játrech. Proto byla stanovena, stejně jako u potkaního modelu, míra inhibice lidského rekombinantního CYP1A2 exprimovaného v SupersomechTM. Ani zde se inhibice rCYP1A2 nepotvrdila (obrázek 4.9 na straně 71). Ačkoliv výsledek není v úplném souladu s literaturou, ve které je 17 α -ethinylestradiol uváděn jako velmi slabý inhibitor CYP1A2 (IC₅₀ > 45 μ M), rozdíl může být způsoben použitím jiné markerové reakce. V práci Chang a kol. 2009 [48] byla použita pro stanovení aktivity CYP1A1 i CYP1A2 stejná metoda *O*-deethylace fenacetinu.

17 α -ethinylestradiol měl inhibiční vliv také na aktivitu CYP2B6 v lidských mikrosomech. Aktivita CYP2B6 byla vlivem EE2 (200 μ M) snížena o 30 % (obrázek

4.6 na straně 68). V literatuře je EE2 uváděn jako silný inhibitor *O*-deethylace 7-ethoxyfluorkumarinu, katalyzovanou rCYP2B6, kde 35 μM EE2 způsobí 88% snížení aktivity rCYP2B6 [91]. Ve studii Chang a kol. 2009 [48] byla hydroxylace bupropionu zprostředkovaná lidským mikrosomálním CYP2B6 také snížena (IC₅₀ 23 μM). Ačkoliv v naší práci nebyla aktivita CYP2B6 v lidských mikrosomech snížena příliš výrazně, inhibiční vliv prokázán byl. Nižší pozorovaná inhibice mohla být způsobena tím, že ve studii Kent a kol. (2002) [91] byla použita jiná markerová reakce a ve studii Chang a kol. (2009) [48] nižší koncentrace bupropionu a mikrosomálních proteinů. Nižší inhibice CYP2B6 mohla být způsobena také tím, že v lidských jaterních mikrosomech je spolu s CYP2B6 přítomen také cytochrom b₅, který pozitivně moduluje aktivitu CYP2B6 a zvyšuje jeho aktivitu [91].

Cytochrom P450 2C9 je hlavní jaterní isoformou podrodiny 2C, která v lidských jaterních mikrosomech tvoří 20 % celkového množství CYP [128]. Jeho aktivita byla vlivem EE2 (50 μM) snížena o 46 % (obrázek 4.6 na straně 68). To je v souladu s literaturou, ve které je EE2 uváděn jako inhibitor isoformem cytochromů P450 2C8, 2C9 i méně zastoupené isoformy 2C19 [48]. Aktivita CYP2C9 měřená pomocí markerové reakce, oxidace losartanu, byla při použití 100 μM EE2 snížena o 45 % [98], oxidace losartanu však není vhodnou markerovou reakcí pro stanovení aktivity CYP2C9, neboť je katalyzovaná také CYP3A4, který je EE2 inhibován také [129].

O vlivu 17α-ethinylestradiolu na aktivitu potkaního a lidského CYP2E1 nejsou prozatím známé informace. Lidský CYP2E1 je s potkaním CYP2E1 z 80 % identický. Jejich enzymové vlastnosti jsou stejné a proto je potkaní CYP2E1 vhodným modelem pro enzymové chování lidského CYP2E1 [35]. V našich výsledcích byla aktivita lidského CYP2E1 působením EE2 (100 μM) v lidských mikrosomech snížena o 37 % (obrázek 4.6 na straně 68). To je přibližně stejný výsledek inhibice jako v případě potkaního CYP2E1, kde došlo k poklesu aktivity o 42 % (obrázek 4.4 na straně 65). Markerová reakce CYP2E1, 6-hydroxylace chlorzoxazonu, je nicméně katalyzována také CYP1A2 [130]. V této diplomové práci byl použit chlorzoxazon o koncentraci 100 μM. Při této koncentraci chlorzoxazonu katalyzuje 6-hydroxylaci chlorzoxazonu CYP2E1 z 93,3 % a CYP1A2 z 6,7 % [130]. Ačkoliv CYP1A2 tvoří větší procento (13 %) celkového množství CYP v lidských játrech než CYP2E1 (6 %) [35], CYP1A2 není 17α-ethinylestradiolem

ovlivněn, a je tedy pravděpodobné, že inhibice 6-hydroxylace chlorzoxazonu 17 α -ethinylestradiolem byla způsobena inhibicí CYP2E1.

Cytochrom P450 3A4 je nejvýznamějším cytochromem P450 v lidských játrech. Ačkoliv tvoří pouze 30 % celkového množství CYP v jaterních mikrosomech, účastní se metabolismu 50 % veškerých předepisovaných léčiv [35]. Vliv 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A4 byl již dříve prozkoumán. Z *in vivo* studií je známo, že přípravky hormonální antikoncepce obsahující 17 α -ethinylestradiol způsobují u jejich uživatelů inhibici CYP3A4 [76, 94]. V dřívějších experimentech *in vitro* byla 6 β -hydroxylace testosteronu, markerová reakce CYP3A4, v lidských jaterních mikrosomech inhibována a hodnota IC₅₀ EE2 odpovídala 39 μ M [48]. V případě rekombinantního CYP3A4 byla aktivita snížena vlivem EE2 (50 μ M) o 67 % a EE2 působil jako ireversibilní inhibitor aktivity CYP3A4 [95]. V této diplomové práci byla aktivita CYP3A4 vlivem EE2 (50 μ M) v lidských jaterních mikrosomech snížena o 43 % (obrázek 4.6 na straně 68). Jelikož je CYP3A4 významným cytochromem P450 metabolismu léčiv, byla stanovena koncentrace 17 α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici rCYP3A4 v SupersomechTM (IC₅₀), jejíž hodnota byla 4,5 μ M (obrázek 4.10 na straně 72). To je řádově shodné s hodnotou IC₅₀ (8,5 μ M) z jiných studií [48], kde však byla hodnota IC₅₀ stanovena jinou markerovou reakcí, hydroxylací midazolamu, a proto nemohou být hodnoty IC₅₀ zcela porovnatelné. Potkaní CYP3A1 je ortolog lidského CYP3A4, se kterým sdílí 73% sekvenční homologii [131]. V bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje, byla stanovena hodnota IC₅₀ (8,3 μ M) pro potkaní rCYP3A1 exprimovaný v SupersomechTM. Tato hodnota je velmi podobná naší stanovené hodnotě IC₅₀ lidského rCYP3A4, což ukazuje, že potkaní rCYP3A1 a lidský rCYP3A4 jsou 17 α -ethinylestradiolem inhibovány téměř stejnou měrou.

Dále bylo cílem diplomové práce určit typ inhibice potkaního rCYP1A1 17 α -ethinylestradiolem. Aktivita rCYP1A1 byla sledována markerovou reakcí *O*-deethylací 7-ethoxyresorufinu. Kinetika reakce rCYP1A1 nevykazovala klasickou závislost dle Michaelise-Mentenové, ale měla sigmoidální charakter (obrázek 4.11 na straně 73). Tato sigmoidální závislost, odpovídající při nízkých koncentracích 7-ethoxyresorufinu autoaktivaci CYP1A1 7-ethoxyresorufinem, byla již dříve

pozorována v některých kinetických studiích CYP1A1 [117, 132, 133]. Ani výnosy dle Lineweavera-Burka, Eadie-Hofsteeho, Hanese-Woolfa a Dixona nevykazovaly klasické lineární závislosti. V případě CYP1A1 je kromě autoaktivace substrátem pozorována také při vyšších koncentracích 7-ER inhibice substrátem [134]. Náznak inhibice substrátem rCYP1A1 se projevuje také v grafu vynesení dle Lineweavera-Burka (obrázek 4.12 na straně 75). Úplná inhibice substrátem však pozorována nebyla, neboť nebyly použity koncentrace 7-ER vyšší než 2,5 μM , při kterých je inhibice CYP1A1 substrátem dobře pozorovatelná [135]. Z grafu závislosti dle Eadie-Hofsteeho (obrázek 4.13 na straně 75) je patrné, že se jedná o pozitivní alosterickou modulaci CYP1A1 [118]. Ačkoliv vynesení dle Hanese-Woolfa (obrázek 4.14 na straně 76) nebylo lineární, ale mělo konkávní tvar, byly pro určení typu inhibice použity lineární úseky odpovídající vyšším koncentracím 7-ethoxyresorufinu (0,1 – 2 μM), které jsou však stále v oblasti K_M CYP1A1 pro tento substrát (0,43 μM). Proložené křivky byly téměř rovnoběžné, což je znakem kompetitivní inhibice. Pro určení inhibiční konstanty K_i 17 α -ethinylestradiolu, bylo vytvořeno vynesení dle Dixona (obrázek 4.15 na straně 77). I v tomto případě byly pro určení K_i použity oblasti křivky odpovídající vyšším koncentracím 7-ER. Proložené křivky se stýkaly v II. kvadrantu grafu, což značilo kompetitivní inhibici s přibližnou hodnotou K_i 6,4 μM . EE2 je CYP1A1 metabolisován na 2-hydroxyethinylestradiol a prozatím neznámý X-hydroxyethinylestradiol [18]. V mé bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje, byl sledován účinek metabolitů EE2, které vznikají při preinkubaci rCYP1A1 s NADPH (kofaktor CYP1A1) [115]. Při srovnání hodnoty IC_{50} bez preinkubace s NADPH (7,9 μM) a hodnoty IC_{50} po preinkubaci s NADPH (1,9 μM), se ukázalo, že metabolity, které při preinkubaci vznikají, přispívají k inhibici rCYP1A1 výrazněji než samotná parentální molekula EE2 (hodnota IC_{50} byla téměř 4 \times nižší). 17 α -ethinylestradiol se tedy při vyšších koncentracích substrátu 7-ER chová jako kompetitivní inhibitor, nicméně působí také jako sebevražedný substrát rCYP1A1.

Sigmoidální závislost rCYP1A1, odpovídající alosterické modulaci rCYP1A1, může být vysvětlena několika způsoby. Vzhledem k tomu, že CYP1A1 může do své dutiny aktivního místa umístit velké šesticyklové substráty (dibenzopyren), je

možné, že se do aktivního místa CYP1A1 váže více menších substrátů souběžně, což zapříčiní pseudoalosterické chování CYP1A1 [136]. Tato kooperativita v cytochromech P450 však nepředstavuje skutečné alosterické chování, tedy efektem indukovanou konformační změnu enzymové struktury [137]. Pseudoalosterické, kooperativní chování bylo již popsáno u některých isoform CYP - CYP2A6, CYP2B4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4. Pseudoalosterie nastává především u oligomerních enzymů, avšak CYP jsou monomerní proteiny. V několika případech dochází k homo- a hetero-oligomerizaci CYP, kdy se na sebe váží stejné nebo různé isoformy CYP, což může ovlivnit schopnost interakce se substráty, přístupnost hemu a citlivost vůči inaktivaci cytochromů P450 [137]. Vzhledem k tomu, že dutina aktivního místa je velmi často velká a substráty CYP jsou obvykle malé molekuly, je možné, že se do dutiny vejde více než jedna molekula substrátu [118]. Tvar křivky v grafu dle Eadie-Hofsteeho (obrázek 4.13 na straně 75) vyjadřuje autoaktivaci (homotropní regulace) rCYP1A1, což znamená, že aktivátorem je substrát samotný, v našem případě 7-ethoxyresorufin [136]. Autoaktivační efekt může být ovšem potlačen vazbou heterotropního efektoru [118]. Ze zvyšující se hodnoty Q – index kooperativity (tabulka 4.1 na straně 74) je patrné, že se 17α -ethinylestradiol chová jako negativní modulátor (inhibitor) rCYP1A1 a vliv autoaktivace snižuje. Kooperativita cytochromů P450 je chápána jako velmi komplexní alosterický mechanismus zahrnující vyplňování prostoru dutiny aktivního místa, do kterého se váže více substrátů, změny v enzymové konformaci indukované substrátem a modulace protein-proteinových interakcí v enzymových oligomerech [137]. Atkins a kol. v roce 2001 [138] ve své práci popsali mechanismus pseudoalosterického chování CYP, kde je mechanismus popsán jako „vnořený alosterismus“ [138]. V těchto „vnořených alosterických“ systémech existuje více konformací enzymu v přítomnosti i v nepřítomnosti substrátu a každý konformer je citlivý na alosterické účinky. Několik isoform cytochromů P450 vykazuje citlivost na přítomnost i nepřítomnost NADPH-P450 oxidoreduktasy, cytochromu b_5 , detergentů, iontů kovů, glutathionu nebo fosfolipidů. Přítomnost nebo absence těchto efektorových sloučenin může pozměnit kinetické parametry, stupeň kooperativity a regiospecifitu oxidace substrátů. Tyto efektoři se však patrně neváží do aktivního místa se substráty simultánně, ale

pravděpodobně způsobí konformační změnu enzymu [138]. V posledních letech se ukázalo, že mnoho cytochromů P450 (CYP2A6, CYP2B4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4) vykazuje odchylky od klasického chování kinetiky dle Michaelise-Mentenové [137]. Studium tohoto netypického chování CYP je velmi podstatné, neboť ukazuje, že léčiva metabolisovaná CYP mohou být katalyzována různými mechanismy, které nejsou popsány tradičními kinetickými modely.

Závěr

V předkládané diplomové práci byl studován vliv estrogenního endokrinního disruptoru 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních a lidských isoform cytochromů P450 *in vitro*.

V teoretické části jsou z odborné literatury shrnuty vlastnosti a metabolismus 17 α -ethinylestradiolu a jeho vliv na aktivitu cytochromů P450 v různých organismech. V experimentální části byla nejprve z jater kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných specifickým induktorem cytochromů P450 3A izolována mikrosomální frakce. Dále byly stanoveny specifické aktivity potkaních a lidských isoform cytochromů P450 bez a za přítomnosti EE2.

Výsledky z diplomové práce lze shrnout následovně:

- Mikrosomy z jater potkanů kontrolních a premedikovaných induktorem cytochromů P450 3A byly úspěšně izolovány.
- Inhibiční vliv 17 α -ethinylestradiolu byl potvrzen ve všech zkoumaných potkaních isoformách cytochromů P450, kromě isoformy CYP1A2. Při použití 17 α -ethinylestradiolu o koncentraci odpovídající použité koncentraci substrátu jednotlivých markerových reakcí byla nejvíce inhibována isoforma CYP2C6, kde byla markerová reakce 16 α -hydroxylace testosteronu inhibována z 64 %.
- Inhibiční účinek 17 α -ethinylestradiolu na aktivitu lidských isoform cytochromů P450 byl prokázán také ve vzorku lidských jaterních mikrosomů spojených od různých dárců. Inhibována byla markerová reakce hydroxylace bupropionu (katalyzována CYP2B6), 4'-hydroxylace diklofenaku (katalyzována CYP2C9), 6-hydroxylace chlorzoxazonu (katalyzována CYP2E1) i 6 β -hydroxylace testosteronu (katalyzována CYP3A4). *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (katalyzována CYP1A1) a *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu (katalyzována CYP1A2) v lidských jaterních mikrosomech ovlivněny nebyly. Nejvíce byla inhibována markerová reakce 4'-hydroxylace diklofenaku katalyzovaná CYP2C9 (46% inhibice) a 6 β -hydroxylace testosteronu katalyzovaná CYP3A4 (43% inhibice).

- Byla stanovena koncentrace 17α -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici lidských isoform rCYP1A1 (25,6 μ M) a rCYP3A4 (4,5 μ M) v SupersomechTM (hmyzí buňky infikované bakulovirem exprimující konkrétní isoformy CYP). Na aktivitu lidské a potkaní isoformy rCYP1A2 v SupersomechTM neměl 17α -ethinylestradiol žádný vliv.
- Bylo zjištěno, že 17α -ethinylestradiol se při vyšších koncentracích 7-ethoxyresorufinu, substrátu měřené *O*-deethylační reakce, chová jako kompetitivní inhibitor potkaního rCYP1A1. Odhad inhibiční konstanty K_i byl 6,4 μ M.
- Posledním dílčím cílem diplomové práce bylo určení typu inhibice lidského rCYP1A1. Vzhledem k vyhlášení nouzového stavu z důvodu pandemie onemocnění COVID-19, uzavření vysokých škol a následnému prodlužení v dodání potřebného lidského rCYP1A1 exprimovaného v SupersomechTM nebylo stanovení provedeno.

Seznam použité literatury

- [1] PINTO, P. I. S.; ESTÊVÃO, M. D. a POWER, D. M.: Effects of estrogens and estrogenic disrupting compounds on fish mineralized tissues. *Marine Drugs*. **12**:8, 4474–4494 (2014).
- [2] MENDES, J. J. A.: The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*. **40**:6, 781–788 (2002).
- [3] KORTENKAMP, A.; MARTIN, O.; FAUST, M.; EVANS, R.; MCKINLAY, R.; ORTON, F. a ROSIVATZ, E.: State of the art assesment of endocrine disrupters. Final Report. *Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3*. Dostupné z URL: <<https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota-edc-final-report.pdf>> [cit. 1. 3. 2020]
- [4] STIBOROVÁ, M.; DRAČÍNSKÁ, H.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; KLUSOŇOVÁ, Z.; HOLECOVÁ, J.; MARTÍNKOVÁ, M.; SCHMEISER, H. H. a VOLKER, M. A.: Exposure to endocrine disruptors 17 α -ethinylestradiol and estradiol influences cytochrome P450 1A1-mediated genotoxicity of benzo[a]pyrene and expression of this enzyme in rats. *Toxicology*. **400**, 48–56 (2018).
- [5] ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A., S. a PRAVEENA, S., M.: Ocurence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international*. **69**, 104–119 (2014).
- [6] BARREIROS, L.; QUEIROZ, J., F.; MAGALHÃES, L., M.; SILVA, A. M. a SEGUNDO M. A.: Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review. *Microchemical Journal*. **126**, 243–262 (2016).
- [7] Směrnice evropského parlamentu a rady 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013, kterou se mění směrnice 2000/60/ES a 2008/105/ES, pokud jde o prioritní látky v oblasti vodní politiky. *Úřední věstník Evropské unie*. L 226/1. Dostupné z URL: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN>> [cit. 1. 3. 2020]
- [8] ADEEL, M.; SONG, X.; WANG, Y.; FRANCIS, D. a YANG, Y.: Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*. **99**, 107–119 (2017).

- [9] HALL, J. M.; COUSE, J. F. a KORACH, K. S.: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of biological chemistry*. **276**:40, 36869–36872 (2001).
- [10] YING, G. G.; KOOKANA, R. S. a RU, Y. J.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. **28**:6, 545–551 (2002).
- [11] STRECK, G.: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **28**:6, 635–652 (2009).
- [12] STANCZYK, F. Z.; ARCHER, D. F. a BHAVNANI, B. R.: Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception*. **87**:6, 706–727 (2013).
- [13] CLOUZOT, L.; MARROT, B.; DOUMENQ, P. a ROCHE, N.: 17 α -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental progress*. **27**:3, 383–396 (2008).
- [14] YING, G. G. a KOOKANA, R. S.: Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. **24**:10, 2640–2645 (2005).
- [15] KUHL, H.: Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*. **8**:1, 3–63 (2005).
- [16] GUENGERICH, F. P.: Metabolism of 17 α -ethinylestradiol in humans. *Life sciences*. **47**:22, 1981–1988 (1990).
- [17] ZHANG, H.; CUI, D.; WANG, B.; HAN, Y. H.; BALIMANE, P.; YANG, Z.; SINZ, M. a RODRIGUES, A. D.: Pharmacokinetic drug interactions involving 17 α -ethinylestradiol. *Clinical pharmacokinetics*. **46**:2, 133–157 (2007).
- [18] BALL, S. E.; FORRESTER, L. M.; WOLF, C. R. a BACK, D. J.: Differences in the cytochrome P-450 isoenzymes involved in the 2-hydroxylation of oestradiol and 17 α -ethinylestradiol. Relative activities of rat and human liver enzymes. *Biochemical Journal*. **267**:1, 221–226 (1990).
- [19] WANG, B.; SANCHEZ, R. I.; FRANKLIN, R. B.; EVANS, D. C. a HUSKEY, S. E. W.: The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 α -ethinylestradiol. *Drug metabolism and disposition*. **32**:11, 1209–1212 (2004).

- [20] BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; VALÁŠKOVÁ, P.; ČERNÁ, V. a STIBOROVÁ, M.: Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental toxicology and pharmacology*. **38**:3, 852–860 (2014).
- [21] RAXWORTHY, M. J. a GULLIVER, P. A.: 2-Hydroxyethinyloestradiol as a substrate for catechol-O-methyltransferase - implications in the metabolism of ethinyloestradiol. *Journal of steroid biochemistry*. **17**:1, 17–21 (1982).
- [22] MATTISON, D. R.; KARYAKINA, N.; GOODMAN, M. a LAKIND, J. S.: Pharmaco- and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps. *Critical reviews in toxicology*. **44**:8, 696–724 (2014).
- [23] HELTON, E. D.; WILLIAMS, M. C. a GOLDZIEHER, J. W.: Human urinary and liver conjugates of 17 α - ethinyloestradiol. *Steroids*. **27**:6, 851–867 (1976).
- [24] CAJTHAML, T.; KŘESINOVÁ, Z.; SVOBODOVÁ, K.; SIGLER, K. a ŘEZANKA, T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinyloestradiol. *Environmental Pollution*. **157**:12, 3325–3335 (2009).
- [25] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; HODEK, P. a FREI, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*. **93**, 229–237 (1999).
- [26] OMURA, T. a SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*. **239**:7, 2370–2378 (1964).
- [27] SPATZENEGGER, M. a JAEGER, W.: Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug metabolism reviews*. **27**:3, 397–417 (1995).
- [28] 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. a BEAUNE, P.: Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*. **20**:1-2, 1–137 (1999).
- [29] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PÁCA, J.; MARTÍNEK, V. a PÁCA JR, J. : Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*. **98**:10, 876–890 (1999).
- [30] WERCK-REICHHART, D. a FEYEREISEN, R.: Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*. **1**:6, reviews 3003.1 (2000).

- [31] MA, Q. a LU, A. Y.: CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug metabolism and disposition*. **35**:7, 1009–1016 (2007).
- [32] WOGAN, G. N.; HECHT, S. S.; FELTON, J. S.; CONNEY, A. H. a LOEB, L. A.: Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*. **14**:6, 473–486 (2004).
- [33] WALSH, A. A.; SZKLARZ, G. D. a SCOTT, E. E.: Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. **288**:18, 12932–12943 (2013).
- [34] GUENGERICH, F. P.: Human cytochrome P450 enzymes. V knize: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Čtvrtá edice. Springer, Boston, MA, 2015. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [35] MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. a de KANTER, R.: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. **2**:6, 875–894 (2006).
- [36] ZANGER, U. M. a SCHWAB, M.: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*. **138**:1, 103–141 (2013).
- [37] GUENGERICH, F. P.: Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-biological interactions*. **106**:3, 161–182 (1997).
- [38] BIOCOMPARE: Anti-Cytochrome P450 1A2/CYP1A2 Picoband Antibody from BosterBio. Dostupné z URL: <<https://www.biocompare.com/9776-Antibodies/8299934-Anti-CYP1A2-Antibody/#ctl05-ctl03-ctl02-contentPane>> [cit. 28. 3. 2020]
- [39] GOLDSTEIN, J. A.: Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *British journal of clinical pharmacology*. **52**:4, 349–355 (2004)
- [40] RENDIC, S. a CARLO, F. J. D.: Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug metabolism reviews*. **29**:1-2, 413–580 (1997).

- [41] WRIGHTON, S. A.; SCHUETZ, E. G.; THUMMEL, K. E.; SHEN, D. D.; KORZEKWA, K. R. a WATKINS, P. B.: The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug metabolism reviews*. **32**:3-4, 339–361 (2000).
- [42] KAMEL, A. a HARRIMAN, S.: Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discovery Today: Technologies*. **10**:1, e177–e189 (2013).
- [43] LIN, J. H. a LU, A. Y. H.: Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical pharmacokinetics*. **35**:5, 361–390 (1998).
- [44] RING, B.; WRIGHTON, S. A. a MOHUTSKY, M.: Reversible mechanisms of enzyme inhibition and resulting clinical significance. V knize: *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism*. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. ISBN 978-1-62703-758-7.
- [45] WHITELEY, C. G.: Mechanistic and kinetic studies of inhibition of enzymes. *Cell biochemistry and biophysics*. **33**:3, 217–225 (2000).
- [46] LIU, J.; SRIDHAR, J. a FOROOZESH, M.: Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules*. **18**:12, 14470–14495 (2013).
- [47] LO, S. N.; CHANG, Y. P.; TSAI, K. C.; CHANG, C. Y.; WU, T. S. a UENG, Y. F.: Inhibition of CYP1 by berberine, palmatine, and jatrorrhizine: selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling. *Toxicology and applied pharmacology*. **272**:3, 671–680 (1998).
- [48] CHANG, S. Y.; CHEN, C.; YANG, Z. a RODRIGUES, A. D.: Further assessment of 17 α -ethinylestradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms in vitro. *Drug metabolism and disposition*. **37**:8, 1667–1675 (2009).
- [49] CHUN, Y. J.; KIM, Y. M. a GUENGERICH, F. P.: Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **262**:8, 20–24 (1999).
- [50] ZHAI, S.; DAI, R.; FRIEDMAN, F. K. a VESTAL, R. E.: Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug metabolism and disposition*. **26**:10, 989–992 (1998).
- [51] YAMAORI, S.; KUSHIHARA, M.; YAMAMOTO, I. a WATANABE, K.: Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and

- potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochemical pharmacology*. **79**:11, 1691–1698 (2010).
- [52] SESARDIC, D.; BOOBIS, A. R.; MURRAY, B. P.; MURRAY, S.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. a DAVIES, D. S.: Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *British journal of clinical pharmacology*. **29**:6, 651–663 (1990).
- [53] JENSEN, K. G.; POULSEN, H. E.; DOEHMER, J. a LOFT, J.: Kinetics and inhibition by fluvoxamine of phenacetin O-deethylation in V79 cells expressing human CYP1A2. *Pharmacology & toxicology*. **76**:4, 286–288 (1995).
- [54] ZHOU, S. F.; YANG, L. P.; ZHOU, Z. W.; LIU, Y. H.; a CHAN, E.: Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *The AAPS journal*. **11**:3, 481–494 (2009).
- [55] SANSEN, S.; YANO, J. K.; REYNALD, R. L.; SCHOCH, G. A.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D. a JOHNSON, E. F.: Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry*. **282**:19, 14348–14355 (2007).
- [56] TURPEINEN, M.; NIEMINEN, R.; JUNTUNEN, T.; TAAVITSAINEN, P.; RAUNIO, H. a PELKONEN, O.: Selective inhibition of CYP2B6-catalyzed bupropion hydroxylation in human liver microsomes in vitro. *Drug metabolism and disposition*. **32**:6, 626–631 (2004).
- [57] KORHONEN, L. E.; TURPEINEN, M.; RAHNASTO, M.; WITTEKINDT, C.; POSO, A.; PELKONEN, O.; RAUNIO, H. a JUVONEN, R. O.: New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *British journal of pharmacology*. **150**:7, 932–942 (2007).
- [58] TURPEINEN, M.; RAUNIO, H. a PELKONEN, O.: The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Current drug metabolism*. **7**:7, 705–714 (2006).
- [59] SHAH, M. B.; ZHANG, Q. a HALPERT, J. R.: Crystal structure of CYP2B6 in complex with an efavirenz analog. *International journal of molecular sciences*. **19**:4, 1025 (2018).

- [60] ZHOU, S. F.; ZHOU, Z. W.; YANG, L. P. a CAI, J. P.: Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Current medicinal chemistry*. **16**:27, 3480–3675 (2009).
- [61] YIN, T.; MAEKAWA, K.; KAMIDE, K.; SAITO, Y.; HANADA, H.; MIYASHITA, K.; KOKUBO, Y.; AKAIWA, Y.; OTSUBO, R.; NAGATSUKA, K.; OTSUKI, T.; HORIO, T.; TAKIUCHI, S.; KAWANO, Y.; MINEMATSU, K.; NARITOMI, H.; TOMOIKE, H.; SAWADA, J. a MIYATA, T.: Genetic variations of CYP2C9 in 724 Japanese individuals and their impact on the antihypertensive effects of losartan. *Hypertension research*. **31**:8, 1549–1557 (2008).
- [62] PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; HAKKOLA, J.; HONKAKOSKI, P.; HUKKANEN, J. a RAUNIO, H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of toxicology*. **82**:10, 667–715 (2008).
- [63] COLLOM, S. L.; LADDUSAW, R. M.; BURCH, A. M.; KUZMIC, P.; PERRY, M. D. a MILLER, G. P.: CYP2E1 substrate inhibition mechanistic interpretation through an effector site for monocyclic compounds. *Journal of Biological Chemistry*. **283**:6, 3487–3496. (2008).
- [64] WEI, J.; ZHANG, H. a ZHAO, Q.: In vitro inhibitory effects of Friedelin on human liver cytochrome P450 enzymes. *Pharmaceutical biology*. **56**:1, 363–367. (2018).
- [65] PORUBSKY, P. R.; MENEELY, K. M. a SCOTT, E. E.: Structures of human cytochrome P-450 2E1 insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *Journal of Biological Chemistry*. **283**:48, 33698–33707 (2008).
- [66] ZHOU, S. F.: Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current drug metabolism*. **9**:4, 310–322 (2008).
- [67] JARVIS, B. a FAULDS, D.: Nelfinavir *Drugs*. **56**:1, 147–167 (1998).
- [68] SEVRIOUKOVA, I. F. a POULOS, T. L.: Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107**:43, 18422–18427 (2010).
- [69] OLESEN, O. V. a LINNET, K.: Fluvoxamine-clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism. *Journal of clinical psychopharmacology*. **20**:1, 35–42 (2000).

- [70] BOXENBAUM, H. a LINNET, K.: Cytochrome P450 3A4 in vivo ketoconazole competitive inhibition: determination of K_i and dangers associated with high clearance drugs in general. *J Pharm Pharm Sci.* **2**:2, 47–52 (1999).
- [71] GOOSEN, T. C.; CILLIÉ, D.; BAILEY, D. G.; YU, C.; HE, K.; HOLLENBERG, P. F.; WOSTER, P. M.; COHEN, L.; WILLIAMS, J. A.; RHEEDERS, M. a DIJKSTRA, H. P.: Bergamottin contribution to the grapefruit juice – felodipine interaction and disposition in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* **76**:6, 607–617 (2004).
- [72] POCHAPSKY, T. C.; KAZANIS, S. a DANG, M.: Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. *Antioxidants & redox signaling.* **13**:8, 1273–1296 (2010).
- [73] ATOR, M. A. a MONTELLANO P. R. O.: 5 Mechanism-Based (Suicide) Enzyme Inactivation. *The enzymes.* **19**, 213–282 (1990).
- [74] CORREIA, M. A. a MONTELLANO P. R. O.: Inhibition of cytochrome P450 enzymes. V knize: *Cytochrome P450*. Třetí edice. Springer, Boston, MA, 2005. ISBN 978-0-387-27447-8.
- [75] GUENGERICH, F. P.: Oxidation of 17α -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Molecular Pharmacology.* **33**:5, 500–508 (1988).
- [76] PALOVAARA, S.; KIVISTÖ, K. T.; TAPANAINEN, P.; MANNINEN, P.; NEUVONEN, P. J. a LAINE, K.: Effect of an oral contraceptive preparation containing ethinylestradiol and gestodene on CYP3A4 activity as measured by midazolam 1'-hydroxylation. *British journal of clinical pharmacology.* **50**:4, 333–337 (2001).
- [77] BACK, D. J. a ORME, M. L. E.: Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives. *Clinical pharmacokinetics.* **18**:6, 472–484 (1990).
- [78] MONTELLANO, P. R. O.; KUNZE, K. L.; YOST, G. S. a MICO, B. A.: Self-catalyzed destruction of cytochrome P-450: covalent binding of ethynyl sterols to prosthetic heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **76**:2, 746–749 (1979).
- [79] KUNZE, K. L.; MANGOLD, B. L.; WHEELER, C.; BEILAN, H. S. a MONTELLANO, P. R. O.: The cytochrome P-450 active site. Regiospecificity of prosthetic heme alkylation by olefins and acetylenes. *Journal of Biological Chemistry.* **258**:7, 4202–4207 (1983).

- [80] GRÄNS, J.; WASSMUR, B. a CELANDER, M. C.: One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquatic toxicology*. **100**:3, 263–270 (2010).
- [81] HASSELBERG, L.; WESTERBERG, S.; WASSMUR, B. a CELANDER, M. C.: Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 α -ethynylestradiol exposure. *Aquatic toxicology*. **86**:2, 256–264 (2008).
- [82] HASSELBERG, L.; GRØSVIK, B. E.; GOKSØYR, A. a CELANDER, M. C.: Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology*. **4**:2, (2005).
- [83] KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P. a KATSIADAKI, I.: Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): system interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic toxicology*. **81**:3, 233–244 (2007).
- [84] LYSSIMACHOU, A.; JENSSEN, B. M. a ARUKWE, A.: Brain cytochrome P450 aromatase gene isoforms and activity levels in Atlantic salmon after waterborne exposure to nominal environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol and antifoulant tributyltin. *Toxicological Sciences*. **91**:1, 82–92 (2006).
- [85] REYHANIAN, N.; VOLKOVA, K.; HALLGREN, S.; BOLLNER, T.; OLSSON, P.; OLSÉN, H. a HÄLLSTRÖM, I. P.: 17 α -Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*. **105**:1-2, 41–48 (2011).
- [86] MALTAIS, D. a ROY, R. L.: Effects of nonylphenol and ethynylestradiol on copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species. *Ecotoxicology and environmental safety*. **108**, 168–178 (2014).
- [87] GYLLENHAMMAR, I.; ERIKSSON, H.; SÖDERQVIST, A.; LINDBERG, R. H.; FICK, J. a BERG, C.: Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquatic toxicology*. **91**:2, 102–109 (2009).
- [88] HAARHOFF, Z. E.; KRAMER, M. A.; ZVYAGA, T. A.; ZHANG, J.; BHUTANI, P.; SUBRAMANIAN, M. a RODRIGUES, A. D.: Comprehensive evaluation of liver microsomal cytochrome P450 3A (CYP3A) inhibition: comparison of cynomolgus monkey and human. *Xenobiotica*. **47**:6, 470–478 (2017).

- [89] PAN, X. a JEONG, H.: Estrogen-induced cholestasis leads to repressed CYP2D6 expression in CYP2D6-humanized mice. *Molecular pharmacology*. **88**:1, 106–112 (2015).
- [90] KLINGER, W. a LUPP, A.; KARGE, E.; BAUMBACH, H.; EICHHORN, F.; FEIX, A.; FÜLDNER, F.; GERNHARDT, S.; KNELS, L.; KOST, B.; MERTENS, G.; WERNER, F.; OETTEL, M.; RÖMER, W.; SCHWARZ, S.; ELGER, W. a SCHNEIDER, B.: Estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone and androstenedione: novel derivatives and enantiomers. Interactions with rat liver microsomal cytochrome P450 and antioxidant/radical scavenger activities in vitro. *Toxicology letters*. **128**:1-3, 129–144 (2002).
- [91] KENT, U. M.; MILLS, D. E.; RAJNARAYANAN, R. V.; ALWORTH, W. L. a HOLLENBERG, P. F.: Effect of 17- α -ethynylestradiol on activities of cytochrome P450 2B (P450 2B) enzymes: characterization of inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and identification of metabolites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **300**:2, 549–558 (2002).
- [92] LAURENZANA, E. M.; WEIS, C. C.; BRYANT, C. W.; NEWBOLD, R. a DELCLOS, K. B.: Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression *Food and chemical toxicology*. **40**:1, 53–63 (2002).
- [93] BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; KLUSOŇOVÁ, Z.; HOLECOVÁ, J.; MARTÍNKOVÁ, M.; BÁRTA, F.; DRAČÍNSKÁ, H.; CAJTHAML, T. a STIBOROVÁ, M.: Exposure of rats to exogenous endocrine disruptors 17 α - ethynylestradiol and benzo(a)pyrene and an estrogenic hormone estradiol induces expression of cytochromes P450 involved in their metabolism. *Neuro Endocrinol Lett*. **37**:1, 84–94 (2016).
- [94] BALOGH, A.; GESSINGER, S.; SVAROVSKY, U.; HIPPIUS, M.; MELLINGER, U.; KLINGER, G.; HOFFMANN, A. a OETTEL, M.: Can oral contraceptive steroids influence the elimination of nifedipine and its primary pyridine metabolite in humans? *European journal of clinical pharmacology*. **54**:9-10, 729–734 (1998).
- [95] LIN, H.; KENT, U. M. a HOLLENBERG, P. F.: Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 α -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **301**:1, 160–167 (2002).

- [96] HÄGG, S.; SPIGSET, O. a DAHLQVIST, R.: Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology*. **51**:2, 169–173 (2001).
- [97] CHERALA, G.; PEARSON, J.; MASLEN, C. a EDELMAN, A.: An ethinyl estradiol-levonorgestrel containing oral contraceptive does not alter cytochrome P4502C9 in vivo activity. *Drug Metabolism and Disposition*. **42**:3, 323–325 (2014).
- [98] LAINE, K.; YASAR, U.; WIDÉN, J. a TYBRING, G.: A Screening Study on the Liability of Eight Different Female Sex Steroids to Inhibit CYP2C9, 2C19 and 3A4 Activities in Human Liver Microsomes. *Pharmacology & Toxicology*. **93**:2, 77–81 (2003).
- [99] SINUES, B.; FANLO, A.; MAYAYO, E.; CARCAS, C.; VICENTE, J.; ARENAZ, I. a CEBOLLADA, A.: CYP2A6 activity in a healthy Spanish population: effect of age, sex, smoking, and oral contraceptives. *Human & experimental toxicology*. **27**:5, 367–372 (2008).
- [100] DRAPER, A. J.; MADAN, A. a PARKINSON, A.: Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **341**:1, 47–61 (1997).
- [101] PALOVAARA, S.; PELKONEN, O.; UUSITALO, J.; LUNDGREN, S. a LAINE, K.: Inhibition of cytochrome P450 2B6 activity by hormone replacement therapy and oral contraceptive as measured by bupropion hydroxylation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **74**:4, 326–333 (2003).
- [102] LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; KOIVUSAARI, U. a HÄNNINEN, O.: Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology*. **3**:1, 35–46 (1983).
- [103] WIECHELMAN, K. J.; BRAUN, R. D. a FITZPATRICK, J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*. **175**:1, 231–237 (1988).
- [104] BURKE, M. D. a MAYER, R. T.: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*. **2**:6, 583–588 (1974).

- [105] VOLPE, D. A.; HAMED, S. S. a ZHANG, L. K.: Use of different parameters and equations for calculation of IC 50 values in efflux assays: potential sources of variability in IC50 determination. *The AAPS journal*. **16**:1, 172–180 (2014).
- [106] CHEN, J. J.; CHEN, G. S. a BUNCE, N. J.: Inhibition of CYP 1A2-dependent MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology: An International Journal*. **18**:2, 115–119 (2003).
- [107] LUBET, R. A.; MAYER, R. T.; CAMERON, J. W.; NIMS, R. W.; BURKE, M. D.; WOLFF, T. a GUENGERICH, F. P.: Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Archives of biochemistry and biophysics*. **238**:1, 43–48 (1985).
- [108] HESSE, L. M.; VENKATAKRISHNAN, K.; von MOLTKE, L. L.; DUAN, S. X.; SHADER, R. I. a GREENBLATT, D. J.: CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metabolism and Disposition*. **28**:10, 1176–1183 (2000).
- [109] KAPHALIA, L.; KAPHALIA, B. S.; KUMAR, S.; KANZ, M. F. a TREINEN-MOSLEN, M.: Efficient high performance liquid chromatograph/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. *Journal of Chromatography B*. **830**:2, 231–237 (2006).
- [110] BRIAN, W. R.; SARI, M. A.; IWASAKI, M.; SHIMADA, T.; KAMINSKY, L. S. a GUENGERICH, F. P.: Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **29**:51, 11280–11292 (1990).
- [111] KLUSOŇOVÁ, Z.: Vliv endokrinních disruptorů na biotransformační enzymy. *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Praha (2018).
- [112] PETER, R.; BOECKER, R.; BEAUNE, P. H.; IWASAKI, M.; GUENGERICH, F. P. a YANG, C. S.: Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical research in toxicology*. **3**:6, 566–573 (1990).
- [113] BOŠTÍKOVÁ, Z.: Vliv dihydromyricetinu a myricetinu na vybrané biotransformační enzymy. *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Praha (2016).

- [114] KRAUSER, J. A. a GUENGERICH, F. P.: Cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 β -hydroxylation stereochemistry, kinetic deuterium isotope effects, and rate-limiting steps. *Journal of Biological Chemistry*. **280**:20, 19496–19506 (2005).
- [115] OTÁHALOVÁ, B.: Inhibiční vliv estrogenních endokrinních disruptorů na aktivitu cytochromů P450. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Praha (2018).
- [116] NERURKAR, P. V.; PARK, S. S.; THOMAS, P. E. a NIMS, R. W.: Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: Substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical pharmacology*. **46**:5, 933–943 (1993).
- [117] ANGER, D. L.; PETRE, M. A. a CRANKSHAW, D. J.: Heteroactivation of cytochrome P450 1A1 by teas and tea polyphenols. *British journal of clinical pharmacology*. **145**, 926–933 (2005).
- [118] ATKINS, W. M.: Implications of the allosteric kinetics of cytochrome P450s. *Drug discovery today*. **9**:11, 478–484 (2004).
- [119] CHOVAN, J. P.; RING, S. C.; YU, E. a BALDINO, J. P.: Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica*. **37**:5, 459–473. (2007).
- [120] LEWIS, D. F. V. a LAKE, B. G.: Molecular modelling of CYP1A subfamily members based on an alignment with CYP102: rationalization of CYP1A substrate specificity in terms of active site amino acid residues. *Xenobiotica*. **26**:7, 723–753 (1996).
- [121] LEWIS, D. F. V.; LAKE, B. G.; GEORGE, S. G.; DICKINS, M.; EDDERSHAW, P. J.; TARBIT, M. H.; BERESFORD, A. P.; GOLDFARB, P. S. a GUENGERICH, F. P.: Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102. *Toxicology*. **139**:1-2, 53–79 (1999).
- [122] MĚKOTOVÁ, B.: Vliv endokrinních disruptorů na expresi a aktivitu cytochromů P450 2B v modelovém organismu potkana. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Praha (2018).
- [123] JUŘICA, J. a ŠULCOVÁ, A.: Determination of cytochrome P450 metabolic activity using selective markers. *Topics on Drug Metabolism*. **8**, 191–220 (2012).

- [124] JOHANSSON, I.; EKSTROEM, G.; SCHOLTE, B.; PUZYCKI, D.; JÖRNVALL, H. a INGELMAN-SUNDBERG, M.: Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry*. **27**:6, 1925–1934 (1988).
- [125] COOPER, K. O.; REIK, L. M.; JAYYOSI, Z. A. I. D.; BANDIERA, S.; KELLEY, M.; RYAN, D. E.; DANIEL, R.; MCCLUSKEY, S. A.; LEVIN, W. a THOMAS, P. E.: Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. **301**:2, 345–354 (1993).
- [126] STIBOROVÁ, M.; MARTÍNEK, V.; RÝDLOVÁ, H.; KOBLAS, T. a HODEK, P.: Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer letters*. **220**:2, 145–154 (2005).
- [127] SESARDIC, D.; BOOBIS, A. R.; EDWARDS, R. J. a DAVIES, D. S.: 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 (1988).
- [128] SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y. a GUENGERICH, F. P.: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **270**:1, 414–423 (1994).
- [129] TAMAKI, T.; NISHIYAMA, A.; KIMURA, S.; AKI, Y.; YOSHIZUMI, M.; HOUCHI, H.; MORITA, K. a ABE, Y.: EXP3174: the major active metabolite of losartan. *Cardiovascular drug reviews*. **15**:12, 122–136 (1997).
- [130] YAMAMURA, Y.; KOYAMA, N. a UMEHARA, K.: Comprehensive kinetic analysis and influence of reaction components for chlorzoxazone 6-hydroxylation in human liver microsomes with CYP antibodies. *Xenobiotica*. **45**:4, 353–360 (2015).
- [131] SUN, Z.; ZHANG, Z.; JI, M.; YANG, H.; CROMIE, M.; GU, J.; WANG, C.; YANG, L.; YU, Y.; GAO, W. a WANG, S. L.: BDE47 induces rat CYP3A1 by targeting the transcriptional regulation of miR-23b. *Scientific reports*. **6**:1, 1–10 (2016).
- [132] RUTTEN, A. A. J. J. L.; FALKE, H. E.; CATSBURG, J. F.; WORTELBOER, H. M.; BLAAUBOER, B. J.; DOORN, L.; van LEEUWEN, F. X. R.; THEELEN, R. a

- RIETJENS, I. M. C. M.: Interlaboratory comparison of microsomal ethoxyresorufin and pentoxyresorufin O-dealkylation determinations: standardization of assay conditions. *Archives of toxicology*. **66**:4, 237–244 (1992).
- [133] MIKSTACKA, R.; PRZYBYLSKA, D.; RIMANDO, A. M. a BAER-DUBOWSKA, W.: Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers. *Molecular nutrition & food research*. **51**:5, 517–524 (2007).
- [134] POHL, R. J. a FOUTS, J. R.: A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical biochemistry*. **107**:1, 150–155 (1980).
- [135] CHANG, T. K. a WAXMAN, D. J.: Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. V knize: *Cytochrome P450 Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 2006. ISBN 978-1-59259-998-1.
- [136] KORZEKWA, K. R.; KRISHNAMACHARY, N.; SHOU, M.; OGAI, A.; PARISE, R. A.; RETTIE, A. E.; GONZALEZ, F. J. a TRACY, T. S.: Evaluation of Atypical Cytochrome P450 Kinetics with Two-Substrate Models: Evidence That Multiple Substrates Can Simultaneously Bind to Cytochrome P450 Active Sites. *Biochemistry*. **37**:12, 4137–4147 (1998).
- [137] DAVYDOV, D. a HALPERT, J. R.: Allosteric P450 mechanisms: multiple binding sites, multiple conformers, or both? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **4**:12, 1523–1535 (2008).
- [138] ATKINS, W. M.; WANG, W. R. a LU, A. Y.: Allosteric behavior in cytochrome P450-dependent in vitro drug-drug interactions: A prospective based on conformational dynamics. *Chemical research in toxicology*. **14**:4, 338–347 (2001).

